

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Rôle du canal TRPA1 dans le microenvironnement tumoral des cancers prostatiques humains

Thèse dirigée par le Professeur Morad Roudbaraki

Présentée et soutenue publiquement par

Eric Vancauwenberghe

Le mercredi 14 décembre 2016

Pr. Franck Broly , Directeur de Recherche, EA4483, Université Lille 2	Président
Dr. Thierry Capiod , Chargé de Recherche, INSERM U1151, Paris	Rapporteur
Dr. Corinne Bousquet , Directeur de Recherche, INSERM U1037, Toulouse	Rapporteur
Dr. Ana Maria Gomez , Directeur de Recherche, INSERM UMR-S 1180, Paris	Examineur
Dr. Bruno Constantin , Directeur de Recherche, CNRS ERL7368, Poitiers	Examineur
Pr. Natalia Prevarskaya , Directeur de recherche, INSERM U1003, Lille 1	Examineur
Pr. Morad Roudbaraki , Professeur d'Université, INSERM U1003, Lille 1	Examineur

Résumé

Le cancer de la prostate (CaP) est le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme dans le monde après le cancer du poumon. Le CaP étant dépendant des androgènes, les traitements consistent à diminuer le taux de ces hormones chez les patients. Bien que ces traitements permettent une rémission, la tumeur évolue par la suite vers l'androgéno-indépendance où les cellules tumorales deviennent plus agressives et développent des métastases, suggérant l'intervention d'autres facteurs que les androgènes. Des données montrent que le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la cancérogenèse prostatique ainsi qu'à sa résistance aux agents chimiothérapeutiques. Dans ce microenvironnement tumoral, de nombreux acteurs sont impliqués dont le stroma sous-jacent à la tumeur. Il existe une communication étroite entre les cellules épithéliales tumorales et le stroma tumoral, ce qui favorise le développement du cancer en absence d'androgènes. La connaissance de ces interactions et leur ciblage pourrait à long terme, permettre l'élaboration de thérapies nouvelles et efficaces pour le traitement de ces cancers. De nombreuses études montrent l'implication des altérations de l'homéostasie calcique et la modulation de l'activité des canaux ioniques dans la régulation des grands processus physiopathologiques incluant la cancérogenèse. Dans ce contexte, de récents travaux du laboratoire ont montré qu'un canal calcique, le canal TRPA1, est spécifiquement exprimé au niveau des myofibroblastes ou CAF (cancer-associated fibroblasts) de cancers prostatiques. Le canal TRPA1 étant considéré comme un chimiosenseur capable d'être activé par de nombreuses molécules endogènes et environnementales, il est possible que ce canal joue un rôle important dans les dialogues épithélio-stromales en induisant une augmentation de calcium intracellulaire conduisant à la sécrétion des facteurs de croissance. Ainsi, durant cette thèse, nous avons étudié le rôle du canal TRPA1 dans les interactions épithélio-stromales des cancers prostatiques humains.

Nos études ont montré que le canal TRPA1 exprimé par les CAF était fonctionnel, qu'il est directement activé par le Ca^{2+} provenant de la vidange des stocks calciques réticulaires en constituant un canal SOC (Store-Operated Calcium) permettant d'induire une entrée dite capacitive de Ca^{2+} . De façon très intéressante, cet influx calcique généré par l'activation du canal TRPA1 induit la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) ainsi que son expression *via* les facteurs de transcription NFAT. Par ailleurs, nous avons montré que le HGF favorisait la résistance des cellules tumorales à l'apoptose normalement induite par les agents chimiothérapeutiques. Nos données montrent que l'activité et l'expression du canal TRPA1 stromal sont directement modulées *via* les voies de transduction induites par les agonistes sécrétés par les cellules tumorales prostatiques comme l'Endothéline-1 (ET-1), une protéine surexprimée dans les cancers prostatiques. Par la suite, nous avons montré qu'il existait des mutations et des polymorphismes au niveau du canal TRPA1 exprimé dans les CAFs et que ces changements structuraux du canal modifiaient sa sensibilité aux facteurs environnementaux comme le resveratrol. En induisant l'activation du canal TRPA1 muté, l'antioxydant resvératrol induit la sécrétion de HGF et la résistance à l'apoptose des cellules épithéliales dans les conditions de co-culture des CAF avec les cellules épithéliales. Et enfin, nous avons montré que le HGF sécrétée par l'activation du canal TRPA1 et le milieu conditionné des CAF favorisaient la migration des cellules épithéliales cancéreuses en induisant au niveau de ces cellules une transition épithélio-mésenchymateuse. L'ensemble de ces données suggèrent que le canal TRPA1 constitue une cible potentielle pour les thérapies futures des CaP en permettant d'interrompre les interactions épithélio-stromales du microenvironnement tumoral et d'empêcher l'évolution de ces cancers.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men worldwide after lung cancer. PCa being androgeno-dependant, treatments involve decreasing androgen levels in the patients. Although these treatments are effective at the beginning, thereafter, tumor progress toward an androgen-independent state with tumor cells more aggressive and which form metastases, suggesting involvement of other factors than androgens. Recent data show that tumor microenvironment plays an important role in prostate carcinogenesis and in chemotherapy resistance. In this tumor microenvironment, many actors are involved including underlying tumor stroma where there exist a close communication between tumor epithelial cells and tumor stromal cells, thus promoting cancer development in absence of androgens. Knowledge of these interactions and their targets could provide elaborations of new effective therapies for cancer treatments. Many studies show involvement of alterations in calcium homeostasis and modulation of ion channels activity in the regulation of major pathophysiological process including carcinogenesis. In this context, recent work in our laboratory has shown that a calcium channel, TRPA1 channel, is specifically expressed in myofibroblasts or cancer-associated fibroblasts (CAF) of prostate cancers. TRPA1 being viewed like a chemosensor activated by many endogenous and environmental factors, it is possible that this channel play an important role in epithelia-stromal crosstalk by inducing intracellular calcium increase leading to growth factors secretion. Thus, during this thesis, we have studied TRPA1 channel role in epithelia-stromal crosstalk of human PCa.

Our studies have shown that TRPA1 channel expressed in CAF is functional and that it is directly activated by Ca^{2+} releasing from reticular stores, TRPA1 constituting a Store-Operated Calcium (SOC) channel and inducing capacitative calcium entry. Interestingly, this calcium entry, generated by TRPA1 channel activation, induces growth factors secretion as Hepatocyte Growth factor (HGF) as well as its expression *via* NFAT transcription factors. Furthermore, we have shown that HGF promotes tumor cells resistance to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. Our data show that stromal TRPA1 channel activity and expression are directly modulated through transduction pathways induced by agonists secreted by prostate tumor cells like Endothelin-1 (ET-1), an overexpressed peptide in PCa. Thereafter, we have shown existence of mutations and polymorphisms in TRPA1 channel expressed in human prostate CAF and that these structural changes modify the sensitivity of the channel to environmental factors like resveratrol. By inducing activation of mutated TRPA1 channel, resveratrol antioxidant induces HGF secretion and epithelial cells resistance to apoptosis in co-cultures conditions between CAF and epithelial cells. Finally, we have shown that HGF secreted by TRPA1 activation and CAF conditioned medium promoted cancer epithelial cells migration by inducing epithelial to mesenchymal transition in these cells. All these data suggest that TRPA1 channel constitutes a potential target for futur therapies in PCa by interrupting epithelia-stromal crosstalk of tumor microenvironment and to prevent PCa development.

A ma famille et à mes amis

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte »

Louis Pasteur.

« La vérité ne se possède pas, elle se cherche »

Albert Jacquard.

“Life finds a way”

Jeff Goldblum.

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

Mesdames, Messieurs les membres du jury veuillez accepter mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté de juger cette thèse. Ayant bien conscience du temps nécessaire que vous avez consacré à la lecture et à l'analyse critique de ce travail, j'espère, humblement, avoir participé à l'enrichissement de vos connaissances sur le canal TRPA1 et son implication dans le microenvironnement tumoral des cancers prostatiques humains.

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

Madame le Docteur Corinne Bousquet et Monsieur le Docteur Thierry Capiod, veuillez recevoir toute ma gratitude pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour le temps consacré à la lecture critique de ce manuscrit de thèse. Soyez assuré de mes profonds remerciements.

Madame le Docteur Ana Maria Gomez et Monsieur le Docteur Bruno Constantin, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury.

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

Monsieur le Professeur Morad Roudbaraki, les mots ne suffisent pas pour vous remercier tant vous m'avez apporté au cours de cette thèse. Je vous suis infiniment reconnaissant pour votre soutien inconditionnel et votre ouverture d'esprit ainsi que pour votre patience inébranlable. Je vous remercie sincèrement pour m'avoir initié à la Recherche scientifique et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir ensemble sur les sciences mais aussi sur la vie. J'ai pris grand plaisir à travailler avec vous. Pour tout cela, merci.

Au cas où, j'oublierais des personnes ci-dessous, je souhaiterais sincèrement remercier tous les membres du laboratoire pour la bonne humeur permanente que vous insufflez à ce laboratoire. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous dans cette ambiance sereine et propice au travail qui règne au sein de l'INSERM U1003.

Etienne et Emilie, comme je sais que vous adorez lire cette partie, je vais commencer par vous ! *Emilie*, tu as énormément apporté au laboratoire autant dans ta disponibilité pour les manip que tous les classements et rangements que tu as pu faire et je dois bien avouer que c'est un boulot immense ! D'ailleurs, merci une nouvelle fois à toi et *Alex* pour le rangement du congélateur à -80°C, c'est un véritable bonheur de ne plus avoir à chercher ses échantillons et je ne suis pas le seul à le penser. Enfin, grâce à toi, je porte ma blouse régulièrement (sous peine de coups de bambou !). Pour tout ça, un très grand merci !!!

Etienne, merci pour tous les conseils prodigués pendant cette thèse et l'aide précieuse que tu as pu nous apporter dans les manip à moi et *Morad*. Tu m'as bien fait rire pendant ces années de thèse et je n'oublierais pas de ci-tôt ton humour bien à toi qui met du piment dans les conversations du Pariselle. J'en profite pour remercier également *Christian* (et oui, l'un ne va pas sans l'autre !), l'expert de la microscopie confocale. Un grand merci également pour toute l'aide apportée et j'espère que tes yeux se sont bien remis de l'observation des exosomes en MET ! Pendant, que je parle de microscopie, je souhaiterais également remercier *Elodie* pour toutes les photos prises en microscopie confocale.

Slava, merci pour tout le soutien que tu as pu m'apporter depuis le Master 1. Ce fut un plaisir de travailler en ta compagnie et je vous souhaite beaucoup de réussite à toi et *Aurélien* pour le Master 2.

Laurent et Alex, merci à vous 2 pour toute l'aide apportée en biologie moléculaire. Vous faites partie des seuls à avoir réellement contribué à l'avancement de nos travaux et pour cela, je vous remercie sincèrement.

Loïc, ce fut également un plaisir de discuter avec toi qui dispose d'une culture générale très étendue ! Merci également pour ton aide sur les manip d'électrophysiologie.

Christophe, bien qu'on ne se voit plus beaucoup, vu ton emploi du temps surchargé de réunions à gogo, ta gentillesse et ton accent du Sud ont apporté un peu de soleil à ce

laboratoire, ce qui est très agréable dans notre région si pluvieuse ! J'ai passé beaucoup de bons moments en ta compagnie et celle de *Louis* et pour cela, merci.

Merci également à *Pauline, Pascal, Ingrid, Manu, Artem, Katya* et *Medhi* ainsi qu'à tous mes collègues de bureau : *Abigaël, Lucile, Valerio, Guillaume, Alex, Oksana, Vanessa* et *Woodys* pour toute la bonne humeur que vous insufflez à ce laboratoire (je sais, je me répète mais je commence sérieusement à fatiguer et à être en panne d'inspiration !). *Woodys*, garde cette passion pour la recherche qui est la tienne, elle te portera loin et je suis sûr que tu trouveras un financement de thèse.

Morad, je ne sais pas si vous lirai ces quelques mots, mais une nouvelle fois merci pour tout. Je suis quelqu'un de très dissipé qui a toujours eu de grandes difficultés de concentration et une estime personnelle proche de 0 mais à aucun moment vous n'avez douté de moi m'encourageant continuellement à avancer. Pour cela, je vous dois beaucoup. Grâce à vous, je suis maintenant totalement autonome, de la simple idée qui fuse dans la tête jusqu'à la rédaction et la soumission d'un article scientifique et la capacité à donner des cours à des étudiants de L1, ce qui n'est pas toujours chose aisée. Notre curiosité et notre passion commune pour la physiologie cellulaire et le cancer nous ont permis de travailler sur différents plans tous plus intéressants les uns que les autres et je n'ai pas vu ces années passer tant ce fut intéressant et enrichissant. Merci encore.

Bien qu'elles ne soient plus là, je remercie très sincèrement *Maylis* et *Charlotte*, les « vraies » thésardes du labo qui ont partagé mes galères et avec qui j'ai pris grand plaisir à travailler au laboratoire de jour comme de nuit. *Maylis*, je ne pense pas que tu liras ce message, mais malgré ce départ anticipé, je suis bien content d'avoir initié une végétarienne à la vraie frite belge ! *Charlotte*, tu es clairement la personne la plus impressionnante que j'ai pu rencontrer au laboratoire avec *Gabriel*, une vraie machine de guerre (ou seigneur Sith ☺) ! Etre capable de faire les révisions d'un *Cancer Cell*, tout en écrivant son manuscrit de thèse et en organisant un congrès entièrement sans l'aide de personne, ce n'est clairement pas à la portée de tout le monde. Même encore maintenant, tu ne t'arrêtes jamais. Ta passion pour la recherche est sans bornes et tu mérites plus que n'importe qui d'avoir un poste de CR. Je pense que tu as laissé un sacré vide dans le laboratoire autant sur le plan scientifique qu'humain et ce n'est pas *Fabien* qui dira le contraire !

A côté de la Thèse, j'ai aussi eu le soutien d'ami(e)s exceptionnel(le)s :

Natacha et Kévin, depuis la Licence, nous avons partagé des moments inoubliables tous plus géniaux les uns que les autres et j'espère que ça ne s'arrêtera pas là. Vous avez été témoin de plusieurs de mes VDM dont un certain épisode de carter d'huile et de « bordure » qui restera dans les annales ! J'espère que malgré la distance avec le Post-doc, nous resterons en contact quoiqu'il arrive. Et *Kévin*, avec tes capacités intellectuelles de dingue, persévères et trouve toi un boulot !!!

Noelia et Helena, qui aurait cru qu'une formation doctorale puisse être aussi enrichissante sur le plan humain ? J'ai passé de très agréables moments en votre compagnie, en particulier les pauses « thés, conversations, film » en plein après-midi qui étaient une véritable bulle d'air pendant cette thèse. *Noelia*, j'espère que tu vas t'épanouir davantage en Arizona et être davantage libre dans ta façon de penser par rapport à ton travail ;-). *Helena*, je te souhaite beaucoup de courage pour la rédaction de ton manuscrit et ta soutenance de thèse qui s'annoncent passionnants !

Enfin, j'en arrive aux remerciements des personnes les plus importantes dans ma vie qui m'ont supporté tout au long de cette thèse qui sont ma famille :

Mum, te remercier est bien trop insuffisant tant tu t'es démenée pour moi pendant toutes ces années afin que je réussisse au mieux. Merci d'avoir supporté mes sauts d'humeur et ma nonchalance du week-end pendant cette thèse et surtout pendant la rédaction du manuscrit où j'ai été très désagréable. Je m'en excuse sincèrement. Même si je ne le montre pas assez, les années passées en ta présence et avec *Steph*, resteront à jamais les plus beaux moments de ma vie. Tu es la personne la plus courageuse et la plus gentille que je connaisse et tu fais toujours passer les autres avant toi-même. Tu as instauré un climat tellement chaleureux à la maison qu'il va m'être bien pénible de partir ! Pour tout ce que tu as fait pour moi jusqu'à maintenant et ton soutien inconditionnel, je te remercie de tout mon cœur et comme on ne le dit jamais assez souvent, *je t'aime p'tite Mum*.

Steph, il n'y a pas encore si longtemps, on ne se supportait plus, mais du jour au lendemain, nous avons appris à vraiment nous connaître et à s'apprécier mutuellement sans qu'il y ait un pétage de plomb mutuel ! Je te remercie pour tous les moments passés en ta compagnie et pour m'avoir fait prendre confiance que je ne valais pas moins que les autres. Je sais que tu as été déçu par les hommes mais je sais qu'à un moment où un autre, tu finiras par trouver le bon

qui t'emmèneras au bout du monde en un claquement de doigts et qui t'aimeras pour ce que tu es et non pas pour ce qu'il veut que tu sois. Paradoxalement, continues à bosser tes abdos *la Grosse ! Je t'aime my sister.*

Pa, grâce à toi, j'ai été initié à la magie des films et à l'imaginaire qui sont une passion commune et un plaisir perpétuel. J'ai pris beaucoup de plaisir à faire des sorties cinéma ou aller à la pêche avec toi et il faudra qu'on se refasse ça prochainement. Si mon post-doc se fait en Australie, tu seras plus que bienvenue pour venir me rendre visite ! Comme je suis sur ma lancée et que ce n'est pas assez souvent dit, *je t'aime my father.*

Mie, je ne te l'ai peut-être pas dit mais je te remercie énormément pour tout le soutien que tu as pu nous apporter pendant toutes ces années. Je garde de merveilleux souvenirs de mon enfance grâce à toi où nous avons beaucoup profité du mercredi après-midi en ta compagnie. Tu as toujours été là dans les moments difficiles et lorsque l'on avait besoin de toi et pour cela, merci énormément. Ici, ça ne sera pas jamais 2 sans 3 mais jamais 3 sans 4, alors je te le dis aussi : *je t'aime mamie.*

Et enfin, le dernier remerciement s'adressera à Jou, la plus fidèle amie qu'un Homme puisse avoir. Tu nous as quitté à l'aube de ton 15^{ème} anniversaire laissant une marque indélébile, une cicatrice qui reste ouverte malgré que le temps passe. Nous ne t'oublierons jamais. Tu as été là dans tous les moments, bons comme mauvais et tu nous as apporté plus de bonheur que l'on ne pouvait en espérer. Tes promenades et ta frimousse d'ewok me manquent sincèrement et je me devais d'écrire ces quelques lignes pour te rendre hommage à toi, Madame blanche de la forêt des chiens blancs. Tu resteras dans mon cœur à tout jamais.

Reposes en paix petite boule de poil. *Ton maître qui t'aime.*

Sommaire

Glossaire	11
Introduction	15
I. La prostate humaine	16
A. Anatomie générale	16
B. Histologie	18
1. Le tissu glandulaire	18
2. Le stroma	22
C. Rôles physiologiques	24
1. Rôle mécanique	24
2. Rôle sécrétoire	25
D. Régulation androgénique de la prostate	26
1. Mode d'action des androgènes	27
2. Effets des androgènes sur la prostate saine	28
II. Pathologies de la prostate humaine	29
A. La prostatite	29
B. L'adénome prostatique ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate	30
C. L'adénocarcinome de la prostate	30
1. Incidence et mortalité	31
2. Initiation du cancer	32
3. Diagnostic	38
5. Traitements des stades androgéno-dépendants	44
6. Cancers hormono-résistants	47
III. Le stroma tumoral prostatique	55
A. Rôle du stroma « normal » dans la tumorigénèse	55
B. Les myofibroblastes ou CAFs	56
1. Origines des CAF	57
2. Sécrotome des CAFs	61
C. Les cellules endothéliales et l'angiogenèse	67
D. Les macrophages associés à la tumeur ou TAM (Tumor-associated macrophages)	68
E. Les fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques	69
F. Les adipocytes associés au cancer ou CAA (cancer-associated adipocytes)	71
G. Le récepteur aux androgènes dans le stroma	72
H. Le stroma métastatique	73
IV. Les canaux ioniques et le cancer	75
A. Rôle du calcium dans la physiologie cellulaire	75
1. Caractéristiques des signaux calciques	77
2. Calcium et transcription	79
3. Importance du calcium dans la physiologie cellulaire	83
B. Canaux ioniques et homéostasie calcique	88
1. Les canaux calciques	88
2. Les canaux potassiques	94

C. Perturbations de l'homéostasie calcique et cancer.....	95
1. Canaux ioniques et prolifération des cellules tumorales.....	95
2. Canaux ioniques et résistance à l'apoptose des cellules tumorales.....	96
3. Canaux ioniques et migration des cellules tumorales.....	96
4. Perturbations de l'homéostasie calcique et angiogenèse.....	97
V. Le canal TRPA1.....	98
A. Structure.....	99
B. Modulation de l'activité du canal TRPA1.....	100
1. Activateurs exogènes.....	100
2. Activateurs endogènes.....	102
3. Inhibiteurs.....	103
4. Modulation de l'activité du canal par l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	104
5. Modulation du canal par le Ca ²⁺	106
C. Polymorphismes et mutations.....	106
1. Mutations du canal TRPA1.....	106
2. Single Nucleotid Polymorphism (SNP).....	107
Problématique et Objectifs.....	109
Matériel et Méthodes.....	112
I. Culture cellulaire.....	113
A. Types cellulaires étudiés.....	113
1. Cultures primaires.....	113
2. Lignées cancéreuses et transformées.....	113
B. Conditions de culture.....	114
1. Généralités.....	114
2. Préparation du sérum déstéroïdé.....	116
3. Conservation des cellules (Congélation/Décongélation).....	116
C. Co-cultures.....	117
1. Indirecte : communications paracrine.....	117
2. Directe : formation de sphéroïdes.....	117
II. Transfections.....	119
A. Lipofection des siARN.....	119
B. Lipofection transitoire de vecteurs d'expression.....	120
III. Biologie Moléculaire.....	120
A. Etudes d'expression des ARNm.....	120
1. Extraction des ARNm.....	120
2. Traitement à la Désoxyribonucléase 1 (DNase I) et Transcription inverse (RT).....	121
3. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	121
4. Nested PCR.....	123
B. Clonage par PCR.....	123
1. Récupération des fragments d'ADN d'intérêt.....	123
2. Extraction d'ADN à partir du gel d'agarose.....	124

3. Ligation de l'ADN dans un vecteur de clonage	124
4. Transformation des bactéries chimio-compétentes	124
5. Criblage des colonies positives	125
C. Extraction de plasmides	125
D. Séquençage	125
IV. Immunodétection	126
A. Extraction des protéines totales	126
B. Western Blot	126
C. Co-immunoprécipitation	128
D. Préparation des sphéroïdes pour immunofluorescence	128
E. Immunohistochimie et immunofluorescence indirecte	129
V. Mesure de la sécrétion d'HGF et de VEGF	130
VI. Mesure de la viabilité cellulaire et de l'apoptose	131
A. Test de viabilité cellulaire MTS/PMS	131
B. Mesure de l'apoptose : coloration au Hoechst	131
C. Mesure de l'apoptose : visualisation de l'échelle d'ADN	132
D. Mesure de l'apoptose : technique du TUNEL	133
VII. Mesure de la viabilité cellulaire et de l'apoptose	134
A. Test de blessure (wound healing assay)	134
B. Chambres de Boyden / Transwell®	134
VIII. Imagerie de fluorescence quantitative du calcium libre cytosolique	135
A. Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2	135
B. Système optique	136
C. Calibration des signaux de fluorescence	137
D. Milieu d'enregistrement	137
E. Charge des cellules en Fura-2	137
IX. Etude de l'exocytose à l'aide de FM1-43, un marqueur du trafic membranaire	138
Résultats	139
Article 1	140
Article 2	163
Article 3	177
Article 4	196
Discussion	215
I. Rôle du canal TRPA1 dans le microenvironnement tumoral prostatique	217
A. Physiologie des cellules stromales	217
1. Fonctionnalité du canal TRPA1	217
2. Sécrétion de facteurs de croissance	220
B. Intervention du canal TRPA1 dans les interactions épithélio-stromales	221
1. Induction de l'EMT	222
2. Rôle dans la résistance à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques	222

3. Induction du remodelage de l'expression des canaux ioniques et migration cellulaire	225
II. Impact des facteurs environnementaux sur le microenvironnement tumoral : cas du resveratrol	227
III. Modulation de l'expression du canal TRPA1 : Impact des stéroïdes.....	230
IV. Rôle du canal TRPA1 dans la physiologie des cellules endothéliales	231
Perspectives	233
I. Confirmer le rôle du canal TRPA1 dans le microenvironnement tumoral par des études du développement tumoral	234
II. Etudier le rôle du canal TRPA1 dans la sécrétion d'exosomes.....	236
III. Etudier le rôle du canal TRPA1 dans la tumorigenèse prostatique associée aux nerfs sympathiques et parasympathiques	238
IV. Etudier les polymorphismes du canal TRPA1 et sa sensibilité aux facteurs environnementaux	239
Conclusion générale	240
Annexes	242
Communications personnelles et publications	247
Bibliographie	266

Glossaire

5 α -DHT	5 α -Dihydrotestostérone
[Ca ²⁺] _i	Concentration calcique intracellulaire
AAP	Anti-Androgène Périphérique
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AITC	Allyl IsoThioCyanate
AM	AcetoxyMethyl ester
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AnkR	Répétitions Ankyrine
ARE	Androgen Response Element
ARN	Acide Ribonucléique
AR	Androgen Receptor
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BAPTA	1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BK _{Ca}	Large conductance calcium-activated potassium channel
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CAF	Cancer-Associated Fibroblast
CaM	Calmoduline
CaMK	CalModulin Kinase
CaP	Cancer de la Prostate
CBP	CREB-binding protein
CCE	Calcium Capacitive Entry
CgA	Chromogranine A
CK	Cytokeratin
c-Met	Récepteur de l'Hepatocyte Growth Factor
CPCR	Cancers Prostatiques Castration-Résistants
CRACM	Calcium Release-Activated Channel Modulator
CREB	cAMP response element binding
CRPC	Castration-Resistant Prostate Cancer
C-ter	Extrémité Carboxy-terminale
DAG	Diacylglycérol

DREAM	Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator
DO	Densité Optique
ECC	Entrée Capacitive de Calcium
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptor
ERE	Estrogen Response element
ET-1	Endothelin-1
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HBP	Hyperplasie Bénigne de la Prostate
HC	HC-030031
HEK	Human Embryonic Kidney
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1- α	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
hPEC	human Primary Epithelial Cells
hPrSC	human Prostate cancer Stromal Cells
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IK _{Ca}	Intermediate conductance calcium-activated potassium channel
IP ₃	Inositol TriPhosphate
IP ₃ R	Inositol TrisPhosphate Receptor
K ⁺	Potassium
K _{2P}	2 Pore domains potassium channel
K _{ATP}	ATP-dependent potassium channel
K _{Ca}	Calcium-activated potassium channel
K _{ir}	Inward-rectifying potassium channel
K _v	Voltage-dependent potassium channel
IL	InterLeukin
LH	Luteinizing Hormone
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
Mg ²⁺	Magnésium

MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	Matrix MetalloProteinase
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MTS	Sel de Tetrazolium
MW	Molecular Weight
Na ⁺	Sodium
NE	NeuroEndocrine
NGF	Nerve Growth Factor
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells
NF-κB	Nuclear Factor- κB
NMDA	N-Méthyl D-Aspartate
NSE	Neuron Specific Enolase
N-ter	Extrémité Amino-terminale
Orai-1	Transmembrane protein 142A, CRACM1
pb	paire de bases
PAP	Phosphatase Acide Prostatique
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC-3	Human, Caucasian, prostate, adenocarcinoma, grade IV
PCa	Prostate Cancer
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIA	Proliferative Inflammatory Atrophy
PI ₃ K	Phosphatidyl Inositol 3 kinase
PIN	Prostatic Intraepithelial Neoplasia
PIP ₂	Phosphatidyl Inositol Bi-Phosphate
PIP ₃	Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMS	Phenazine Methosulfate
PRL	Prolactine
PSA	Prostate Specific Antigen
RE	Réticulum Endoplasmique
RES	Resveratrol
REST	RE-1 Silencing Transcription Factor
ROC	Receptor-Operated Channel

ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RyR	Ryanodine Receptor
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SERM	Selective ER Modulator
siRNA	small interfering RNA
SK _{Ca}	Small conductance calcium-activated potassium channel
SMOC	Second Messenger-Operated Channel
SNARE	Synaptic-soluble NSF Attachment protein REceptors
SOC	Store-Operated Calcium channel
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
SNP	Single Nucleotid Polymorphysm
STIM	Stromal Interacting Molecule
SVF	Sérum de Veau Fétal
TG	Thapsigargine
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TRAM-34	1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
UV	Ultra Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VOC	Voltage-Operated Channel

Introduction

L'étude des pathologies de la prostate humaine revêt une importance considérable lorsque l'on sait que les hyperplasies et les cancers de cet organe sont des maladies extrêmement fréquentes (14% de l'incidence totale des cancers) et que le cancer de la prostate est devenu la troisième cause de mortalité par cancer dans la population masculine en France. Dans les pays développés, l'incidence du carcinome de la prostate s'accroît parallèlement à l'augmentation de l'espérance de vie. La croissance et le développement de cet organe étant sous contrôle androgénique, les traitements non chirurgicaux se limitent actuellement à diminuer les taux d'androgènes circulants. Cependant, à long terme, les tumeurs deviennent androgéno-indépendantes et échappent aux traitements hormonaux par des mécanismes encore indéterminés. Ceci suggère l'intervention d'autres facteurs que les androgènes dans la cancérogenèse prostatique.

Ces dernières années, les données de la littérature se sont intéressées au microenvironnement tumoral et au rôle que ce dernier pouvait jouer dans la cancérogenèse prostatique. Dans ce microenvironnement, de nombreux acteurs sont impliqués dont le stroma sous-jacent à la tumeur. En effet, il existe une communication étroite entre les cellules épithéliales tumorales et le stroma tumoral favorable au développement du cancer en dépit de l'absence d'androgènes. *La connaissance de ces interactions et leur ciblage pourraient à long terme, permettre l'élaboration de thérapies nouvelles et efficaces pour le traitement de ces cancers.*

I. La prostate humaine

A. Anatomie générale

La prostate est un organe situé sous la vessie, au croisement des voies génitales et urinaires, en arrière de la symphyse pubienne et en avant du rectum entourant l'urètre sur 3 cm. Elle constitue la glande exocrine la plus volumineuse de l'appareil reproducteur masculin mesurant en moyenne 3 cm de haut, 4 cm de large, 2 cm de profondeur et pesant environ 20 g chez un adulte jeune. Avec les vésicules séminales, la prostate joue un rôle essentiel dans la synthèse et l'émission du liquide spermatique appelé le plasma séminal. Sa face postérieure ou dorsale est parcourue par un sillon médian séparant 2 lobes, parfaitement palpable lors d'un toucher rectal (Figure 1). Sa partie supérieure ou apex est contre la vessie et elle est étroitement intriquée avec les deux sphincters qui assurent une bonne continence urinaire. L'essentiel de la prostate est constitué de glandes et est entouré par une pseudo-capsule appelée capsule de Gleason composée d'une couche interne musculaire lisse et d'une couche externe de collagène (Ayala *et al.*, 1989).

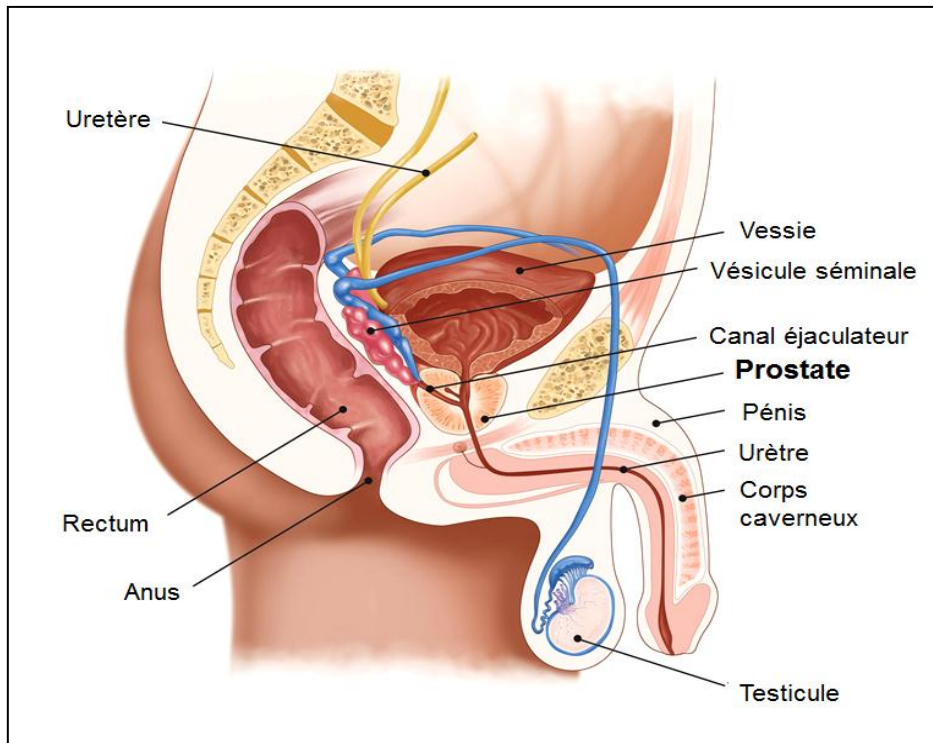


Figure 1 : Schéma représentant la localisation de la prostate au sein de la sphère uro-génitale chez l'homme en coupe sagittale (<http://www.allo-medecins.fr/actualite/cancer/11042014,prostate-le-cancer-soigne-par-ultrasons,321.html>)

Au siècle dernier, les anatomistes décrivaient la prostate en se basant sur les lobes la constituant (Lowsley, 1915; Franks, 1953), le problème étant que ces lobes n'étaient pas perceptibles à l'âge adulte chez l'homme. Ainsi, en 1968, les travaux de McNeal (McNeal, 1968; McNeal, 1981) sur l'anatomie normale et pathologique de la prostate ont permis de définir un nouveau modèle descriptif ne se basant plus sur les lobes prostatiques mais sur **4** zones anatomiques bien distinctes les unes des autres :

- 3 zones constituées de tissu glandulaire tubulo-alvéolaire participant à la sécrétion du liquide spermatique :
 - La **zone périphérique** est composée de tissu sécrétoire et représente plus de 70% de la prostate glandulaire. Elle s'étend postéro-latéralement autour de la glande, de l'apex à la base et constitue le principal lieu de développement des carcinomes prostatiques (plus de 70%) (McNeal *et al.*, 1988; Greene *et al.*, 1995).
 - La **zone centrale** représente 25 % de la prostate glandulaire. Elle entoure les canaux éjaculateurs et constitue la majorité de la base de la prostate.
 - La **zone de transition** ou **zone pré-prostatique** regroupant 5 % de la masse glandulaire est constitué de deux petits lobules qui jouxtent l'urètre prostatique et représentent la région d'où émanent les hyperplasies bénignes prostatiques (HBP).

- Une zone appelée le **stroma fibro-musculaire antérieur** qui représente la partie non glandulaire de la prostate et la moitié de son volume total. Cette zone est essentiellement constituée de fibres musculaires lisses utiles au déclenchement de la miction.

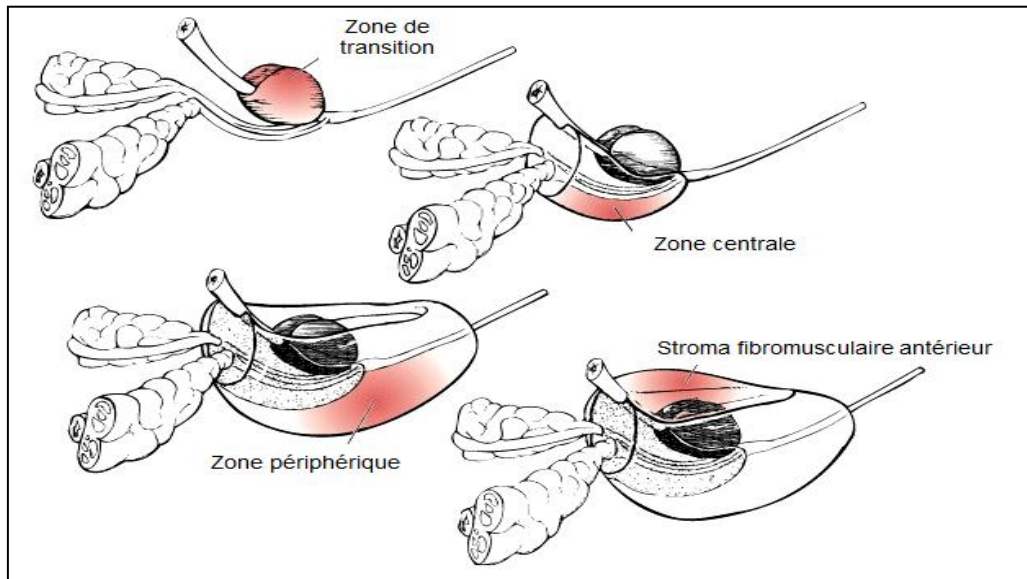


Figure 2 : Anatomie zonale de la prostate selon McNeal : les 3 zones glandulaires (transition, centrale et périphérique) et le stroma fibro-musculaire antérieur. D'après (W.K. Oh *et al.*, 2003).

B. Histologie

Le tissu prostatique humain est composé de deux compartiments histologiques principaux séparés par une membrane basale : le stroma fibromusculaire et le tissu glandulaire constituant un épithélium pseudo-stratifié (épithélium prostatique). Ce dernier est organisé en unités fonctionnelles sécrétoires appelées les acini.

1. Le tissu glandulaire

Le tissu glandulaire de la prostate est formé par un épithélium pseudo-stratifié organisé en acini glandulaires (entre trente et cinquante) eux-mêmes composés de deux couches cellulaires histologiquement distinctes : la couche luminale sécrétrice composée de grandes cellules épithéliales cylindriques et la couche basale principalement composée de cellules épithéliales cubiques. Ces deux couches sont séparées du stroma par la membrane basale. Dans ces différentes strates sont disposés trois types cellulaires principaux : les cellules luminales (apicales), intermédiaires et basales ainsi qu'un type cellulaire moins fréquent, nommé cellule neuroendocrine (NE) (Figure 3).

- Les **cellules basales**, reposant sur la membrane basale, constitueraient un compartiment prolifératif pour l'épithélium prostatique (Bonkhoff *et al.*, 1994; Huss *et al.*, 2004). En effet,

selon Isaacs and Coffey (Isaacs et Coffey, 1989), la couche basale contient une population de cellules souches qui, suivant la mitose, se diviserait de manière asymétrique donnant naissance à deux sous-classes cellulaires. Ces deux classes sont : (1) une cellule souche similaire à la cellule mère au potentiel de division illimité servant d'auto-renouvellement et (2) une cellule fille progénitrice multipotente appelée « transit-amplifying cell » avec un potentiel de division limité mais avec un taux de prolifération très élevé (Potten et Lajtha, 1982). Par exemple, pour dix divisions consécutives, une « transit amplifying cell » est capable d'amplifier jusqu'à mille fois le nombre de cellules totales expliquant pourquoi le phénotype de cellule souche est minoritaire dans la prostate glandulaire (Uzgaré *et al.*, 2004). Ainsi, en réponse à différentes stimulations comme les androgènes, les “transit amplifying cells” sont capables d'acquérir un phénotype de “cellules intermédiaires” (voir ci-dessous), où ces cellules migrent de la couche basale vers la couche apicale en se différenciant progressivement vers un phénotype de cellule luminale quiescente. Ces différentes étapes permettent ainsi à la couche basale prostatique de renouveler la couche cellulaire apicale. Les cellules basales (souches et progénitrices) sont androgéno-indépendantes et n'expriment pas ou très faiblement le récepteur aux androgènes (AR) (Bonkhoff *et al.*, 1994; van Leenders et Schalken, 2003). De plus, elles expriment de nombreux marqueurs spécifiques tels que les cytokératines (CK) 5 et 14, principaux marqueurs des cellules basales ainsi qu'un marqueur

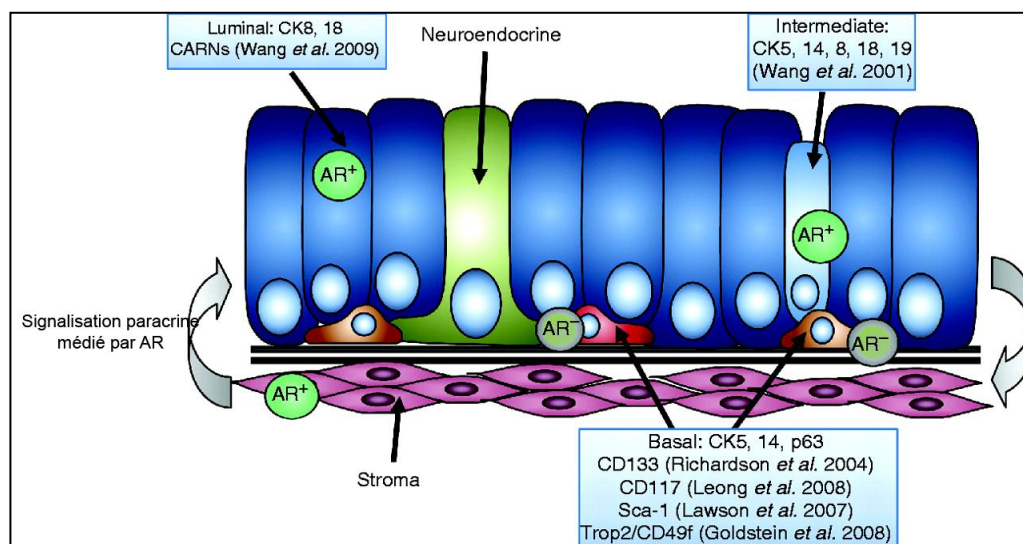


Figure 3 : Représentation schématique du tissu prostatique humain, les différentes cellules épithéliales du tissu glandulaire (basale, intermédiaire et luminale) étant caractérisées par la présence de plusieurs marqueurs moléculaires, en particulier des cytokératines (CK) ainsi que par la présence ou non du récepteur aux androgènes, AR. Ce tissu glandulaire est en étroite collaboration avec le stroma fibromusculaire sous-jacent, les 2 compartiments étant séparés par une membrane basale. D'après (Taylor *et al.*, 2010).

de surface cellulaire, CD44 (Sherwood *et al.*, 1990; Nagle *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997), l'intégrine $\alpha 2$ (Collins *et al.*, 2001), la protéine anti-apoptotique Bcl-2

(Hockenbery *et al.*, 1991; McDonnell *et al.*, 1992; Colombel *et al.*, 1993), le récepteur membranaire de l'HGF : c-MET (Gmyrek *et al.*, 2001; van Leenders *et al.*, 2002), le récepteur de l'EGF, HER-2 (human EGF epidermal growth factor) (van Leenders *et al.*, 2002) ou encore p63, un homologue du gène suppresseur de tumeur p53 (Signoretti *et al.*, 2000; Signoretti et Loda, 2007).

- Les **cellules lumineales (ou apicales) sécrétrices** sont des cellules androgéno-dépendantes, c'est à dire des cellules qui nécessitent la présence d'androgènes pour leur survie, leur différenciation et leur sécrétion. Elles composent la couche principale de l'épithélium prostatique (apicale) et sont responsables, sous la dépendance des androgènes (Wernert *et al.*, 1986), de la production et de la sécrétion dans la lumière des acinis, des composants du plasma séminal : le prostate specific antigen (PSA), le prostatic acid phosphatase (PAP) ainsi que la kallikréine-2 (McNeal, 1988; Rittenhouse *et al.*, 1998). Elles sont principalement caractérisées par l'expression du récepteur AR (Isaacs et Coffey, 1989; Masai *et al.*, 1990), des marqueurs CK8 et 18 ainsi que de CD57 (Sherwood *et al.*, 1990; Sherwood *et al.*, 1991; Okada *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1997), le prostate specific membrane antigen (PSMA) (Liu *et al.*, 1997), et sécrètent de l'endotheline-1 (ET-1) (Christiansen *et al.*, 2003) ainsi que du vascular endothelial growth factor (VEGF) (Joseph *et al.*, 1997). Contrairement aux cellules basales et intermédiaires, les cellules lumineales sont quiescentes ; ces cellules exprimant l'inhibiteur de kinase cycline-dépendant p27^{Kip1} (Bonkhoff *et al.*, 1994; De Marzo *et al.*, 1998) et seraient renouvelées par différenciation de cellules intermédiaires.

Dans la prostate humaine le ratio cellules basales/cellules lumineales est d'environ 1:1 contrairement à d'autres espèces comme la souris, le rat, le chien ou le singe où les cellules lumineales sont largement majoritaires avec un ratio cellules basales/ cellules lumineales de 1:7 (El-Alfy *et al.*, 2000).

-Les **cellules intermédiaires** sont une population de cellules hétérogènes qui exprime simultanément une combinaison de marqueurs communs aux cellules épithéliales basales (CK5/14) et lumineales (CK8/18) et sont présentes dans les 2 couches cellulaires (Bonkhoff, 1996; De Marzo *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Uzgare *et al.*, 2004; Signoretti et Loda, 2007). Comme décrit plus haut, ces cellules seraient issues des cellules progénitrices de la couche basale (« transient-amplifying cells ») et permettraient le renouvellement de la couche apicale par une différenciation progressive qui expliquerait la co-expression des marqueurs basaux et apicaux. Comme cette différenciation se ferait en plusieurs étapes, il existe de nombreux phénotypes de cellules intermédiaires exprimant ou non le récepteur AR, p63, cMET... en fonction de leur ascension entre les deux couches cellulaires épithéliales (van

Leenders *et al.*, 2002). Les cellules intermédiaires sont particulièrement intéressantes car de par leur plasticité, elles possèdent le phénotype le plus proche des cellules cancéreuses épithéliales prostatiques (Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006).

-Les **cellules neuroendocrines (NE)** forment une catégorie de cellules particulières présentes dans de nombreux tissus dont le tissu prostatique. Elles sont disséminées dans les différentes strates épithéliales apicales et basales mais également au sein du stroma prostatique. Ces cellules sont minoritaires et ne représentent que 0.5 à 2% du tissu prostatique humain (Aumuller *et al.*, 2001) avec une fréquence plus importante dans les zones de transition et périphérique que dans la zone centrale (Santamaria *et al.*, 2002). Les origines de ces cellules sont controversées, ces cellules étant soit dérivées des cellules intermédiaires (Bonkhoff, 1998) soit dérivées directement des crêtes neurales (Aumuller *et al.*, 1999). Ces cellules différenciées sont dénuées d'activité proliférative et sont androgéno-indépendantes n'exprimant pas AR, ni Ki67 (Li *et al.*, 2016). Elles possèdent des extrémités dendritiques similaires à celles trouvées dans les neurones et expriment plusieurs marqueurs spécifiques tels que la chromogranine A (Huttner *et al.*, 1991), la synaptophysine, la NSE (Neuron Specific Enolase) (Schmechel *et al.*, 1978) ou encore CD56 utilisés couramment en clinique pour les identifier (Parimi *et al.*, 2014). En réponse à différents stimuli provenant des extrémités nerveuses, des vaisseaux sanguins avoisinants ou du stroma sous-jacent, les cellules NE sécrètent à partir de granules de sécrétion, de nombreuses neurohormones peptidiques telles que l'histamine, la calcitonine, la sérotonine, la somatostatine, la bombésine, le neuropeptide Y, le vasoactive intestinal peptide (VIP), la parathyroid hormone-related protein (PTHrP), la cholecystokinine, l'adrénomédulline mais également des facteurs de croissance comme le VEGF ou le NGF (nerve growth factor) (Long *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016). Ainsi, au travers de ces substances libérées, les cellules NE participent au maintien de l'homéostasie prostatique en régulant par des mécanismes endocrines, autocrines et paracrines, l'activité, la survie et la différenciation des cellules épithéliales prostatiques avoisinantes (Gkonos *et al.*, 1995; Abrahamsson, 1999; Sciarra *et al.*, 2003).

-Les **cellules souches** résideraient dans la couche cellulaire basale comme décrit ci-dessus étant soit des cellules basales pures soit des cellules intermédiaires et ont la capacité de s'auto-renouveler tout en donnant d'autres types cellulaires suivant leur division asymétrique. Ces cellules expriment de nombreux marqueurs tels que : Sca-1 (stem cell antigen-1), ALDH, CD133, CD117, Trop-2 et CD44 (Liu *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2004; Burger *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 2007; Tsujimura *et al.*, 2007; Goldstein *et al.*, 2008;

Leong *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2010). Le profil de différenciation de ces cellules souches reste toutefois controversé et plusieurs modèles ont été développés. Le premier concerne un modèle linéaire où une cellule souche basale donnerait naissance à une cellule progénitrice se différenciant après un certain nombre de divisions en cellule intermédiaire puis en cellule luminaire sécrétrice ou en cellule neuroendocrine. Le deuxième concerne un modèle de différenciation bidirectionnel où une cellule intermédiaire souche pourrait se différencier directement en cellule neuroendocrine ainsi qu'en deux cellules progénitrices spécifiques d'une lignée basale ou luminale. Enfin, quelques rares cellules lumineuses sont androgéno-indépendantes et peuvent également constituer des cellules souches. C'est le cas des CARNs (castrate-resistant Nkx3-1-expressing cells), des cellules transfectées de manière stable avec un gène codant pour Nkx3-1 permettant de les marquer et de faire des études de lignage cellulaire. Ces cellules ont été montrées capables de s'auto-renouveler *in vivo* et de régénérer le tissu prostatique (Wang *et al.*, 2009).

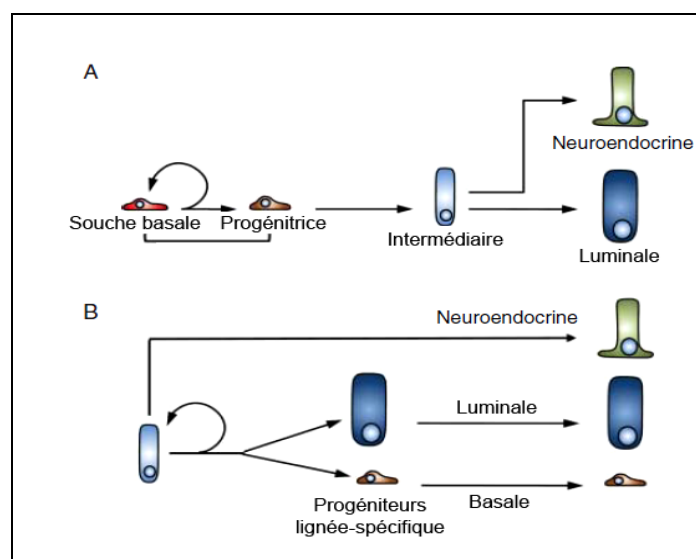


Figure 4 : Représentation schématique des 2 principaux modèles de lignage des cellules épithéliales prostatiques humaine. (A) Modèle linéaire. (B) Modèle de différenciation bidirectionnelle. D'après (Taylor *et al.*, 2010).

2. Le stroma

Le stroma de la prostate humaine saine est un compartiment assurant le support mécanique de la prostate glandulaire. Il comprend de nombreux types cellulaires organisés de manière hétérogène dont : des cellules musculaires lisses dérivées du sinus urogénital mésenchymateux embryonnaire, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires, des péricytes, des nerfs ainsi que des lymphocytes infiltrants et des macrophages. Ce stroma est également composé de matrice extracellulaire riche en fibres de collagène et en laminine (Barron et Rowley, 2012).

Les cellules musculaires lisses forment le type cellulaire le plus abondant du stroma prostatique et ont un rôle essentiel en intervenant dans la contraction servant à la sécrétion du plasma prostatique lors de l'éjaculation ainsi qu'à la régulation du débit sanguin dans la prostate lorsqu'elles entourent l'endothélium. De plus, elles participent activement au développement de la prostate et au maintien de l'homéostasie de la glande prostatique. En effet, dès le développement embryonnaire, les interactions entre les cellules épithéliales dérivées du sinus urogénital endodermique et les cellules musculaires lisses dérivées du sinus urogénital mésenchymateux mésodermique assurent leur différenciation et leur développement mutuel sous l'influence des androgènes. Ainsi, il existe une interdépendance entre les deux compartiments cellulaires essentielle au bon développement prostatique par l'intermédiaire d'une voie paracrine (Cunha *et al.*, 2002) . Dans la prostate adulte, le stroma est finement régulé par les androgènes et les œstrogènes. En effet, en réponse à ces derniers, les cellules stromales exprimant le récepteur aux androgènes (AR) sécrètent des facteurs solubles appelés les andromédines. Elles comprennent : le fibroblast growth factor (FGF), l'insulin-like growth factor (IGF), l'epidermal growth factor (EGF), le transforming growth factor β (TGF β), Wnt, le vascular endothelial growth factor (VEGF) ou encore l'hepatocyte growth factor (HGF). Ces andromédines vont diffuser à travers la membrane basale afin de réguler la croissance, la mort et la différenciation cellulaire épithéliale et endothéliale (Hayward *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1992; Halin *et al.*, 2007; Taylor et Risbridger, 2008; Jennbacken *et al.*, 2009; Niu et Xia, 2009) . Il en est de même pour les cellules stromales

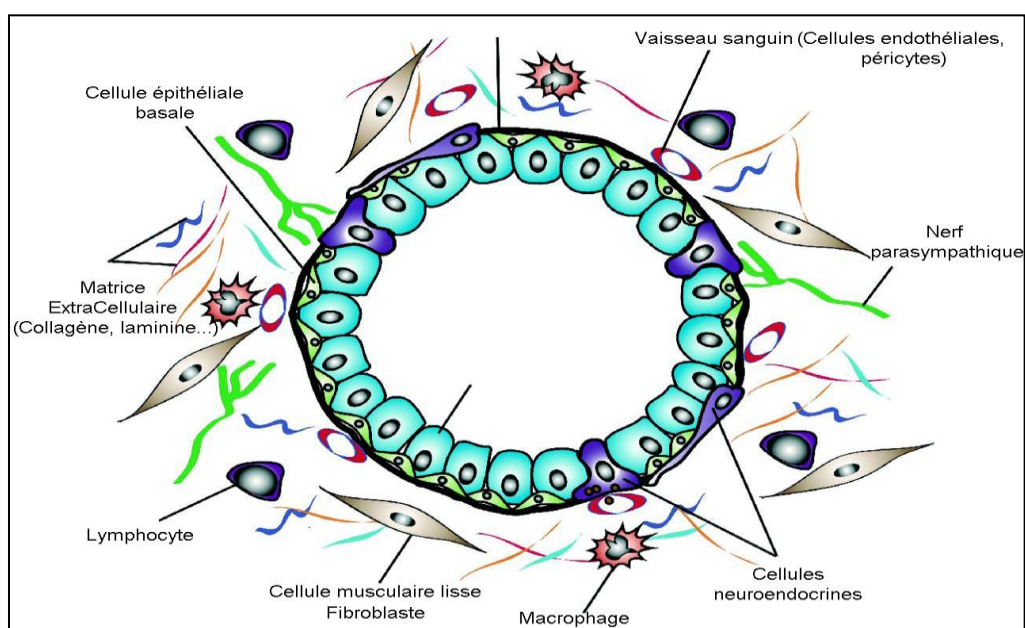


Figure 5 : Le stroma fibro-musculaire prostatique. D'après (Rowley et Barron, 2012).

exprimant le récepteur aux œstrogènes α (ER α) (Cohen *et al.*, 1994; Nelles *et al.*, 2011). Ces données sont importantes car le stroma étant hétérogène dans sa composition et sa fonction, l'action des androgènes sera différente selon la localisation des cellules stromales. Ainsi, les concentrations en andromédines vont déterminer indirectement la dépendance des cellules épithéliales aux androgènes. Par exemple, les cellules épithéliales luminales présentes dans les canaux adjacents à l'urètre sont protégées de l'apoptose normalement induite par la castration grâce aux cellules stromales avoisinantes qui sécrètent constitutivement une forte concentration du ligand Wnt (Li *et al.*, 2008; Placencio *et al.*, 2008). Au contraire, les cellules luminales situées dans des parties plus distales sont plus facilement sujettes à l'apoptose induite par le TGF β sécrété par les cellules stromales adjacentes.

Ainsi, une altération de la concentration en androgènes et œstrogènes ainsi que du dialogue stroma-épithélium peut hautement affecter l'homéostasie de la prostate et favoriser les pathologies de cet organe.

Enfin, selon les différentes zones de la prostate humaine, des études ont montré que les cellules stromales possédaient des différences d'expression génique (van der Heul-Nieuwenhuijsen *et al.*, 2006), ce qui pourrait expliquer pourquoi les cancers ont tendance à davantage apparaître dans la zone périphérique que dans la zone de transition de la prostate (Shaikhibrahim *et al.*, 2012).

C. Rôles physiologiques

1. Rôle mécanique

La prostate qui entoure l'urètre possède deux sphincters au niveau de ses extrémités qui interviennent à la fois dans la miction (action d'uriner) et l'éjaculation. :

Un sphincter supérieur intégré dans la vessie constitué de fibres musculaires lisses associées au système nerveux parasympathique (involontaire). Ce sphincter est appelé **sphincter proximal** ou col vésical et sa contraction permanente empêche l'urine de s'écouler et permet d'assurer la continence de même qu'empêcher l'éjaculation rétrograde dans la vessie.

Un sphincter inférieur appelé **sphincter distal** et constitué de fibres musculaires striées associées au système nerveux orthosympathique responsable de l'acte volontaire de miction ainsi que de l'éjaculation par relâchement du sphincter.

Ainsi, par l'intermédiaire de leurs innervations réciproques, les sphincters vont se coordonner dans des séquences de contraction/ relâchement pour permettre les processus de miction et d'éjaculation.

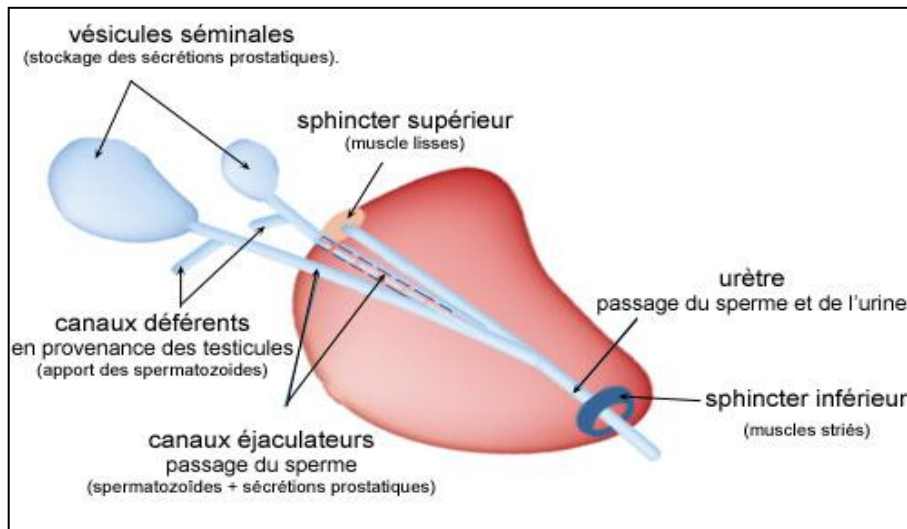


Figure 6 : Schéma illustrant les fonctions mécaniques de la prostate dont les sphincters intervenant dans les phénomènes d'éjaculation et de miction. <http://www.prostate.fr/prostate/generalites/>

2. Rôle sécrétoire

La prostate a un rôle essentiel dans la formation du sperme. En effet, le sperme est constitué des spermatozoïdes d'origine testiculaire qui ont maturés dans l'épididyme mais également de diverses sécrétions fournies par les glandes annexes que sont les ampoules déférentielles, les vésicules séminales et la prostate. Ces sécrétions représentent la majorité du sperme éjaculé et vont être dénommé **plasma séminal**, les spermatozoïdes ne représentant que 10% de la fraction de l'éjaculat final. Ce plasma séminal n'est pas essentiel pour la fertilisation de l'ovule mais a de nombreux rôles qui favorisent grandement la fécondation. En effet, avant d'arriver au niveau de la prostate, les vésicules séminales vont sécréter : (1) du fructose fournissant l'énergie essentielle aux spermatozoïdes éjaculés ; (2) des prostaglandines qui vont stimuler les contractions des tractus génitaux masculins et féminins et contribuer au cheminement des spermatozoïdes ; (3) sécréter du fibrinogène, précurseur de la fibrine, agent coagulant.

La prostate va alors compléter cette composition en sécrétant :

- des électrolytes et des sels minéraux dont le magnésium et le zinc qui vont permettre de tamponner le plasma séminal (pH : 7,2-7,8) de manière à neutraliser l'acidité des sécrétions vaginales et améliorer la viabilité des spermatozoïdes mais qui vont également avoir un rôle anti-bactérien.
- de l'acide citrique liant les ions métalliques.
- de la spermine et de la spermidine qui donnent son odeur au sperme et ont un rôle anti-bactérien.

- du cholestérol et des phospholipides dont le ratio permettrait de stabiliser les spermatozoïdes face à la température et aux chocs environnementaux.
- des enzymes qui vont transformer le fibrinogène en fibrine permettant la coagulation du sperme et empêchant son élimination lors du retrait du pénis hors du vagin.
- de la fibrinolysine, séminine et urokinase ainsi que la phosphatase acide, de la prostatic acid phosphatase (PAP) et du prostatic specific antigen (PSA) qui participent à la fluidification du sperme libérant les spermatozoïdes mobiles dans le tractus génital féminin.

Le PSA, participant à la liquéfaction du liquide séminal, est une sérine protéase membre de la famille des kallikréines, de 33-34 KDa, qui est produite à la fois par les cellules épithéliales luminales saines mais également par les cellules tumorales prostatiques. Lors d'une perturbation de l'architecture prostatique comme durant le cancer, il y a une libération importante de PSA dans le sang permettant un éventuel dosage de l'antigène. En effet, depuis son approbation par l'US Food and Drug Administration (FDA) il y a 25 ans, le dosage de la PSA sérique est utilisée comme le premier outil de criblage de la maladie. Cependant, depuis quelques années, le dosage de la PSA a montré ses limites, entraînant de nombreux faux positifs et faux négatifs menant à des biopsies qui n'étaient pas nécessaires. Ainsi, son dosage est toujours associé à des méthodes diagnostiques et pronostiques complémentaires qui seront décrites par la suite dans ce mémoire.

D. Régulation androgénique de la prostate

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes qui jouent un rôle majeur dans l'homéostasie prostatique. En effet, ces hormones favorisent la prolifération, la différenciation et la survie des cellules prostatiques. La testostérone, est le principal androgène circulant chez l'homme. Elle est majoritairement produite par les cellules de Leydig du testicule (plus de 95%), le reste étant synthétisé par la surrénale et très faiblement par le cerveau (King *et al.*, 2002). Une fois sécrétée dans le plasma, la testostérone va atteindre ses organes cibles en circulant soit sous forme libre (2%) soit liée à des protéines de transport comme la TeBG (testosterone binding-globulin), la SHBG (sex hormone binding globulin) (45-75%) ou encore l'albumine (30 à 55%) (Dunn *et al.*, 1981; Rosner, 1991).

Au niveau de la prostate, la testostérone dérivée du cholestérol va diffuser librement à travers les membranes des cellules épithéliales basales de par ses propriétés hydrophobes afin d'être converti en 5 α -dihydrotestostérone (DHT) ainsi qu'en 17- β -œstradiol (E₂). Cette conversion est réalisée par les 5 α -réductases de type I et II qui sont exprimées par les cellules épithéliales basales (et apicales) mais pas par les cellules stromales (Bonkhoff *et al.*, 1996). Ainsi, une fois formée, la DHT diffuse vers les cellules luminales sécrétrices ainsi que vers les cellules

musculaires lisses et fibroblastes du compartiment stromal afin d'assurer ses effets principalement génomiques.

1. Mode d'action des androgènes

Les androgènes sont connus pour exercer leurs effets biologiques principalement par une voie génomique mais également par une voie non génomique où la latence sur les effets induits par les hormones stéroïdiennes est plus rapide.

-Les **effets génomiques** passent par la fixation des androgènes (testostérone et DHT) sur leur récepteur réceptif AR présent dans le cytoplasme des cellules cibles, la 5 α -DHT ayant une affinité 10 fois plus importante pour le récepteur que la testostérone. La liaison hormone-récepteur conduit alors à la dissociation des protéines chaperons (heat shock protein : HSP) qui stabilisait le récepteur dans une conformation favorable. Cette étape est suivie d'une phosphorylation et d'un changement de configuration allostérique du récepteur (Lefstin et Yamamoto, 1998) permettant sa dimérisation et sa translocation vers le noyau. Une fois arrivé au noyau, le récepteur nucléaire se fixe sur des séquences spécifiques de l'ADN, appelées éléments de réponse aux androgènes (androgen response elements ou AREs) (Sheridan *et al.*, 1979; Chang *et al.*, 1995) et agit comme un facteur de transcription afin de réguler l'expression des gènes cibles. Ces gènes codent alors pour des protéines favorisant la survie et le maintien de la différenciation des cellules épithéliales luminales mais également des andromédines produites et sécrétées par les cellules stromales.

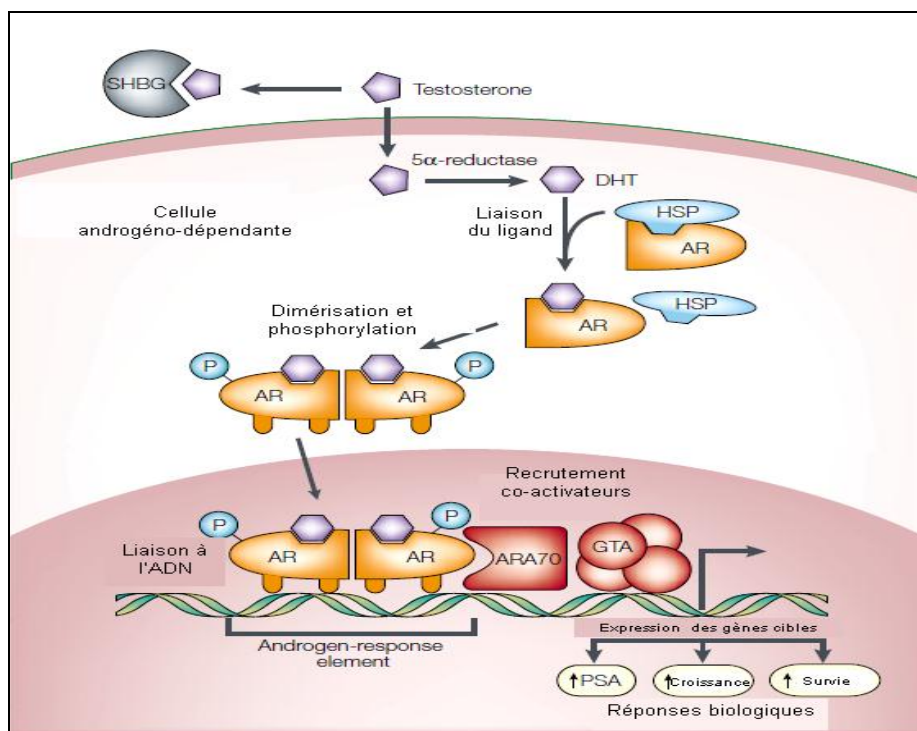


Figure 7 : Schéma simplifié du mécanisme d'activation du récepteur AR suivant la fixation de la DHT induisant les effets génomiques des androgènes. D'après (Feldman et Feldman, 2001).

- Contrairement aux effets génomiques bien connus, les **voies d'action non génomique** ne font pas intervenir la transcription des gènes cibles comme décrit ci-dessus mais consiste en des interactions multiples et directes des androgènes avec de nombreux acteurs cellulaires. Au travers de cette voie alternative d'activation cellulaire, la latence de production des effets biologiques est beaucoup plus rapide (secondes ou minutes) que celle obtenue suite à l'activation de AR (30-60 min) (Cato *et al.*, 2002). Décrites pour la première fois dans les années 70 par Pietras et Szego (Pietras et Szego, 1977), les hormones stéroïdiennes ont été caractérisées pour agir directement sur les canaux membranaires ioniques (Guo *et al.*, 2002) ainsi que des récepteurs et différents acteurs des voies de signalisation intracellulaire (Simoncini et Genazzani, 2003). Ainsi, ces voies de signalisation directes non génomiques introduisent un concept important d'action cellulaire des stéroïdes. En effet, ce concept est souvent oublié et peut être fondamental dans la physiopathologie prostatique.

2. Effets des androgènes sur la prostate saine

Une fois libérés dans la prostate, les androgènes vont agir sur l'épithélium et le stroma prostatique et finement réguler les interactions réciproques entre les 2 compartiments principalement par la voie génomique de manière à assurer l'homéostasie prostatique.

Dans un premier temps, les androgènes comme la DHT vont agir directement sur le compartiment stromal et favoriser la production et la sécrétion des andromédines (facteurs de croissance androgéno-dépendants) ainsi que la répression du TGF β 1 (Kyprianou et Isaacs, 1989; Wikstrom *et al.*, 1999) par les cellules musculaires lisses. Ces régulations vont permettre d'assurer la survie des cellules luminales (sous-régulation des récepteurs au TGF β) en réprimant la voie apoptotique (Martikainen *et al.*, 1990) ainsi que la prolifération des cellules épithéliales progénitrices (transit-amplifying cells) et intermédiaires (Cunha *et al.*, 1987; Hayward *et al.*, 1992; Kurita *et al.*, 2001).

Dans un deuxième temps, les androgènes vont directement agir sur le tissu glandulaire. En effet, la DHT va inhiber la prolifération des cellules intermédiaires qui expriment AR normalement induite par les andromédines. Cela va permettre leur différenciation vers un phénotype de cellule luminale sécrétrice (Geck *et al.*, 1997; Ling *et al.*, 2001; Whitacre *et al.*, 2002). De plus, la DHT va permettre le maintien de la différenciation des cellules luminales sécrétrices par régulation de l'expression de nombreux marqueurs : prostatic specific acid phosphatase, PSA, hKh2, PSCA, NKX3.1 et PSMA (Schuur *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 2000; Ornstein *et al.*, 2001; Watt *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2002; Watabe *et al.*, 2002; Zelivianski *et al.*, 2002) ainsi que de plusieurs facteurs solubles comme le VEGF (Joseph *et al.*, 1997) assurant la survie des cellules endothéliales et le TGF β 1 qui maintient à son tour la

différenciation des cellules musculaires lisses dans le stroma prostatique (Peehl et Sellers, 1997).

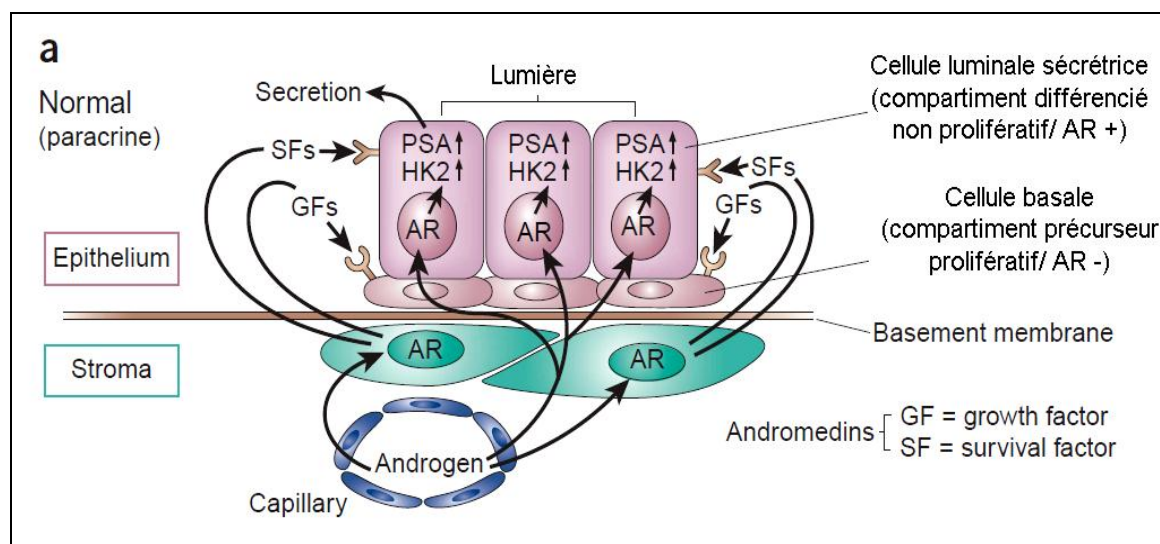


Figure 8 : Interactions épithélio-stromales dans la prostate humaine normale assurées par les andromédines. D'après (Isaacs et Isaacs, 2004).

II. Pathologies de la prostate humaine

Comme les autres organes, la prostate peut être soumise à différents stress ou sujette à des mutations conduisant à des altérations de son homéostasie tissulaire ainsi que de sa physiologie. Ces altérations résultent en un certain nombre de pathologies dont les plus connues sont : la prostatite, l'adénome ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP) et l'adénocarcinome (cancer de la prostate).

A. La prostatite

La prostatite est une inflammation de la prostate qui touche le plus souvent des hommes jeunes et qui est principalement liée à une infection bactérienne sexuellement transmissible. On distingue 2 types de prostatite : la prostatite chronique et la prostatite aiguë. La prostatite aiguë est principalement due à une infection par *E. Coli* et va entraîner de nombreux symptômes tels qu'une fièvre élevée et différents troubles urinaires. La prostatite chronique va entraîner des poussées infectieuses récurrentes où les symptômes vont s'aggraver (douleur du périnée, écoulement urétral, douleurs à l'éjaculation...). La prostatite chronique est souvent due à une prostatite aiguë mal soignée mais peut être aussi causée par un adénome de la prostate qui rétrécit l'urètre ainsi qu'à des calculs urinaires. Afin de traiter la prostatite, les germes responsables sont identifiés par un examen cyto bactériologique puis ciblés à plus ou moins long terme selon la gravité des symptômes par des antibiotiques (Zerbib et Conquy, 2001).

B. L'adénome prostatique ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate

Après un certain âge, les hommes peuvent développer une augmentation du volume prostatique au niveau de la zone de transition qui entoure l'urètre. Ce grossissement de la prostate correspond à une tumeur bénigne ou adénome appelé couramment hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) dont l'incidence augmente avec l'espérance de vie. On considère que plus de 50 % des hommes de plus de 60 ans sont concernés. L'hyperplasie (qui est une prolifération anormale des cellules normales composant un tissu ou un organe) concerne principalement les cellules épithéliales de la zone de transition. Cependant, elle concerne également les fibroblastes et les cellules musculaires lisses adjacentes qui par leur contraction participent à la difficulté d'uriner. On ne connaît pas les causes exactes de l'HBP mais cette dernière serait principalement due aux diminutions de la concentration en DHT liée à l'âge (Sanda *et al.*, 1994; Gillenwater *et al.*, 2001). Lorsque l'hyperplasie est suffisamment importante avec une prostate qui devient trop volumineuse, la prostate peut comprimer la vessie et étrangler l'urètre. Cela a pour conséquence d'obstruer partiellement la vessie et entraîne de nombreux troubles urinaires : mictions de faible volume qui sont plus fréquentes ainsi que des douleurs et des infections causées par les rétentions d'urine dans la vessie... Les manifestations cliniques sont extrêmement variables d'un individu à l'autre, L'HBP pouvant être totalement asymptomatique malgré un volume important de la prostate ou à l'inverse, impacter fortement sur la qualité de vie des personnes concernées. Ainsi, selon la sévérité des symptômes et les possibilités de complications, les traitements prodigués aux patients sont multiples. Ils consistent en l'utilisation d'alpha-bloquants qui permettent de détendre les muscles lisses de la prostate et du col de la vessie jusqu'à la chirurgie consistant à retirer la prostate : la prostatectomie.

L'HBP n'augmente pas le risque de développer le cancer de la prostate, les 2 pathologies pouvant coexister chez un même patient (Birnie *et al.*, 2008).

C. L'adénocarcinome de la prostate

Le cancer est une pathologie complexe et évolutive qui consiste en une prolifération anarchique et incontrôlée de cellules anormales composant un tissu devenant progressivement tumoral et formant une tumeur maligne. On parle d'adénocarcinome lorsque le cancer concerne des cellules épithéliales glandulaires comme c'est le cas pour la prostate. Dans de très rares cas, des tumeurs peuvent aussi apparaître dans le stroma fibromusculaire, on parle alors de sarcome stromal, léiomyosarcome ou encore de rhabdomyosarcome selon la nature des cellules atteintes (Vandenbos *et al.*, 2004).

A des stades plus ou moins avancés, les cellules tumorales, *via* les interactions avec leur environnement vont acquérir des capacités leur permettant d’infiltrer les tissus adjacents ainsi que d’emprunter la circulation sanguine ou lymphatique. Ces cellules vont alors former des tumeurs à distance appelées métastases et entraîner plus ou moins rapidement le décès de la personne concernée. Les cellules tumorales ont été décrites par Hanahan et Weinberg comme possédant des caractéristiques communes qu’ils ont nommé : « hallmarks of cancer » (Hanahan et Weinberg, 2000; Hanahan et Weinberg, 2011) et consistent en :

- (1) une instabilité génomique liée à des mutations et à des modifications épigénétiques,
 - (2) une prolifération anarchique et incontrôlée,
 - (3) une résistance à la mort cellulaire en particulier l’apoptose,
 - (4) une immortalité réplivative,
 - (5) la capacité à induire l’angiogénèse,
 - (5) un métabolisme énergétique altéré,
 - (6) un phénotype tumoral favorisé par l’inflammation,
 - (7) la capacité à leurrer le système immunitaire pour éviter leur destruction et enfin,
 - (8) un phénotype invasif augmentant la propension à former des métastases.
- Ainsi, de par sa complexité, son incidence et la mortalité qu’il entraîne, le cancer constitue un enjeu fondamental de notre société.

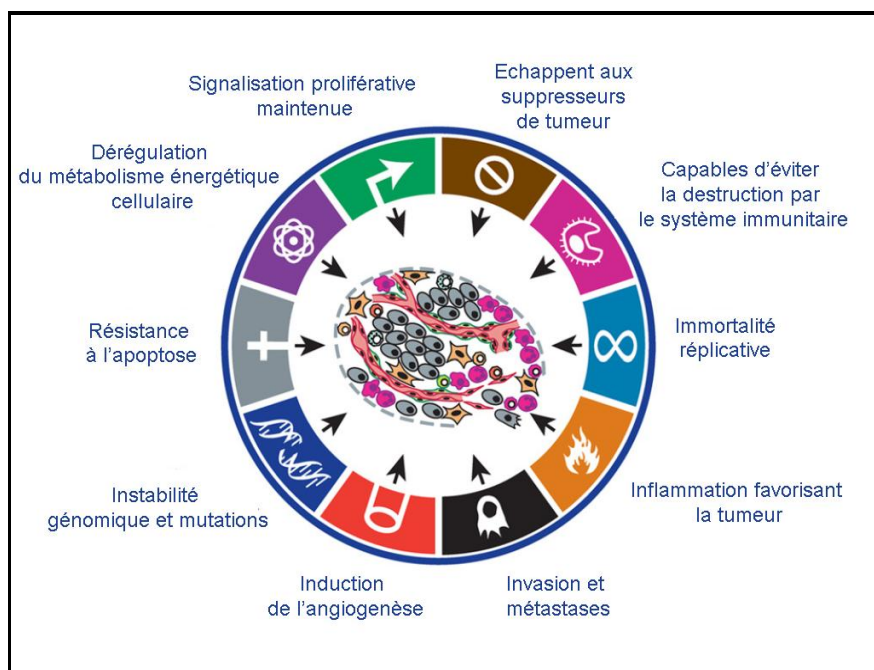


Figure 9 : Les “hallmarks of cancer” révisés d’Hanahan et Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2011).

1. Incidence et mortalité

Le cancer de la prostate est le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez l’homme après le cancer du poumon. En 2012, selon l’OMS, plus d’1.1 million d’hommes ont été diagnostiqués avec un

cancer de la prostate dans le monde. Il est essentiellement diagnostiqué dans les pays développés (plus de 70% des cas) où l'accessibilité aux soins est bien meilleure, son incidence étant la plus importante en Australie, Nouvelle Zélande, en Amérique du Nord et en Europe contrairement aux populations asiatiques où elle est relativement faible. En France, en 2011, avec 53.913 cas recensés, il représente le 1^{er} rang des cancers en terme de fréquence chez l'homme (34% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer) devant le cancer des poumons. Hormis les cas d'hérédités, l'incidence du cancer prostatique atteindrait son pic vers l'âge de 70 ans.

Avec 307.000 morts estimés en 2012, le cancer de la prostate représente la 5^{ème} cause de mortalité par cancer chez les hommes (6,6% du total des morts masculines) dans le monde, touchant davantage les populations africaines et Sud-Américaines et très peu les populations Asiatiques (voir figure 10). En 2011, le cancer de la prostate se situe au troisième rang des décès par cancer chez l'homme en France, avec moins de 9.000 morts derrière les cancers colorectal (9.200 décès) et pulmonaire (21.000 décès), ce dernier étant mieux pris en charge et diagnostiqué de plus en plus tôt (Ferlay *et al.*, 2013; Siegel *et al.*, 2015)(GLOBOCAN 2012).

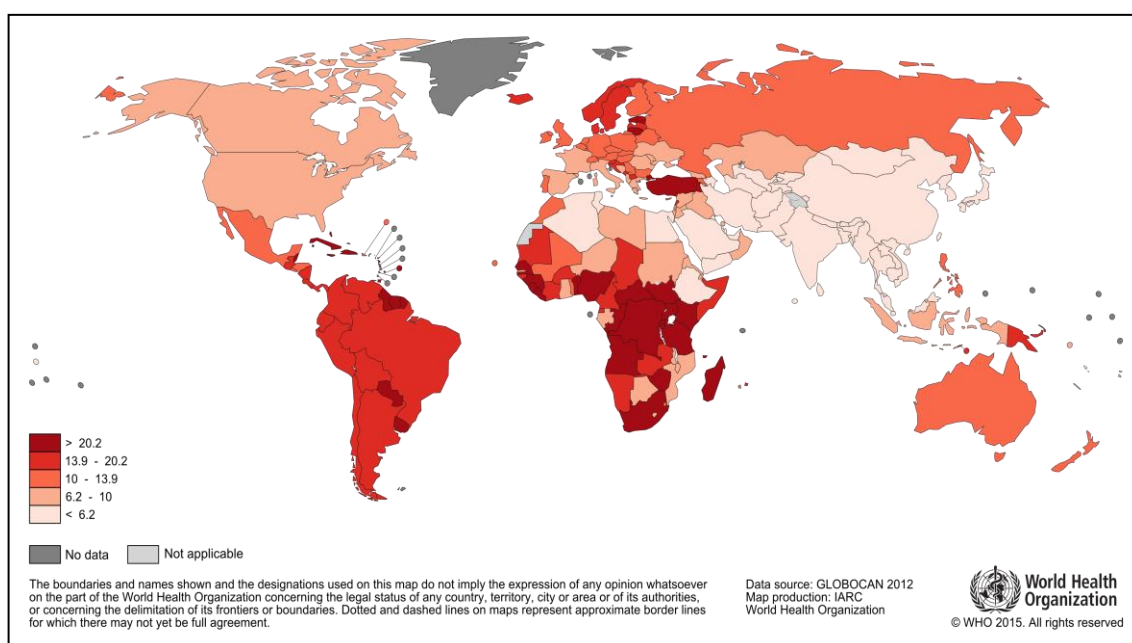


Figure 10 : Taux d'incidence/de mortalité standardisés sur la structure d'âge de la population mondiale, exprimés pour 100 000 personnes-années (GLOBOCAN 2012)

2. Initiation du cancer

Le cancer de la prostate se caractérise souvent par une altération des différents types de cellules composant le tissu glandulaire (Grisanzio et Signoretti, 2008) avec une prolifération massive et anarchique des cellules luminales et une perte de la couche cellulaire épithéliale basale (Brawer *et al.*, 1985). De même, une altération menant à la rupture de la membrane

basale (Barsky *et al.*, 1983; Shen et Abate-Shen, 2010) et des interactions réciproques avec un stroma « réactif » favorisent activement la tumorigenèse (Olumi *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2004; Berry *et al.*, 2008). Ainsi, il demeure important de comprendre comment ce cancer s'est mis en place afin de pouvoir le détecter précocement et améliorer les thérapies utilisées.

a. Causes

Les origines du cancer de la prostate sont encore mal comprises à l'heure actuelle pouvant être très différentes d'un individu à un autre et causées par de nombreux facteurs intervenants à la fois sur les cellules épithéliales mais également sur les cellules stromales et immunitaires. Ces facteurs induiraient un certain nombre d'événements au cours de la vie de l'individu qui mèneraient vers une réponse inflammatoire appelée « atrophie proliférative inflammatoire » (proliferative inflammatory atrophy, PIA) évoluant en lésions pré-cancéreuses appelées « néoplasie intraépithéliale prostatique » (prostatic intraepithelial neoplasia, PIN) elle-même initiant le cancer. Parmi ces facteurs, on recense comme principaux facteurs de risque :

- **L'âge** : plus de 65% des cancers sont diagnostiqués chez les hommes entre 55 et 75 ans alors que ce nombre est de seulement 10% chez les hommes de moins de 55 ans (Fleshner et Lawrentschuk, 2009). De nombreuses théories ont été développées afin d'expliquer ce lien. Par exemple, suivant le vieillissement, le nombre de fibroblastes sénescents augmente. Ces fibroblastes sont moins dépendants des androgènes et possèdent un sécrétome potentiellement capable de jouer un rôle dans l'initiation du cancer (Bavik *et al.*, 2006). De même, le taux de testostérone diminue au cours du vieillissement alors que le taux d'œstrogènes augmente pouvant altérer l'homéostasie tissulaire médié ou non par les andromédines.

- **Les prédispositions génétiques** : de nombreuses études ont montré que plusieurs gènes prédisposent au cancer de la prostate. Par exemple, les mutations de BRCA1 et BRCA2 connues pour affecter les cancers de l'ovaire et du sein augmentent le risque de développement du cancer de la prostate (van Asperen *et al.*, 2005; Leongamornlert *et al.*, 2012). Des mutations de Chk2 ont également montré être présentes à fréquence élevée chez les hommes ayant un cancer de la prostate héréditaire (Dong *et al.*, 2003). Enfin, plusieurs polymorphismes (SNP, Single Nucleotid Polymorphysm) concernant des gènes codant la réparation de l'ADN telle que PARP1, XRCC1 ou encore ATM (Park *et al.*, 2009) augmenteraient également le risque de provoquer un cancer de la prostate (CaP).

- **Les facteurs environnementaux** : dès notre naissance, nous sommes continuellement exposés à de nombreux facteurs présents dans notre environnement qui interagissent pour la plupart avec notre génome en induisant des mutations et des remaniements épigénétiques. Ces facteurs environnementaux sont également capables de moduler les voies de signalisation intracellulaire. Parmi ces facteurs, il y a les rayons UV du soleil, certains composés de la fumée de cigarette, les phtalates et perturbateurs endocrinien, notre alimentation... qui sont susceptibles de participer à l'apparition ou à l'aggravation de certaines pathologies comme le cancer. Par exemple, il a été montré que le Bisphénol A (BPA), perturbateur endocrinien présent dans les plastiques des bouteilles d'eau ou encore dans les canettes et la plupart des contenants alimentaires plastifiés, est capable d'induire la prolifération et la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Wetherill *et al.*, 2002; Derouiche *et al.*, 2013). De même, des études épidémiologiques ont montré une augmentation de l'incidence du CaP lorsque l'alimentation était essentiellement à base de viande rouge trop cuite (carbonisée) et dégageant des amines hétérocycliques (Norrish *et al.*, 1999). En effet, il a été montré chez les rats qu'un amine hétérocyclique : le 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP) induisait la formation de carcinomes prostatiques, intestinaux et mammaires (Sugimura *et al.*, 2004).

- **Les agents infectieux** : l'infection de la prostate par des organismes pathogènes peut également être à l'origine d'une réponse inflammatoire propice au développement du cancer. Par exemple, *Propionibacterium acnes*, une bactérie associée à l'acné a récemment été trouvée dans des tissus prostatiques présentant une inflammation (Cohen *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2015). En effet, l'infection de souris avec *P. acnes* a montré une stimulation de la néoplasie épithéliale accompagnée d'une inflammation et de changements moléculaires tels qu'une diminution de l'expression de NKX3.1 connue pour induire la quiescence cellulaire et de AR (Shinohara *et al.*, 2013).

b. Les lésions précancéreuses prostatiques : PIA et PIN

Les modèles actuels de carcinogenèse font part de l'existence d'un état « activé » précancéreux où durant la vie de l'individu, le tissu prostatique serait soumis à des dégâts cumulatifs induits en partie par les facteurs de risque cités précédemment. Ces altérations auraient lieu principalement dans la zone périphérique (la quasi-totalité des adénocarcinomes prostatiques se formant exclusivement dans cette zone) pour initier une réaction inflammatoire appelée atrophie inflammatoire proliférative (PIA). Cette PIA évoluerait alors en néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) bien que ce ne soit pas toujours le cas (De Marzo *et al.*, 2007). La PIA consiste en une prolifération très importante de cellules

épithéliales atrophiées du tissu glandulaire en réponse à l'inflammation chronique à laquelle est soumise la prostate dans un point focal de la zone périphérique (De Marzo *et al.*, 1999). De nombreuses études ont montré que les régions atrophiées ne présentaient pas d'anomalies génétiques particulières (Tomlins *et al.*, 2007) mais qu'il existait une expression importante de l'agent anti-apoptotique Bcl-2 et de la glutathione-S transférase P1 (GSTP1) qui code pour une protéine protégeant les cellules des radicaux libres (De Marzo *et al.*, 1999). De même, il a été observé dans les régions atrophiées, la répression de gènes suppresseurs de tumeurs bien connus du cancer de la prostate : PTEN, NKX3.1 et CDKN1B (Cyclin Dependant Kinase 1B) (Ruska *et al.*, 1998; Bethel *et al.*, 2006). De manière intéressante, ces gènes sont tous impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et leur répression explique la prolifération anarchique des cellules atrophiées. A l'heure actuelle, bien que la PIA apparaisse dans des zones similaires à celles des néoplasies (De Marzo *et al.*, 1999; Putzi et De Marzo, 2000) et des cancers, les biopsies n'ont pas encore montré de liens évidents entre la PIA et la PIN de faible grade nécessitant davantage d'investigations (Vral *et al.*, 2012).

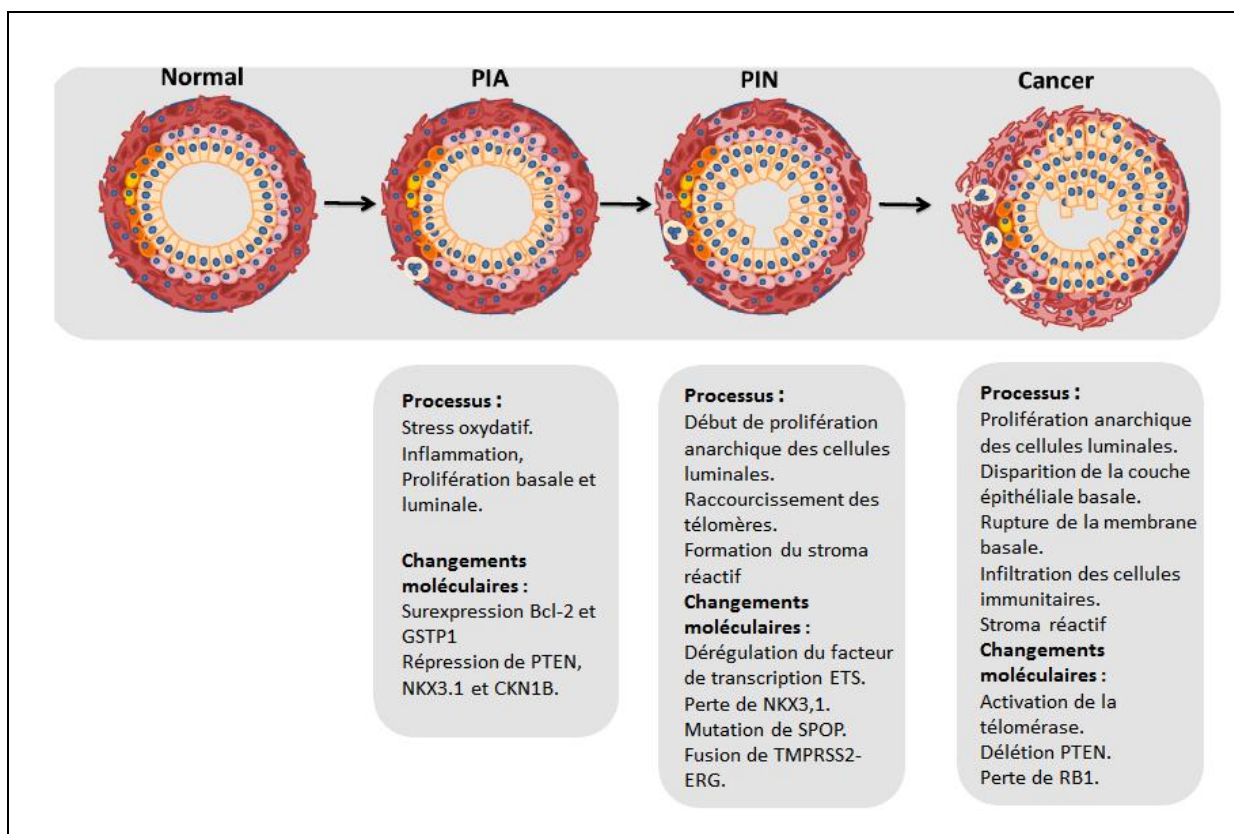


Figure 11 : Evolution des lésions précancéreuses prostatiques (PIA et PIN). D'après (Packer et Maitland, 2016).

Bien que plusieurs termes aient été utilisés pour décrire la dysplasie (altérations acquises de l'architecture et de la fonction d'un tissu) ou l'atypie (arrêt de développement du tissu), ces lésions morphologiques bien caractérisées sont maintenant considérées sous le seul terme de « néoplasie intra-épithéliale prostatique » (PIN). Cette néoplasie est la lésion précancéreuse la

plus importante de la prostate (Eminaga *et al.*, 2013). Elle est caractérisée par une hyperplasie (augmentation du volume d'un tissu due à une augmentation du nombre de ses cellules) des cellules luminales et possède des caractéristiques biochimiques, génétiques et phénotypiques similaires au cancer de la prostate à la grande différence qu'il n'y a pas de rupture de la membrane basale (Tomlins *et al.*, 2007; Shen et Abate-Shen, 2010). On distingue 3 différents grades de PIN : grade 1 (faible) et les grades 2 et 3 considérés comme des PIN de haut grade. Durant les néoplasies, il est observé comme durant le cancer, un raccourcissement télomérique important (Zhang *et al.*, 1998; Meeker *et al.*, 2002) pouvant causer une instabilité génomique et pouvant entraîner des réarrangements chromosomiques (O'Sullivan et Karlseder, 2010). Parmi les remaniements présents dans les PIN de haut grade, des études ont montré la fusion TMPRSS2-ERG (Perner *et al.*, 2007), qui est considérée comme l'anomalie génétique la plus présente dans le cancer de la prostate et dont les protéines favorisent la prolifération, la migration et la transformation des cellules épithéliales prostatiques (Taylor *et al.*, 2010; Baca *et al.*, 2013). Il a été observé également la mutation de SPOP (Barbieri *et al.*, 2012) présente dans 6 à 15% des cancers primaires qui régule normalement le protéasome ainsi que la perte de NKX3.1 connue pour empêcher la prolifération cellulaire (Bostwick *et al.*, 2004). Enfin, durant la néoplasie, il y aurait également une modification du stroma environnant en stroma dit « réactif » (Tuxhorn *et al.*, 2002) où les cellules musculaires lisses composant majoritairement le stroma prostatique sont remplacées progressivement par des fibroblastes associés au cancer (CAF : cancer-associated fibroblasts) ou myofibroblastes (Hagglof et Bergh, 2012). Ces CAFs modifient la signalisation épithélio-stromal afin de favoriser la tumorigenèse. En effet, durant les néoplasies de haut grade, le TGF β est surexprimé et davantage sécrété induisant la formation de ce stroma réactif (Tuxhorn *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2010). Bien qu'il y ait de nombreux liens potentiels entre le cancer et la néoplasie, il n'y a pour l'instant pas de preuves évidentes d'une progression de PIN en cancer de la prostate. De plus, des études ont récemment montré que certaines néoplasies de haut grade sont en réalité des carcinomes rétrogrades qui auraient envahis les glandes normales (Haffner *et al.*, 2016).

c. La cellule initiatrice du cancer

De nombreuses théories ont été formulées afin de déterminer quel était le type cellulaire initiateur du cancer. Ainsi, les différentes études de lignage cellulaire dans des modèles de souris ainsi que la capacité de ces cellules à reformer des sphéroïdes ou à régénérer un tissu *ex vivo* ont identifiées à la fois des progéniteurs luminaux et basaux qui pourraient initier le développement du cancer (Collins *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009; Ousset *et al.*, 2012; Shi *et*

al., 2014). Actuellement, l'origine luminale ou basale de ce progéniteur reste encore un actif sujet de débat. En dépit de l'origine de la strate cellulaire de la cellule initiatrice de cancer, il existe 2 grandes théories sur le lignage de cette fameuse cellule. Ces théories ont en commun que le cancer serait la résultante d'une altération définitive touchant un oncogène ou gène suppresseur de tumeur dans la cellule initiatrice. Les cellules filles accumuleraient alors d'autres lésions génétiques au fur et à mesure des divisions responsables du cancer (Nowell, 1976; Fearon et Vogelstein, 1990; Haffner *et al.*, 2013). La première théorie est un modèle stochastique stipulant que tous les types cellulaires épithéliaux (apical, intermédiaire et basal) sont susceptibles de générer des mutations et d'être capables individuellement de reformer une tumeur. Le second modèle, quant à lui, stipule que seules les cellules souches (basales)

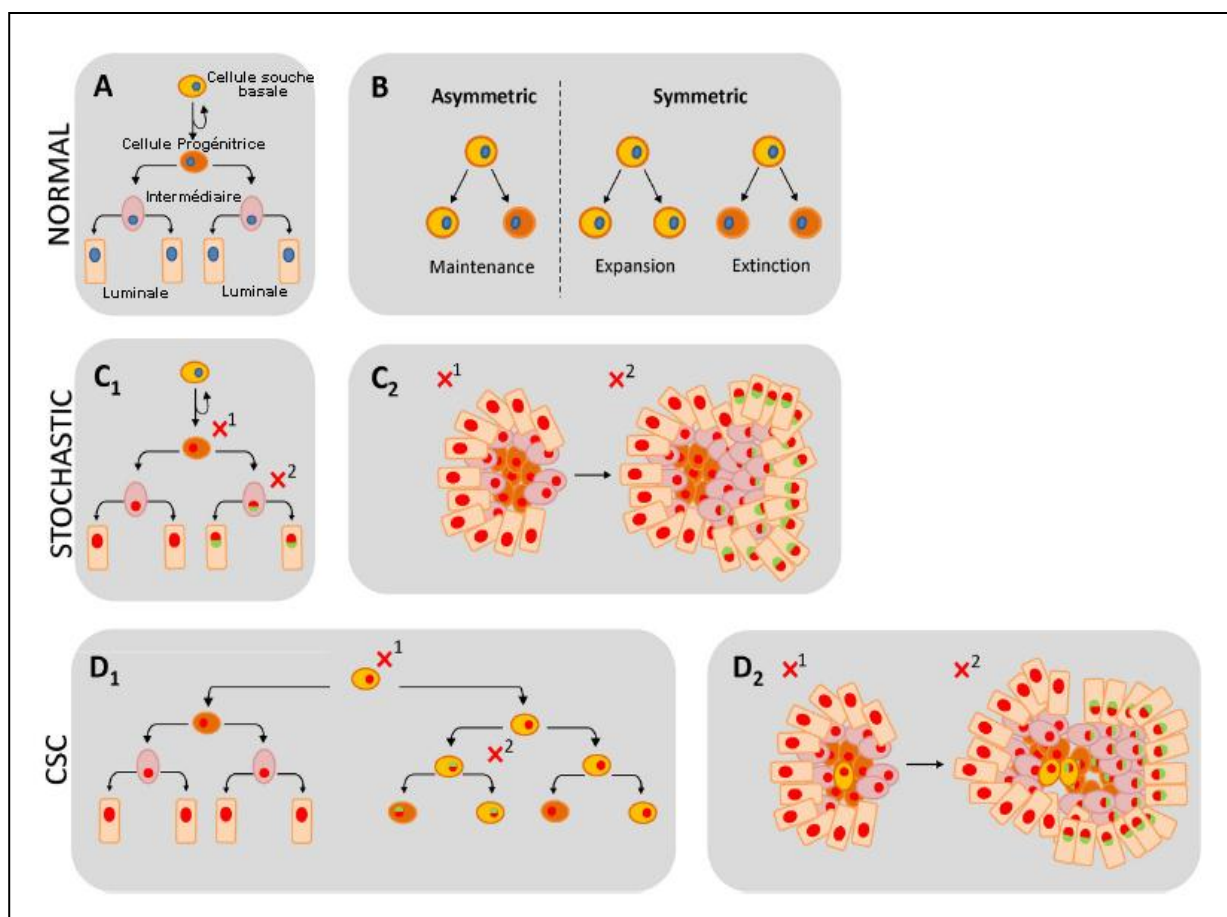


Figure 12 : Modèles de lignage cellulaire à l'origine du cancer de la prostate où (A) et (B) représentent le modèle classique à l'origine de l'homéostasie de l'acinus glandulaire prostatique sain tandis que C1 et C2 représentent le modèle stochastique stipulant que les mutations à l'origine du cancer peuvent potentiellement survenir dans tous types cellulaires épithéliaux. Enfin, D1 et D2 représentent le modèle des cellules souches basales génératrices du cancer (CSC : Cancer Stem Cells). Les mutations survenant dans les cellules sont représentées par des x rouges ainsi que la moitié d'un noyau en vert lorsque 2 mutations successives surviennent. D'après (Packer et Maitland, 2016)

minoritaires seraient capables de reformer la tumeur (Collins *et al.*, 2005; Barker *et al.*, 2009; Clevers, 2011; Visvader et Lindeman, 2012). Ces modèles peuvent coexister et sont loin

d'être exclusifs mais ils pourraient permettre de mieux comprendre le cancer en vue d'appréhender de nouvelles méthodes de prévention dans le futur.

3. Diagnostic

a. Dosage du Prostate Specific Antigen (PSA)

Le cancer de la prostate se développant lentement, il est possible qu'il ne cause aucun signe ni symptôme jusqu'à que la tumeur ait atteinte une certaine taille ou se développe dans les tissus voisins. Ainsi, lorsque le patient souffre de symptômes similaires à ceux observés en cas d'HBP dont des problèmes importants concernant la miction ainsi que l'éventuelle présence de sang dans l'urine ou le sperme, un diagnostic va être réalisé à l'aide de différents examens cliniques. Ces examens consistent en (1) un test biochimique qui vise à doser le taux de PSA dans le sérum, (2) un toucher rectal et (3) une échographie transrectale associée la plupart du temps à une biopsie. On considère que le patient a un risque d'être atteint d'un cancer de la prostate lorsque le taux de PSA est \geq à 4 ng/ml (Moore *et al.*, 1992). Lorsque ce seuil de PSA est dépassé et que le médecin a décelé des masses, un changement de taille, de forme ou de consistance de la prostate au niveau de la zone périphérique (la plus proche du rectum), le patient va subir une biopsie. Cet examen permet alors de confirmer le diagnostic mais aussi de connaître les caractéristiques et l'avancement de la tumeur si elle est présente.

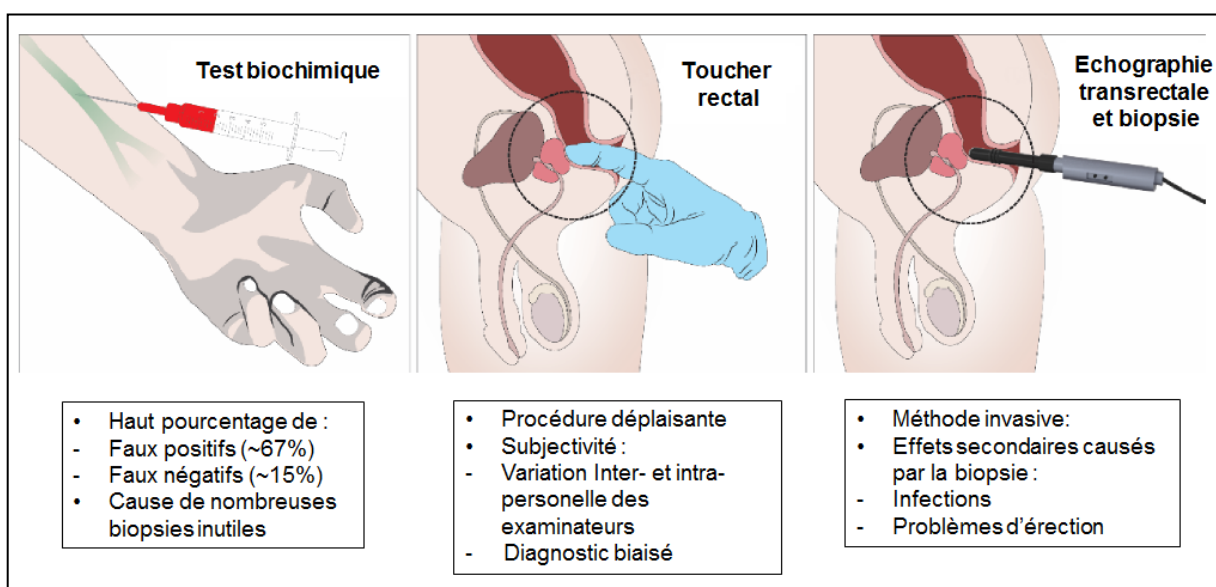


Figure 13 : Limites des méthodes de diagnostic actuelles du cancer de la prostate. D'après (Kang *et al.*, 2015).

En plus d'être des techniques particulièrement invasives et mal vécues par le patient, le toucher rectal, le dosage de la PSA et les biopsies ont montré de nombreuses limites ces dernières années. En effet, un taux de PSA élevé dans le sang n'est pas forcément un signe de

cancer de la prostate car la PSA augmente graduellement chez les hommes âgés mais aussi lorsque le patient est atteint d'une HBP ou d'une prostatite. En effet, la pauvre spécificité du PSA a mené à plus de 15% de faux positifs ainsi que 66% de faux négatifs avec pour conséquence, un grand nombre de biopsies réalisées inutilement. On considère qu'aux Etats-Unis et en Europe, plus de deux tiers des biopsies prostatiques ne sont pas nécessaires (Ferlay *et al.*, 2013; Siegel *et al.*, 2015) remettant sérieusement en cause l'utilisation systématique du PSA comme marqueur diagnostique du CaP. Cependant, ces résultats sont souvent dû à de mauvaises interprétations ne prenant pas en compte tous les paramètres concernant le dosage du PSA. En effet, il est possible d'améliorer les performances du test en normalisant le taux de PSA par rapport au volume de la glande (mesure de la « Densité de PSA »). De même, il est possible de mesurer sa vélocité, PSAV, qui correspond au changement de concentration en PSA sur une année, ou mesurer le temps de doublement du PSA, PSADT (Prensner *et al.*, 2012). Ces valeurs dynamiques semblent plutôt jouer un rôle pronostique et affiner les résultats du test existant, des valeurs élevées de PSAV et de PSADT étant associées à une survie diminuée.

Ainsi, ces diagnostics inadaptés ou trop peu précis imposent de trouver de nouveaux biomarqueurs du cancer prostatique beaucoup plus sensibles et spécifiques couplés à des techniques non invasives.

b. Biomarqueurs du CaP

Tout comme le dosage du PSA qui a ouvert le champ aux tests diagnostiques et pronostiques non invasifs, de nombreux biomarqueurs du cancer de la prostate ont été caractérisés et pourraient dans un avenir proche être utilisés en complément du PSA. Ces biomarqueurs sont des protéines, des métabolites ou encore des acides nucléiques qui sont contenus dans les fluides biologiques humains : le sérum, le plasma séminal ou encore l'urine. En effet, le plasma séminal transitant par la prostate contient de nombreux marqueurs directement sécrétés par les cellules tumorales ainsi que des produits de dégradation cellulaire. Le sérum et l'urine sont tout aussi porteurs d'information mais ont plusieurs limites, la plupart des protéines étant soumises à une activité protéolytique importante et une forte concentration d'albumine dans le sérum. De plus, il existe un faible pH, une forte concentration en sels et d'autres biomarqueurs non spécifiques dans les urines. Dans ce contexte, de nombreux biomarqueurs sont particulièrement prometteurs dont le PCA3 « Prostate cancer antigen », ARNm non codant exprimé dans 90% des cancers prostatiques à l'inverse des prostates saines et hyperplasiques (Bussemakers *et al.*, 1999; de Kok *et al.*, 2002) et détecté dans les urines en

complément du PSA (Marks *et al.*, 2007; Haese *et al.*, 2008; Mearini *et al.*, 2009; Pepe et Aragona, 2011). Il y a également le gène de fusion TMPRSS2-ERG présent dans 50% des

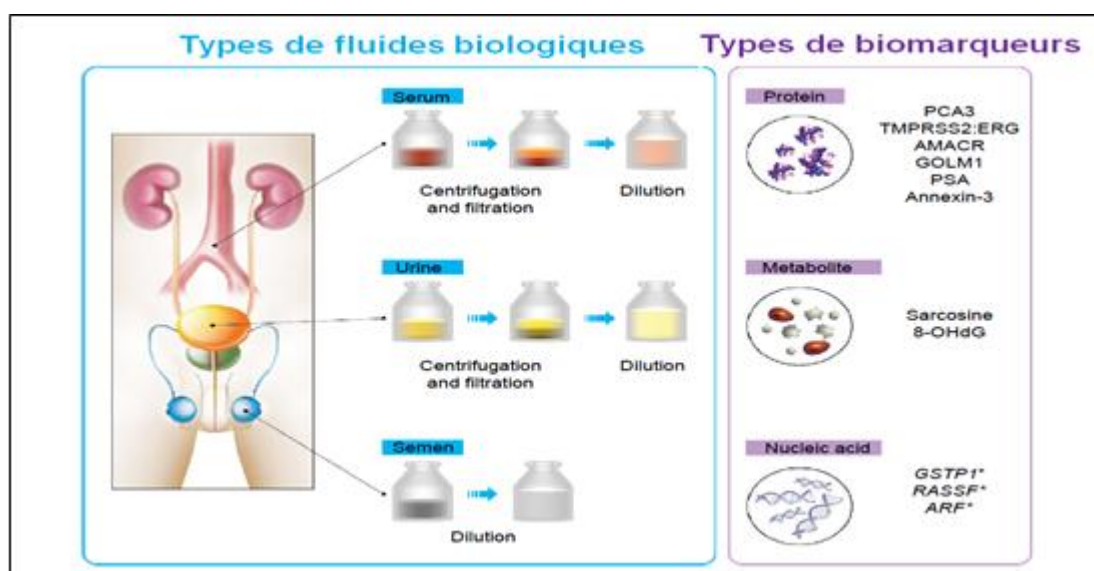


Figure 13 : Biomarqueurs potentiels du cancer de la prostate. D'après (Kang *et al.*, 2015).

cancers de la prostate (Hessels *et al.*, 2007) également dosé à partir des urines en complément du PSA. Pour l'instant, ces biomarqueurs ne sont pas utilisés individuellement mais uniquement en complément du PSA qui reste le marqueur diagnostique de référence. Cependant, les nombreuses découvertes actuelles associées à l'émergence des nanotechnologies permettent d'accroître la sensibilité de détection des molécules biologiques par rapport aux dosages reposant sur la technique d'ELISA. Ainsi, ces techniques pourraient grandement améliorer les stratégies diagnostiques et pronostiques dans un avenir proche (Kang *et al.*, 2015).

4. Classification du cancer

Suite à la biopsie réalisée sur les patients dont on suspecte le cancer, des analyses histologiques vont être réalisées afin de confirmer le diagnostic de cancer et de déterminer le degré d'avancement de la tumeur. Dans les cas de cancers prostatiques, la tumeur est très souvent hétérogène avec un mélange entre régions tumorales et régions saines dont les analyses demeurent complexes. On parle alors de tumeur multifocale (Cheng *et al.*, 1998). Ainsi, les professionnels de la santé se basent sur deux modèles majeurs de classification régulièrement actualisés et complémentaires qui permettent de classer les cancers en fonction de l'avancement de la maladie. Ces deux modèles sont :

- le système TNM (Tumor, Node and Metastasis) qui évalue les caractéristiques d'un cancer selon des critères de propagations anatomiques locales, régionales et métastatiques à distance.

- Le score de Gleason qui détermine le degré d'agressivité et la probabilité de propagation de la tumeur.

- La classification TNM :

Ce modèle, régulièrement actualisé (Cheng *et al.*, 2012) a été mis au point par Ammon en 1977 (Ammon *et al.*, 1977) et prend en compte la combinaison d'indicateurs de classement représentée par les lettres T (taille et degré d'extension de la Tumeur initiale), N (nombre et emplacement des Nodes ou ganglions lymphatiques régionaux atteints) et M (degré de propagation des Métastases).

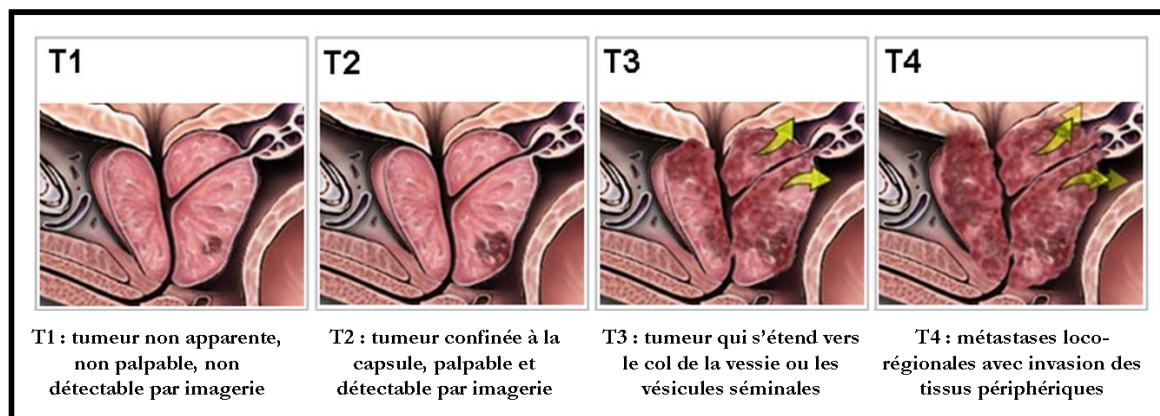


Figure 14 : Représentation des tumeurs de la prostate de grade T1 à T4 selon la classification TNM.

L'indicateur T comporte 4 stades représentant une extension loco-régionale graduelle de la tumeur prostatique :

Au stade T1, la tumeur est de faible taille, non palpable et/ou difficilement visible en imagerie.

Au stade T2, la tumeur reste confinée dans la prostate (apex et capsule compris) mais occupe une plus grande surface touchant au moins la moitié d'un lobe (T2a) ou les 2 lobes prostatiques (T2c). A ce stade, la tumeur devient clairement palpable et donc détectable.

Au stade T3, l'extension tumorale se fait au-delà de la capsule de Gleason qui délimite la prostate pour envahir le col de la vessie et se diriger vers les vésicules séminales.

Le dernier stade (T4) définit les métastases loco-régionales, où les cellules tumorales vont s'étendre vers les organes adjacents (col vésical, sphincter urétral, rectum, paroi pelvienne).

Enfin, l'indicateur N correspond à l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux et l'indicateur M détermine les métastases à distance touchant d'autres ganglions mais également les os et d'autres organes comme les poumons.

- le score de Gleason (SG):

Mis au point par Gleason en 1966, qui travaillait sur les tissus prostatiques des vétérans de l'armée américaine (VACURG), ce score, régulièrement actualisé, est le principal facteur pronostique du cancer de la prostate (Gleason, 1966). En fonction des études histologiques réalisées à partir des biopsies ou suivant une prostatectomie, le SG se base principalement sur l'architecture prostatique prenant en compte l'hétérogénéité tumorale et le degré de différenciation des cellules classées selon 5 grades.

Lorsque que le grade est faible, les cellules cancéreuses apparaissent normales alors qu'un grade élevé reflète une altération du tissu avec une agressivité des cellules cancéreuses importante.

Les grades 1 et 2 ressemblent beaucoup à la glande normale, l'uniformité des glandes commençant à être altérée au grade 2 avec davantage de stroma entre les glandes. Au grade 3, les cellules cancéreuses restent bien différenciées et les glandes encore bien définies mais s'infiltrant parmi les acini non néoplasique. Au grade 4, la plupart des glandes qui forment la tumeur sont fusionnées et sont constituées de cellules néoplasiques, les glandes distinctes ayant une faible lumière. Enfin au grade 5, le plus important, il y a une déstructuration complète du tissu au niveau de la zone cancéreuse où les glandes font place à des amas cellulaires tumoraux indifférenciés et anaplasiques.

La présence de plusieurs populations tumorales différentes au sein de la prostate font que le score de Gleason est la somme des grades des deux populations tumorales les plus fréquentes. Il peut aller ainsi de 2 (soit 1 + 1) noté 1-1 à 10 (5-5) correspondant à une tumeur très agressive. Depuis 2005, l'International Society of Uro-Pathology (ISUP) a redéfini le SG ne considérant que les grades 3 à 5 et donc les scores de 6 (3-3) à 10 (5-5) (Salomon *et al.*, 2010).

Le SG s'applique pour tout adénocarcinome prostatique et ne peut être donné après traitement par hormonothérapie, curiethérapie ou radiothérapie externe. Il est constitué différemment selon le mode de recueil du tissu. En effet, sur les biopsies qui ne représentent qu'une partie de la glande, le score est obtenu par la somme du grade le plus représenté avec le grade le plus péjoratif. Sur une prostatectomie totale où l'ensemble du tissu est analysé, le SG correspond à la somme des 2 grades les plus représentés mais peut également tenir compte d'un 3^{ème} contingent si ce dernier est de haut grade.

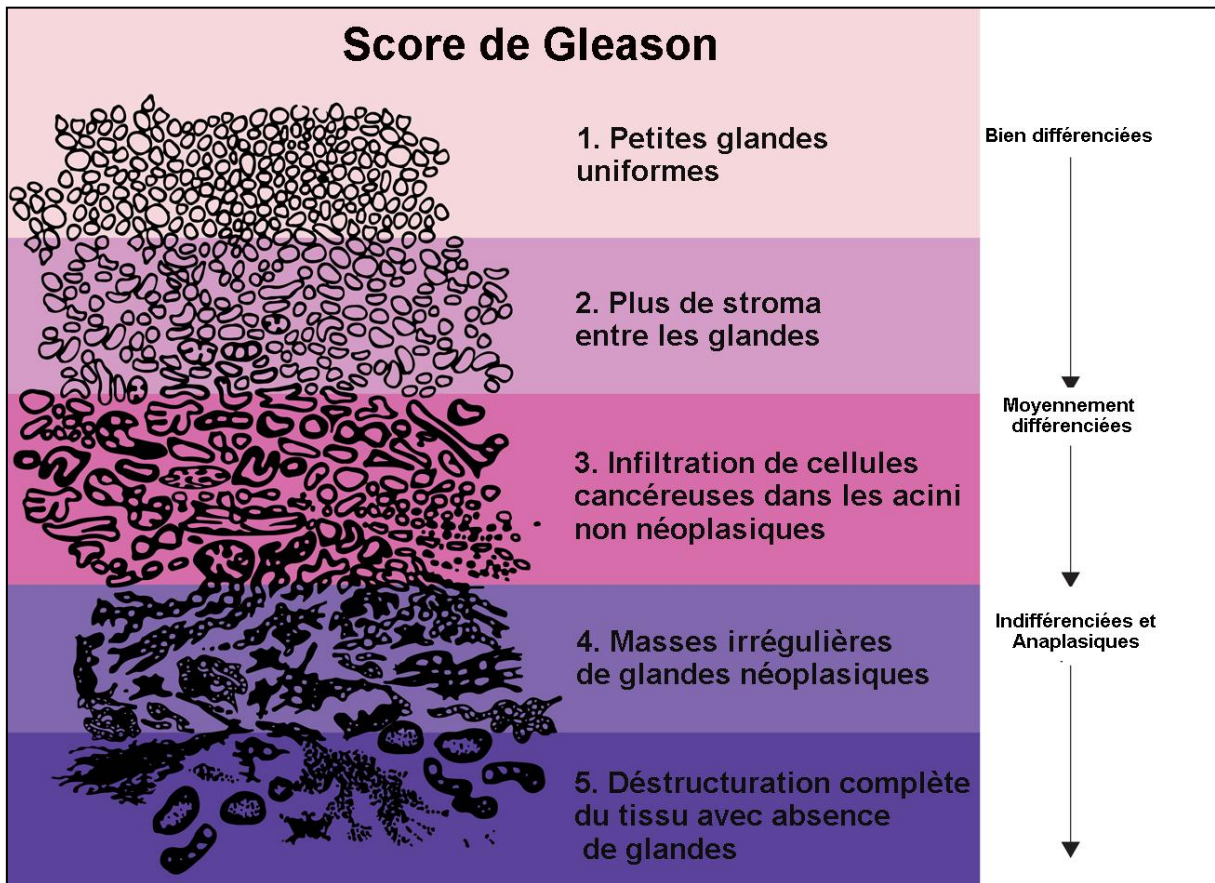


Figure 15 : Caractéristiques et aspects histologiques des différents grades (1 à 5) du cancer de la prostate selon le système de gradation de Gleason,

Enfin, le SG associé au stade clinique et au dosage du taux de PSA, permet d'établir une classification nommée classification de D'Amico (D'Amico *et al.*, 1998) qui distingue 3 niveaux de risque de progression du cancer :

- des tumeurs à faible risque : stade T1c ou T2a/ Taux de PSA $PSA < 10$ ng/ml/ SG =6.
- des tumeurs de risque intermédiaire : stade T2b ou T2c/ Taux de PSA entre 10 et 20 ng/ml et SG = 7.
- des tumeurs à risque élevé : stade T3 ou supérieur/ Taux de PSA > 20 ng/ml/ SG > 7 .

Ainsi, à partir de ces résultats en complément éventuel avec d'autres méthodes d'imagerie telles que la scintigraphie osseuse ou l'utilisation d'IRM (imagerie par résonance magnétique), les médecins vont définir une stratégie thérapeutique permettant de cibler le cancer en fonction de son avancée.

5. Traitements des stades androgéno-dépendants

Le traitement du cancer de la prostate va dépendre de nombreux paramètres prenant en compte son stade d'évolution déterminé par les techniques histo-pronostiques décrites précédemment mais également l'âge du patient et les souhaits de ce dernier.

Deux stratégies peuvent être mises en place en fonction de l'état d'avancement du cancer : (1) les traitements curatifs radicaux qui ont pour but d'éliminer les foyers tumoraux lorsque que le cancer est encore localisé et (2) les traitements palliatifs tels que l'hormonothérapie qui aura une action plus globale dans les cas de cancers avancés et métastatiques.

a. les traitements curatifs radicaux

Afin de traiter les formes localisées de CaP, plusieurs méthodes peuvent être employées :

- **La chirurgie de la prostate** aussi appelée prostatectomie totale (ou radicale) consiste à retirer chirurgicalement la totalité de la prostate de manière minutieuse, les progrès de la chirurgie permettant de limiter l'incontinence urinaire ou l'impuissance (Tombal et Van Cangh, 2001; Murphy *et al.*, 2009; Wolff et Mason, 2012). Cette méthode est principalement employée sur les sujets de moins de 70 ans et constitue un traitement de choix avec un taux de survie de 85% à 15 ans (Krongrad *et al.*, 1997).

- **La radiothérapie** peut être : (1) externe où une source de rayonnement va être focalisée sur le tissu cancéreux de manière à détruire les cellules tumorales tout en limitant l'irradiation des tissus voisins encore sains ; (2) interne, on parle alors de curiethérapie où des grains radioactifs (de l'iode 125 ou du palladium 103) vont être implantés de manière très localisé dans la prostate pendant plusieurs semaines à plusieurs mois afin d'éviter l'irradiation de la vessie et du rectum. La radiothérapie en générale présente des résultats carcinologiques similaires à ceux de la prostatectomie.

- **Les ultrasons focalisés de haute intensité** reposent comme son nom l'indique sur l'émission d'ultrasons émis par une sonde introduite dans le rectum qui vont dégager une chaleur intense permettant la destruction immédiate des cellules tumorales. Cette technique réalisée sous anesthésie locale, est utilisée pour des patients dont l'état de santé ne permet pas d'opération et a montré des résultats prometteurs à l'étranger.

- **La cryothérapie** est souvent utilisée dans les cas de récurrence qui peuvent être observés après radiothérapie et n'est réalisée que sur des glandes prostatiques ne dépassant pas une certaine taille. Elle consiste, par guidage à l'aide d'échographie transrectale, à envoyer des gaz très froids vers la prostate de manière à détruire les cellules tumorales par congélation, le patient étant sous anesthésie. Lors de cette procédure, un cathéter est placé dans l'urètre du patient par lequel va être perfusé de l'eau salée continuellement chauffée de manière à éviter sa congélation. La cryothérapie a comme avantage d'être moins invasive que la chirurgie, avec

une douleur post-opératoire moins importante et une période de récupération plus courte mais on ne connaît pas encore l'efficacité à long terme de ce traitement.

b. Les traitements palliatifs ou hormonothérapie

Les cancers de la prostate sont constitués principalement de cellules tumorales ayant les caractéristiques de cellules luminales qui comme elles, expriment AR et dont la survie dépend de la stimulation du récepteur par les androgènes. On parle alors de cancer androgéno-dépendant. Ainsi, pour les cancers de la prostate dits à risque élevé, à risque intermédiaire ou en cas de récurrence d'un cancer localisé, les stratégies visent à empêcher la stimulation d'AR par plusieurs méthodes. Ces techniques diffèrent selon la cible visée et la mise en œuvre réalisée et sont appelées : hormonothérapie ou suppression androgénique. Ces techniques employées couramment en clinique ont montré une grande efficacité avec plus de 94% des cancers qui répondaient à cette suppression androgénique mais ne sont pas exempts de nombreux effets secondaires qui peuvent être difficiles à vivre par les patients. Ainsi, selon la cible visée, ces méthodes consistent en :

- **La castration chirurgicale** ou pulpectomie, consiste à retirer les 2 testicules qui produisent plus de 95% de la testostérone totale chez l'homme. Cette castration permet de diminuer définitivement le taux de testostérone sérique et est donc irréversible entraînant de nombreux effets secondaires tels que la perte de libido, la fonte musculaire et la prise de poids. Cette technique n'est utilisée qu'en de rares occasions où le cancer est particulièrement agressif et où un traitement immédiat est nécessaire.

- **Les traitements médicamenteux** comprennent l'utilisation de 3 classes de médicaments : les agonistes et antagonistes de la GnRH, les anti-androgènes périphériques et les inhibiteurs de la 5 α -réductase, qui vont cibler la synthèse de testostérone et de DHT ainsi que le récepteur aux androgènes AR.

Les agonistes et antagonistes de la GnRH sont utilisés pour empêcher la sécrétion de testostérone testiculaire en intervenant au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

En effet, la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) aussi appelée LH-RH (Lutein Hormon-Releasing Hormon) est une neurohormone libérée par des neurones spécialisés du noyau arqué de l'hypothalamus. Suite à sa sécrétion, la GnRH va réguler la synthèse et la libération des gonadotrophines par des neurones de l'anté-hypophyse: la LH (Lutein Hormon) et la FSH (Follicle Stimulating Hormon). Ce sont alors ces gonadotrophines qui vont être responsables de la sécrétion de testostérone par les testicules. Ainsi, l'utilisation des agonistes de la GnRH (buséréline, goséréline, leuproréline et triptoréline.) va permettre une stimulation continue de du récepteur à la GnRH et induire sa désensibilisation. Cela va avoir pour conséquence d'inhiber la libération de LH mais également la production et la libération de testostérone.

L'avantage de cette technique est qu'elle est réversible contrairement à la castration chirurgicale beaucoup plus lourde de conséquences. Il en résulte une très forte diminution de la masse tumorale après quelques semaines de traitement. Cependant, la sur-activation du récepteur de la GnRH par les agonistes à court terme va entraîner un pic sécrétoire transitoire de LH, FSH et donc de testostérone. Ce phénomène appelé « flare up » est responsable de douleur et peut aggraver les symptômes (Tombal et Van Cangh, 2001). Pour éviter ces conséquences, des anti-androgènes sont administrés au patient quelques jours avant le traitement.

Dans ce contexte, les antagonistes de la GnRH (dégarélix) sont particulièrement intéressants et remplacent progressivement l'association agonistes GnRH/ anti-androgènes majoritairement utilisée. En effet, les antagonistes bloquent directement et de manière efficace le récepteur à la GnRH, empêchant la libération de LH, FSH et de testostérone. De plus, cette stratégie empêche également l'effet « flare up » et l'utilisation complémentaire d'anti-androgènes. Enfin, une étude réalisée sur un an montre que les antagonistes sont plus efficaces que les agonistes avec une survie sans progression biologique significativement plus importante ($p=0,05$) (Tombal *et al.*, 2010).

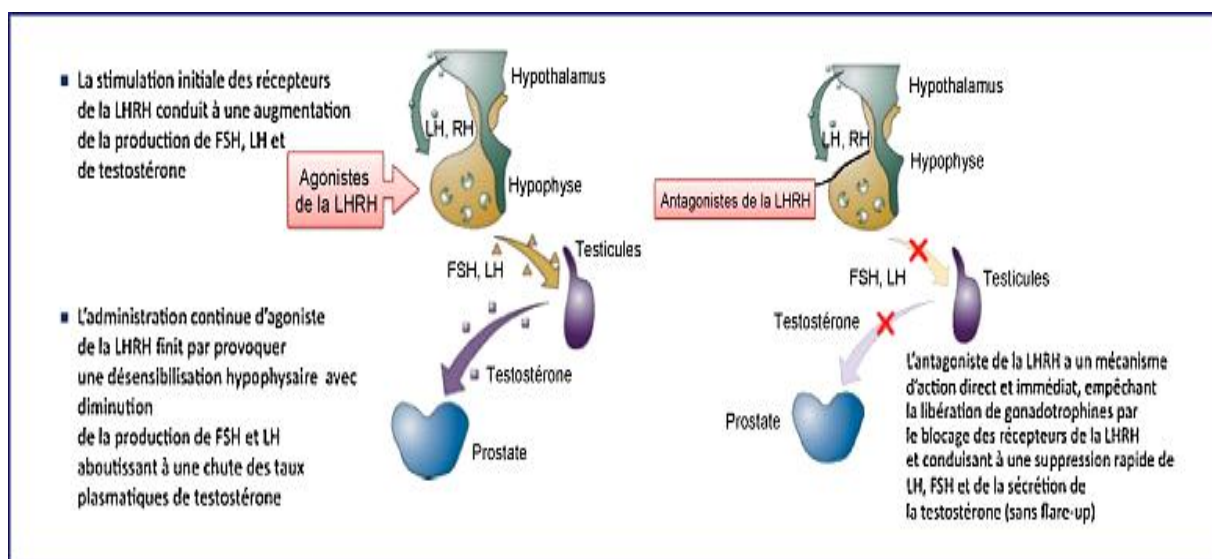


Figure 16 : Mécanismes d'action des agonistes et antagonistes de la LHRH (ou GnRH) (Boccon-Gibod *et al.*, 2010).

Les anti-androgènes périphériques (bicalutamide, cyprotérone, flutamide et nilutamide) agissent comme inhibiteurs compétitifs en bloquant le récepteur aux androgènes AR. Ainsi, ils empêchent la fixation de testostérone qu'elle provienne des testicules ou des glandes surrénales et la translocation d'AR vers le noyau. Ils peuvent être utilisés en monothérapie ou par combinaison avec les analogues de la GnRH comme décrit ci-dessus.

Les inhibiteurs de la 5 α -réductase, empêchent la formation de DHT, principal agoniste de AR à partir de testostérone et permettent de supprimer de 70 à 95 % de la 5 α -DHT circulante (Finastéride®, Dudastéride®) (Thorpe *et al.*, 2007). Leur utilisation, en combinaison avec des anti-androgènes périphériques chez des patients présentant un cancer prostatique avancé, permettrait de fortement réduire la progression de la maladie (Vis et Schroder, 2009).

6. Cancers hormono-résistants

Hormis l'utilisation des anti-androgènes en monothérapie, la réponse initiale suivant l'hormonothérapie est particulièrement efficace avec une réduction drastique du taux de testostérone sérique. En effet, suivant le traitement, la testostérone atteint une concentration souvent inférieure à 50 ng/ml qui s'accompagne d'une chute du taux de PSA sérique de plus de 80 à 90% (Amaral *et al.*, 2012; Kahn *et al.*, 2014). Malheureusement, après une période moyenne de rémission de 2 à 3 ans, la tumeur parvient à s'adapter et à échapper au blocage hormonal passant à un état de « cancer de la prostate résistant à la castration ». Cela se caractérise par une élévation du taux de PSA indépendante de la concentration en DHT et la formation de métastases (Amaral *et al.*, 2012). On considère que plus de 90% des patients avec un CaP androgéno-résistant développent des métastases osseuses souvent accompagnées de douleurs et de fractures (Hotte et Saad, 2010). A ce stade où le cancer est particulièrement agressif, la médiane de survie est comprise entre 18 et 24 mois (Attar *et al.*, 2009). En effet, les traitements employés à ce moment ne permettent que d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients sans réellement permettre une rémission du cancer.

a. Traitements utilisés

Les traitements employés à ce moment sont de la chimiothérapie utilisant principalement des taxanes couplés à un corticostéroïde, le prédnisone. Les taxanes sont des agents cytotoxiques qui stabilisent les interactions avec les sous-unités de la β -tubuline. Cela empêche la dépolymérisation des microtubules et bloque les cellules tumorales en anaphase, ce qui induit l'apoptose de ces dernières (Fitzpatrick et de Wit, 2014; Martin *et al.*, 2014). En première ligne, le taxane le plus utilisé est le docétaxel (Taxotère®) qui permet une augmentation de la durée de vie de plus de 7 mois avant qu'une résistance ne se mette en place (Harrington et Jones, 2011). En deuxième ligne, si l'état et la volonté du patient le permettent, on utilise le cabazitaxel (Jevtana®), taxane de seconde génération. A la différence du docétaxel, ce taxane possède une structure l'empêchant d'être utilisé comme substrat par les pompes P-gp (Permeability GlycoProtein), connues pour extruder hors de la cellule, toutes les substances médicamenteuses et agents extérieurs (Harrington et Jones, 2011). En parallèle à la

chimiothérapie, les traitements anti-androgéniques vont être maintenus et couplés à l'utilisation de molécules qui bloquent la synthèse de la testostérone d'origine surrénalienne. C'est le cas de l'Hydrocortisone, du Kétoconazole (Prinzato et Rondini, 2005) ou encore de l'acétate d'abiratéronne (Zytiga®). Ce dernier, inhibe le cytochrome P450 17A1 empêchant ainsi la synthèse des hormones stéroïdiennes dans les testicules, les glandes surrénales et le tissu tumoral (de Bono *et al.*, 2011). De la radiothérapie peut être également associée à la chimiothérapie pour soulager les symptômes urinaires engendrés par la tumeur et / ou pour atténuer la douleur provoquée par les métastases osseuses. Dans ce cas, la radiothérapie est soit externe, soit elle est réalisée par administration de dichlorure de radium 223 (Xofigo®) par injection dans le sang. La radiation diffuse alors jusqu'où le cancer s'est propagé afin de détruire les cellules tumorales composant les métastases osseuses.

Enfin, l'immunothérapie anti-tumorale se développe activement avec le Sipuleucel-T, vaccin autologue où des cellules présentatrices d'antigène (CPA) du patient sont prélevées par leucaphérèse. Les CPA sont ensuite activées *ex vivo* avec des protéines de fusion composées de PAP (Phosphatases acides prostatique) et un facteur de croissance de la lignée granulocytaire et monocyttaire (GM-CSF). Enfin, les CPA actives présentant les PAP-GM-CSF à leur surface sont réinjectées au patient prélevé et stimulent les lymphocytes T. Ces derniers vont alors attaquer les cellules tumorales qui expriment pour 95 % d'entre elles les PAP. En 2010, le Sipuleucel-T est la première immunothérapie à obtenir une AMM par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis de par ses résultats prometteurs et est encore en essai clinique en Europe (Kantoff *et al.*, 2010).

b. Causes de l'échappement thérapeutique

Actuellement, plusieurs théories sont proposées pour expliquer l'échappement thérapeutique des cellules tumorales prostatiques et leur passage vers un état « castration-résistant », les rendant particulièrement agressives et résistantes aux traitements de seconde ligne (Séronie-Vivien et Rambeaud, 2006). La théorie clonale suppose que l'hormonothérapie qui induit la mort des cellules luminales androgéno-dépendantes va, par la même occasion, sélectionner les cellules androgéno-indépendantes déjà présentes au sein du tissu prostatique. Ces cellules concernent les cellules souches basales et certaines cellules intermédiaires n'exprimant pas AR. Ces progéniteurs auraient alors la capacité de régénérer intégralement la tumeur indépendamment de la présence d'androgènes comme cela a déjà été décrit précédemment. La majorité de la tumeur. Ces cellules seraient capables d'acquérir des propriétés leur permettant de survivre et de proliférer en dépit de la carence androgénique. L'acquisition de ces mécanismes adaptatifs serait alors liée à des modifications génomiques ou *via* les interactions réciproques avec le microenvironnement tumoral impliquant la voie de signalisation

androgénique. La connaissance de ces mécanismes constitue un enjeu majeur dans le développement de nouveaux outils thérapeutiques qui pourraient permettre d'empêcher l'acquisition de cette hormonorésistance mais également d'augmenter la durée de vie des patients atteints de cancer. Parmi ces mécanismes, il y a :

- **Le récepteur aux androgènes, AR.** Ce dernier ayant un rôle clé dans la physiologie de la prostate, intervient de nombreuses manières dans l'homonorésistance.

- *Amplification du récepteur* : Un des premiers mécanismes conduisant à une prolifération anarchique malgré l'hormonothérapie consiste en une amplification d'AR entraînant une augmentation de l'expression de ses gènes cibles. Cette surexpression d'AR est observée dans plus d'un tiers des cancers prostatiques castration-résistants (CPCR) (Linja *et al.*, 2001) et augmente drastiquement la sensibilité d'AR à de très faibles niveaux d'androgènes, en particulier la DHT. En effet, la concentration de DHT nécessaire pour induire la croissance des cellules tumorales castration-résistantes est 10.000 fois plus faible que celle nécessaire pour les cellules tumorales n'ayant pas été exposées à la carence androgénique (Gregory *et al.*, 2001).
- *Les mutations d'AR* sont présentes dans 10 à 30% des CPCR avec une fréquence maximale lorsque les patients sont traités avec un anti-androgène non stéroïdien, le flutamide (Taplin *et al.*, 1995; Waltering *et al.*, 2012). Plus de six cent soixante mutations concernant AR ont été reportées, la plupart d'entre elles étant des mutations ponctuelles dans les régions codantes et pouvant entraîner un gain ou une perte de fonction du récepteur (Koochekpour, 2010). Les mutations concernent principalement le domaine de liaison du ligand (plus de 49% des mutations) et le domaine N-Terminal qui régule la transcription des gènes cibles (plus de 40% des mutations). Les mutations qui touchent le domaine de liaison du ligand (Ligand Binding Domain, LBD), réduisent la spécificité d'AR et augmentent sa liaison avec des ligands non-androgéniques. C'est le cas de la mutation ponctuelle la plus fréquente (T877A) dans les CPCR qui facilite la liaison avec plusieurs autres hormones comme les œstrogènes, la progestérone, plusieurs corticostéroïdes et de manière étonnante des anti-androgènes (cyprotérone et hydroxyflutamide). Ces anti-androgènes agissent alors comme des agonistes favorisant la survie des cellules tumorales (Waltering *et al.*, 2012; Egan *et al.*, 2014). Cette conversion d'antagonistes en agonistes a aussi été observée avec d'autres mutations ponctuelles (F876L) où l'enzatulamide, un inhibiteur d'AR utilisé dans des modèles précliniques à induit la translocation nucléaire du

récepteur (Korpala *et al.*, 2013). Enfin, plusieurs mutations touchant le domaine N-ter (G142V, M523V, G524D, and M537V) ont montré une activation constitutive du récepteur, ligand-indépendante principalement favorisée par une augmentation des interactions avec des cofacteurs de la famille p160 (Hay et McEwan, 2012).

- *Les formes épissées d'AR (ou AR splice variants, AR-V)* participeraient également activement à l'hormono-résistance, les anti-androgènes ciblant principalement le LBD. En effet, de nombreuses formes épissées avec un LBD tronqué apparaissent pendant l'hormonothérapie empêchant l'action des anti-androgènes tels que l'enzatulamide qui ciblent le LBD (Hu *et al.*, 1997; Egan *et al.*, 2014). Une perte du LBD, fonctionnant normalement comme un répresseur pour le reste du récepteur favorise alors la transcription génique et la croissance tumorale en absence de ligand (Waltering *et al.*, 2012). Parmi les différents variants du récepteur aux androgènes (AR-Vs), AR-V7 et AR-V576 sont les deux formes les plus présentes dans les CPCr servant comme marqueurs de faible pronostic (Gillis *et al.*, 2013) et imposent de changer la stratégie thérapeutique.
- *La transactivation d'AR* est un autre mécanisme permettant d'expliquer une activation d'AR en absence d'androgènes. Elle consiste en l'existence de cross-talk entre les différentes voies de signalisation intracellulaire où l'induction d'une voie activée suivant la fixation d'un ligand à son récepteur est capable d'activer AR indépendamment de la fixation de son ligand. Ainsi, par un mécanisme autocrine ou paracrine, les facteurs de croissance, cytokines ou interleukines sécrétées par les cellules stromales et les cellules tumorales, peuvent favoriser l'activation d'AR pendant l'hormonothérapie. En effet, l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1), le KGF (keratinocyte growth factor) et l'EGF sont capables d'induire l'activation d'AR et la transcription de ses gènes cibles *via* les voies de signalisation induites par les récepteurs à activité tyrosine kinase (HER-2/neu (Signoretti *et al.*, 2000)) intervenant dans la croissance et la survie cellulaire. Elles concernent la voie PI3K/AKT, la voie des MAPK, la voie STAT ou encore la voie Wnt/ β -catenin bien connues pour être majoritairement activées dans les CPCr (Culig *et al.*, 1994; Schweizer *et al.*, 2008; Saraon *et al.*, 2011). De plus, ces voies favorisent l'expression de plusieurs co-facteurs transcriptionnels d'AR tels que SRC1, SRC2, TIF2... surexprimés dans les CPCr et intervenant dans l'activation d'AR ligand-indépendante (Shafi *et al.*, 2013). Les interleukines 6 et 8 pourraient aussi activer AR d'une manière dose-dépendante *via* la voie NF κ B la translocation nucléaire d'AR ainsi que la transcription de ses gènes cibles (Malinowska *et al.*, 2009).

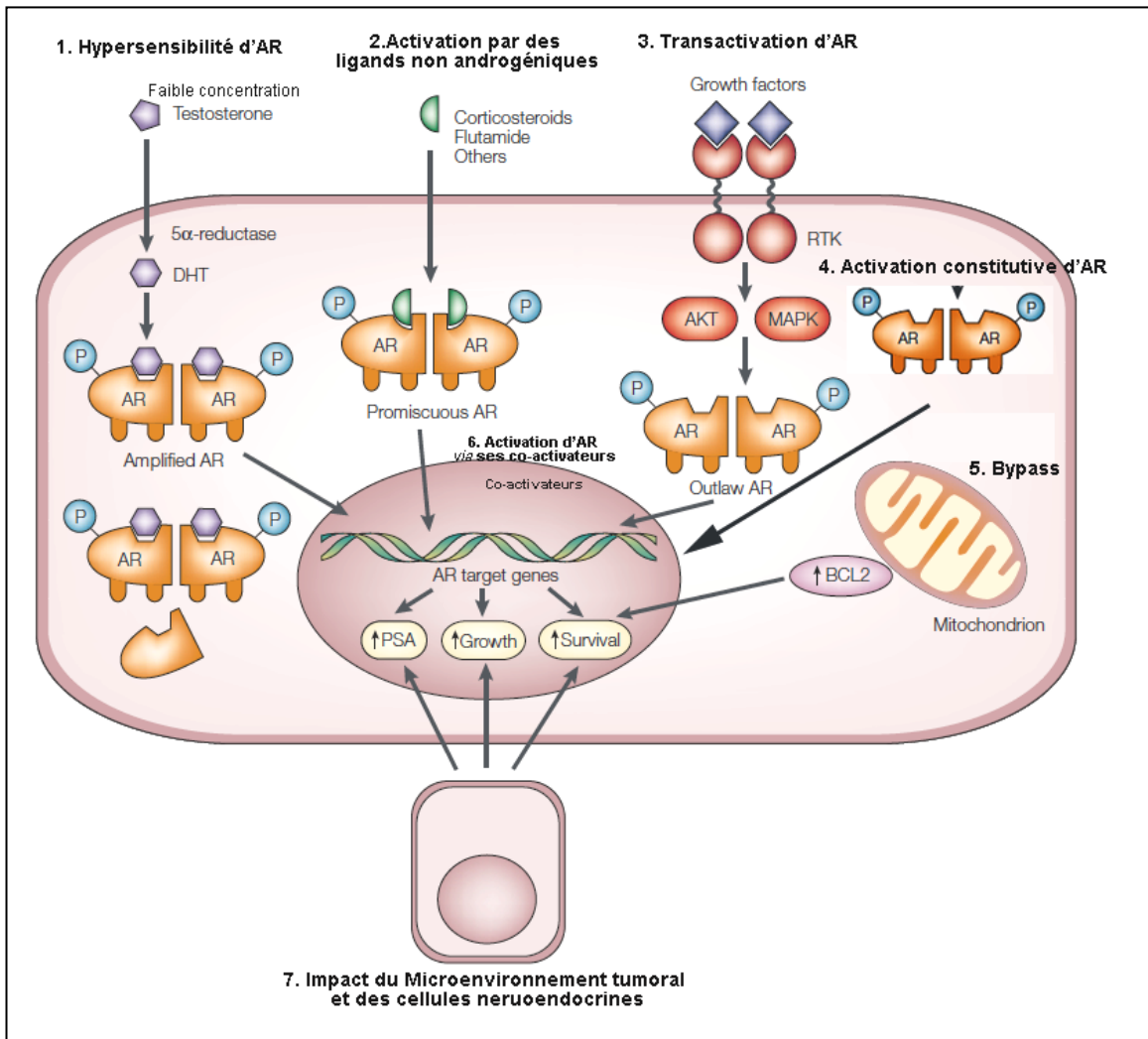


Figure 17 : Mécanismes de résistance à l'hormonothérapie en lien avec la voie du récepteur aux androgènes AR. D'après (Feldman et Feldman, 2001).

- **La stéroïdogénèse intratumorale.** En l'absence de synthèse d'androgènes par les testicules suivant la castration, le précurseur DHEA (déhydroépiandrostérone) ou prastérone, sécrétée par les glandes surrénales est convertie en androsténédione par la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase prostatique. L'androsténédione formée est ensuite convertie en DHT par la 5-α réductase (Chang *et al.*, 2011). Afin d'empêcher cette synthèse, un traitement avec l'acétate d'abiratérone est administré au patient qui va inhiber CYP17A1 et empêcher la synthèse de DHEA à la fois dans les testicules et les glandes surrénales (Kahn *et al.*, 2014). Malheureusement, de récents travaux ont montré que dans les CPCr, les cellules tumorales sont capables de s'adapter en utilisant une autre voie enzymatique pour produire la DHT. Par exemple, la progestérone produite aussi en faible quantité chez l'homme, peut également être convertie en androsténédione elle-même convertie en 5 α-androsténédione indépendamment de l'activité de CYP17A1 et finalement être convertie en DHT (Chang *et al.*, 2011; Shafi *et al.*, 2013). Enfin, l'augmentation de la synthèse et de l'apport de cholestérol, principal

précurseur des hormones stéroïdes par une sur-régulation de l'HMG-CoA réductase contribue également à la synthèse intra-tumorale des androgènes dans les CPCr (Leon *et al.*, 2010).

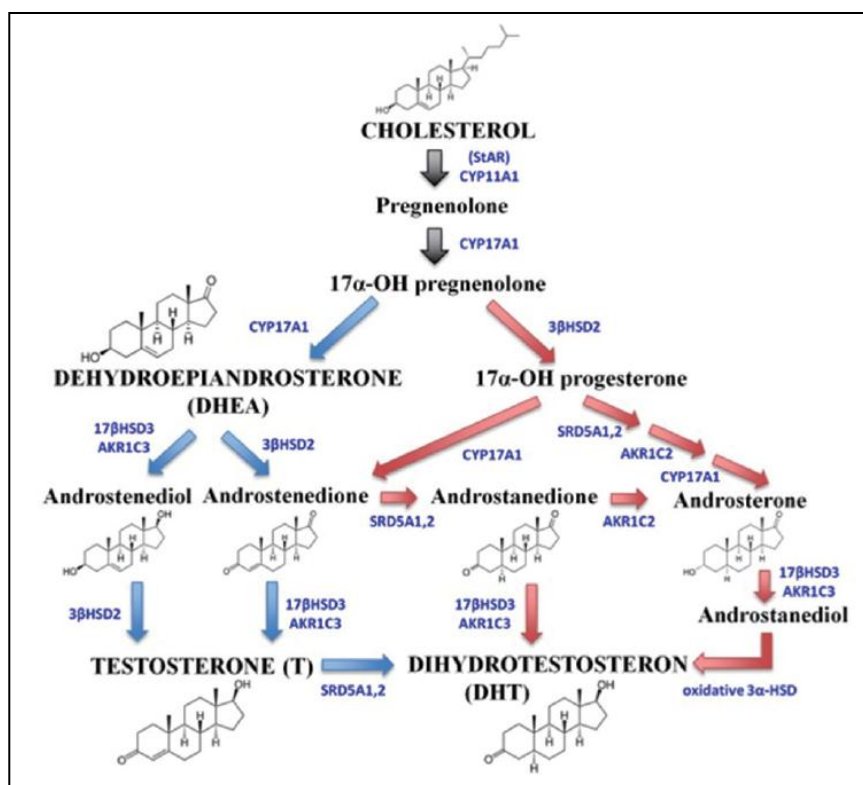


Figure 18 : Illustration de la stéroïdogénèse intratumorale dans les cancers prostatiques castration-résistants. Les flèches en bleu représentent la voie classique de synthèse de la DHT tandis que les flèches en rouge représentent une voie annexe utilisée par les cellules tumorales pour résister aux traitements (Armandari *et al.*, 2014).

- **La résistance à l'apoptose**, ou mort cellulaire programmée, est mise en place dans de nombreux cancers dont celui de la prostate afin de pallier aux différents traitements mis en jeu pour éliminer les cellules tumorales. Cette résistance est particulièrement fréquente dans les CPCr afin de permettre aux cellules de survivre en absence d'androgènes. Le déclenchement de l'apoptose peut se faire selon deux voies : (1) une extrinsèque *via* des récepteurs de mort situés à la membrane des cellules cibles et (2) une voie intrinsèque impliquant les mitochondries et le relargage de cytochrome C dans le cytosol. Bien que ces deux voies soient activées différemment, elles convergent vers l'activation de protéases à cystéine appelées les caspases, en particulier la caspase 3 effectrice (Zielinski *et al.*, 2013). Ces caspases vont alors cliver de nombreuses protéines cibles intervenant dans la structuration et le maintien de l'homéostasie cellulaire entraînant une cascade d'évènements moléculaires. Ces évènements vont alors aboutir à une diminution du volume cellulaire et une condensation et une fragmentation du noyau accompagnée de la formation de corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques vont alors être phagocytés par des macrophages suite à la reconnaissance de phosphatidylsérine exposée au niveau du feuillet externe de la membrane cellulaire.

Le choix entre l'apoptose et la survie de la cellule dépend des protéines de la famille Bcl2 en interaction avec des protéines inhibitrices de l'apoptose (inhibitors of apoptosis proteins, IAPs). En effet, il existe une balance permanente entre des protéines pro-apoptotiques (Bim, Bad, Bax, Bak...) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-cL, Bcl-xL, Mcl-1...) qui va déterminer le destin de la cellule. Un des mécanismes de résistance à l'apoptose consiste ainsi à déréguler cette balance par la surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL qui est bien plus exprimée dans les CPCR que dans les tumeurs peu avancées. Il a été montré que l'expression de Bcl-xL corrélait avec la progression du CaP (Sun *et al.*, 2008). De même, la perte des suppresseurs de tumeurs p53 et PTEN qui est présente dans les tumeurs très indifférenciées, est également un des mécanismes clés de l'acquisition de résistance à l'apoptose. En effet, p53 est normalement impliqué dans l'activation du facteur pro-apoptotique Bax et PTEN qui participent à la désensibilisation de la voie PI3K/AKT régulant la croissance et la survie cellulaire. Enfin, les travaux de ces dernières années ont également montré l'importance des micro-ARNs (miARNs) dans cette régulation de l'apoptose avec par exemple, l'expression de miR-19a qui est associée avec l'émergence des CPCR. Il a été montré que miR-19a inhibait l'expression du gène suppresseur de tumeur BTG1 impliqué dans la régulation de l'expression de Bcl-2 (Lu *et al.*, 2015). De plus, l'inhibition de miR-19a induit une apoptose significative dans les cellules CPCR prouvant qu'il existe une relation fonctionnelle entre les miARNs et l'apoptose.

- **Les cellules neuroendocrines**, tout comme les cellules souches basales, n'expriment pas ou très peu le récepteur aux androgènes, ce qui leur confère une immunité face à l'hormonothérapie, et les sélectionne par la même occasion. En effet, on retrouve des densités plus importantes de cellules neuroendocrines dans les CPCR que dans les tumeurs avant traitement (Hirano *et al.*, 2004), ce qui est associé à un très mauvais pronostic. Cependant, de nombreux travaux ont montré que cette augmentation du nombre de cellules neuroendocrines dans les CaP serait plutôt liée à un processus de transdifférenciation des cellules cancéreuses épithéliales avec un phénotype de cellule luminaire qu'à un phénomène d'enrichissement lié au traitement (Bonkhoff, 2001; di Sant'Agnese, 2001; Mosca *et al.*, 2005; Vashchenko et Abrahamsson, 2005; Nelson *et al.*, 2007). En effet, ces cellules NE dénommées dans la littérature cellules NE-like sont retrouvées à des stades précoces du cancer et expriment des marqueurs de cellule luminaire contrairement aux cellules NE qui expriment plutôt des marqueurs basaux (Yuan *et al.*, 2007). Cette transdifférenciation peut être induite par de nombreux stimuli pouvant faire intervenir différentes voies de signalisation. Parmi ces voies, il y a la voie PKA/CREB (Bang *et al.*, 1994; Cox *et al.*, 1999; Deeble *et al.*, 2007; Merkle et Hoffmann, 2011), ou encore les voies PI3K/ Etk/ Bmx et STAT induites par l'Interleukine-6

(Qiu *et al.*, 1998; Spiotto et Chung, 2000; Deeble *et al.*, 2001; Zelivianski *et al.*, 2001), ce processus étant réversible. Des observations cliniques suggèrent qu'il y a une corrélation entre le nombre des cellules NE-like avec la progression tumorale et un faible pronostic (Nelson *et al.*, 2007; Krauss *et al.*, 2014). Tout comme les cellules NE, les cellules NE-like ne prolifèrent pas et expriment plusieurs facteurs pro-apoptotiques comme la survivine et Bcl-2 (Segal *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2007), et ont une signalisation calcique altérée (Vanoverberghe *et al.*, 2004), toutes ces caractéristiques les rendant particulièrement résistantes aux différentes thérapies utilisées dans le CaP. De même, ces cellules sécrètent un grand nombre d'hormones peptidiques et de facteurs de croissance permettant d'assurer la croissance et la résistance des cellules tumorales face aux traitements employés. Enfin, de manière étonnante, les traitements employés pour éliminer les cellules cancéreuses telles que l'hormonothérapie (Hirano *et al.*, 2004; Berruti *et al.*, 2007), la radiothérapie (Deng *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2011) ou des traitements chimiothérapeutiques comme le docétaxel (Berruti *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2010) augmentent ce processus de transdifférenciation cellulaire, favorisant la survie des cellules tumorales aux stades intermédiaires et avancés du cancer.

Les différents mécanismes cités ci-dessus montrent à quel point les cancers prostatiques sont complexes avec des cellules tumorales capables de s'adapter aux différents traitements pour survivre et se développer. Cependant, ces cellules épithéliales ne se seraient jamais autant développées sans l'aval d'autres types cellulaires les supportant. En effet, le cancer ne se limite pas aux cellules épithéliales seules et met en jeu un microenvironnement tumoral complexe dans lequel de nombreuses interactions vont être mises en place entre les cellules épithéliales tumorales et les cellules composant le stroma de l'organe initiateur ainsi que les sites métastasés. Ce stroma tumoral est essentiel dans le développement du cancer ainsi que dans l'acquisition de résistance aux traitements administrés et est depuis plusieurs années davantage pris en considération. En effet, la compréhension de ce stroma tumoral constitue un élément majeur dans l'élaboration de nouveaux traitements ciblant les interactions épithélio-stromales propices au cancer et pourrait grandement améliorer les thérapies actuelles des cancers en général.

III. Le stroma tumoral prostatique

Pendant de nombreuses années, les cancers dont le cancer de la prostate, le cancer du sein ou encore le cancer du pancréas n'étaient étudiés qu'au travers des cellules épithéliales sans prendre en considération les autres types cellulaires adjacents dont le rôle est tout sauf négligeable. En effet, l'homéostasie d'un tissu et d'un organe repose sur les nombreuses interactions réciproques entre les différents types cellulaires les composants. Il en est de même dans le cadre de la tumorigenèse où le microenvironnement tumoral a un rôle déterminant dans l'initiation et le développement du cancer mais également dans l'acquisition de mécanismes de résistance aux différentes thérapies.

Ce microenvironnement se caractérise principalement par le stroma tumoral appelé « stroma réactif » qui se formerait durant la néoplasie intra-épithéliale prostatique (Tuxhorn *et al.*, 2002) avec une forte diminution du taux de cellules musculaires lisses et une augmentation du nombre de fibroblastes particuliers appelés CAF (cancer-associated fibroblast) ou myofibroblastes (Hagglof et Bergh, 2012). Ces cellules en étroite collaboration avec les cellules tumorales, constituent le type cellulaire majoritaire du stroma réactif et ont un rôle très important dans la croissance et l'augmentation du potentiel métastatique des cellules cancéreuses épithéliales. En effet, les CAFs sont capables de remodeler la composition de la MEC mais également de sécréter de nombreux facteurs de croissance et cytokines. De même, ce stroma réactif est composé d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales et péricytes, les adipocytes, les cellules immunitaires et les nerfs qui auraient un rôle tout aussi important dans l'évolution du cancer. La plupart des "hallmarks of cancer" décrits par Hanahan et Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2011) sont étroitement liés à ce microenvironnement tumoral, incluant la capacité à inhiber l'apoptose, à induire la prolifération cellulaire, à induire l'angiogenèse, à résister à l'hypoxie, la capacité à éviter la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire mais également la capacité à activer les cellules immunitaires pour favoriser l'invasion et la dissémination métastatique. Ainsi, la connaissance des interactions régissant ce microenvironnement tumoral constitue un enjeu important dans la compréhension du cancer et le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

A. Rôle du stroma « normal » dans la tumorigenèse

Comme décrit plus haut, les cellules stromales normales adultes, en particulier les cellules musculaires lisses ont un rôle important dans le contrôle de la croissance des cellules épithéliales et le maintien de la polarité des différentes strates composant le tissu glandulaire prostatique. Dans les stades précoces du cancer, ces cellules sont capables de limiter la

tumorigenèse en diminuant la prolifération (DeCosse *et al.*, 1975; Hayashi *et al.*, 1990; Hayashi et Cunha, 1991) et les propriétés malignes des cellules cancéreuses épithéliales (Cooper et Pinkus, 1977; Hayashi et Cunha, 1991). Ces propriétés ont été montrées dans de nombreux modèles animaux où les cellules stromales normales étaient associées avec des cellules épithéliales malignes. De même, plusieurs études ont montré que le stroma normal était capable d'induire une restriction de croissance des cellules épithéliales cancéreuses ainsi que l'induction d'un phénotype bien différencié (Arnold *et al.*, 2002). Des études sur des modèles d'adénocarcinomes prostatiques de rats induits (Dunning) ont révélé que l'environnement stromal normal était capable d'outrepasser les effets des mutations oncogéniques dans les cellules tumorales (Hayashi et Cunha, 1991). Ainsi, le stroma a un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire prostatique et peut lutter contre les événements précoces de tumorigenèse. Cependant, au bout d'un certain temps, de nombreux signaux envoyés par les cellules tumorales vont altérer ce stroma en le transformant en un microenvironnement favorable à leur propre développement appelé stroma réactif.

B. Les myofibroblastes ou CAFs

Lorsque des tissus comme les tissus prostatiques ou pancréatiques sont soumis à des blessures responsables de réponses inflammatoires ou d'une dérégulation de l'homéostasie à un endroit donné, une cicatrisation va se mettre en place où les cellules stromales vont être « activées », en se différenciant en myofibroblastes (ou CAFs). Ces CAFs vont favoriser la réparation de cette blessure en sécrétant de nombreux facteurs de croissance, ainsi que des protéines permettant un remodelage de la matrice extracellulaire comme le collagène de type 1 (Tuxhorn *et al.*, 2001; Rowley et Barron, 2012). Ce phénomène a également lieu pendant la tumorigenèse où le stroma adjacent à l'épithélium cancéreux va être activé afin de former le stroma tumoral ou stroma réactif. Ce stroma présente les mêmes caractéristiques phénotypiques et génotypiques que le tissu de granulation avec une vascularisation et une organisation conjonctive importante (Dvorak, 1986; Gabbiani, 2003; Desmouliere *et al.*, 2005). Depuis les études de Dvorak en 1986 (Dvorak, 1986), la tumeur est considérée comme « une blessure qui ne guérit jamais » favorisant cette transformation myofibroblastique propice à la tumorigenèse. Le stroma réactif des cancers prostatiques est ainsi associé à une diminution importante des cellules musculaires lisses bien organisées pour laisser place à de nombreux myofibroblastes et fibroblastes, ainsi qu'à une plus grande densité de capillaires et à du pro-collagène I et d'autres composants de la matrice extracellulaire.

Les myofibroblastes sont des cellules partageant à la fois les caractéristiques des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Ces cellules possèdent un réticulum endoplasmique

rugueux bien visible tout comme les fibroblastes et possèdent des myofilaments contractiles comme les cellules musculaires lisses. Elles sont caractérisées par l'expression de plusieurs marqueurs, en particulier des protéines du cytosquelette spécifiques aux fibroblastes comme la vimentine et spécifiques aux cellules musculaires lisses comme l' α -actine. Elles expriment également le pro-collagène I et la tenascine formant la MEC et sous-expriment la calponine et la myosine.

L'importance des myofibroblastes est mis en évidence par le fait qu'ils apparaissent systématiquement dans les zones de lésions bordant les tumeurs épithéliales et ce, à des stades relativement précoces comme la néoplasie intraépithéliale (Karlou *et al.*, 2010). De plus, l'activité myofibroblastique est directement corrélée au grade du cancer (Tuxhorn *et al.*, 2002). En effet, il a été observé que dans les cancers prostatiques de score de Gleason 3, le stroma réactif se compose de 50% de fibroblastes « normaux » et de 50% de myofibroblastes, alors que le stroma d'un cancer avec un score de Gleason 4 est composé essentiellement de myofibroblastes (Tuxhorn *et al.*, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002).

Des études expérimentales ont démontré que la formation de myofibroblastes n'est pas seulement une réaction passive à la tumeur mais également une source de signaux qui améliorent la tumorigénécité. Par exemple, des expériences de co-culture ont montré que les CAF stimulaient la croissance et la formation tumorale à partir de lignées cellulaires prostatiques « normales » (Olumi *et al.*, 1999; Barclay *et al.*, 2005) alors qu'à l'inverse les fibroblastes non-activés étaient capables de redifférencier les cellules tumorales vers un phénotype moins agressif (Hayashi et Cunha, 1991).

1. Origines des CAF

L'origine des fibroblastes qui composent les CAF fait encore actuellement l'objet de nombreuses études tant les possibilités sont nombreuses et met en place de nombreux concepts.

a. Transdifférenciation des fibroblastes résidents

Le principal concerne une conversion ou transformation des fibroblastes résidents en un état activé appelé transition mésenchymo-mésenchymateuse (Cat *et al.*, 2006). Cette transition serait facilitée par les fortes concentrations en facteurs de croissance sécrétées par les cellules tumorales ainsi que les cellules inflammatoires recrutées. Le facteur le plus connu intervenant dans cette transdifférenciation est le TGF β 1 associé à SD1 α (stromal-derived factor 1 α) qui participent à l'acquisition et au maintien du phénotype myofibroblastique (Kojima *et al.*, 2010) *via* la voie de signalisation NOX4/ROS liée aux espèces réactives de l'oxygène (ROS,

reactive oxygen species) (Sampson *et al.*, 2011). D'autres facteurs de croissance sont également capables d'induire cette transition des fibroblastes résidents comme le PDGF α et β , le FGF-2 ainsi que l'IL-6 sécrétés par les cellules tumorales (Okada *et al.*, 2000; Shao *et al.*, 2000; Giannoni *et al.*, 2010). Enfin, La force mécanique et le stress compressif induits par l'expansion des cellules tumorales sur les fibroblastes seraient également capables d'induire la conversion de fibroblastes en myofibroblastes comme cela a été montré par des études utilisant des plateformes microfluidiques (Ao *et al.*, 2015).

b. Les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse

Le deuxième type cellulaire pouvant être considéré comme progéniteur des CAFs comporte les cellules souches mésenchymateuses (mesenchymal stem cells, MSC) caractérisées par l'expression de plusieurs marqueurs dont CD44, CD71, CD73... (Bernardo *et al.*, 2009). Les MSC sont des cellules stromales multipotentes qui ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires dépendant des conditions d'induction et participent à de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Bergfeld et DeClerck, 2010). Ces cellules ont la particularité d'être mobilisées vers les sites sujets à des lésions telles que l'inflammation ou la néoplasie et seraient recrutées par les facteurs de croissance et cytokines produits par les cellules tumorales ainsi que le stroma réactif. Ces facteurs comprennent le VEGF, l'HGF, le FGF-2, le PDGF, l'EGF ou encore CCL2 (C-C motif ligand 2) (Dwyer *et al.*, 2007; Spaeth *et al.*, 2008; Feng et Chen, 2009). En réponse à ces facteurs, les MSC se différencieraient en CAFs, une fois arrivées à l'intérieur de la masse tumorale. Ces cellules ne proviendraient pas seulement de la moelle osseuse mais également d'autres tissus où elles seraient dans un état dormant.

c. La transition épithélio mésenchymateuse (Epithelial to mesenchymal transition, EMT)

L'EMT est un processus particulier observé durant le développement ainsi que durant l'évolution de plusieurs cancers mettant en place un programme transcriptionnel épigénétique complexe. Ce processus va alors permettre aux cellules épithéliales tumorales d'acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Cela va se caractériser par la diminution des contacts intercellulaires en réprimant des protéines membranaires comme l'E-Cadhérine et par l'acquisition de capacités invasives importantes leur permettant d'envahir la MEC puis de métastaser vers des organes distants. Une fois les organes atteints, les cellules vont subir une transition inverse appelée transition mésenchymo-épithéliale (mesenchymal to epithelial transition, MET) afin de se redévelopper au sein de l'organe nouvellement colonisé (Acloque *et al.*, 2009; Thiery *et al.*, 2009). Cette transition peut être induite par plusieurs facteurs de

croissance incluant le PDGF, le TGF β , l'EGF, et l'HGF médiée par l'activation et la translocation nucléaire de nombreux facteurs de transcription tels que Snai1, Slug, Twist et FOXC2 (Medici *et al.*, 2008; Kalluri et Weinberg, 2009). Dans les cancers de la prostate, l'EMT serait principalement induite par plusieurs cellules stromales prostatiques (Orr *et al.*, 2012) étant capable de générer des CAFs directement à partir des cellules tumorales (Radisky *et al.*, 2007). Cependant, la formation des CAFs se mettant en place relativement tôt dans la tumorigenèse et les CAFs ne montrant pas de réarrangements chromosomiques contrairement aux cellules tumorales, la possibilité que l'EMT soit à l'origine de ces cellules est peu probable (Haviv *et al.*, 2009).

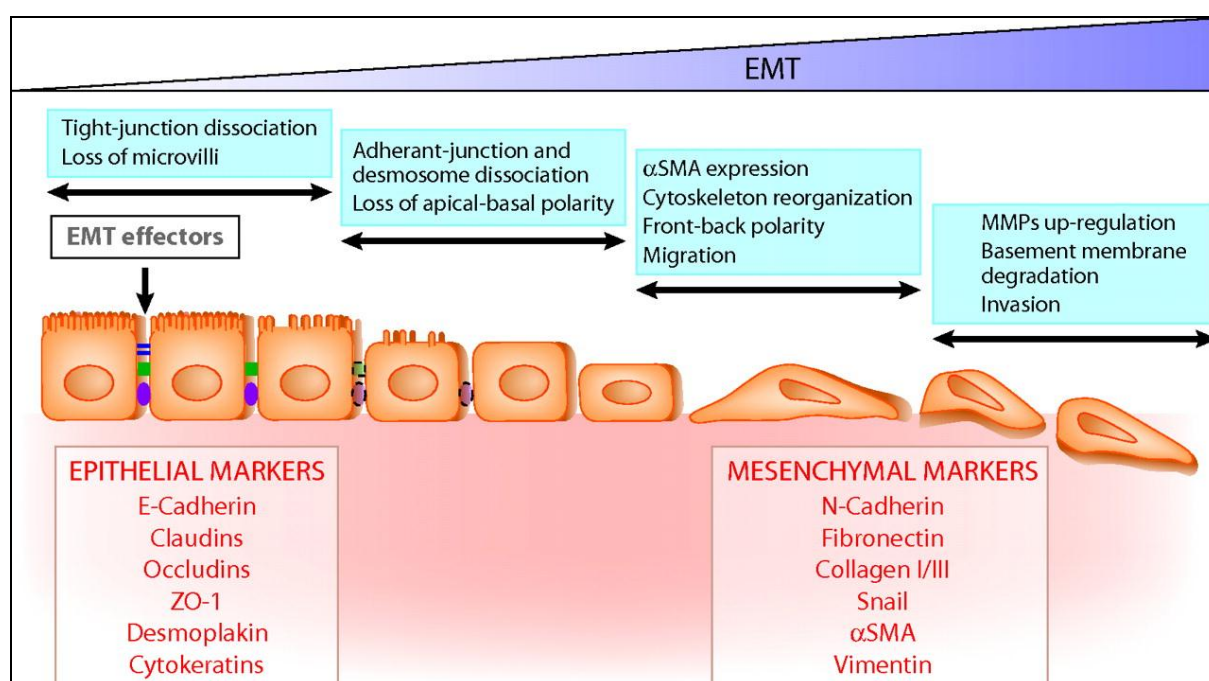


Figure 19 : La transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT (Epithelial to mesenchymal transition) (Aroeira *et al.*, 2007).

d. La transition endothélio-mésenchymateuse (endothelial to mesenchymal transition, EndMT)

L'EndMT est un autre type de transdifférenciation cellulaire similaire à l'EMT où les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins sont capables d'acquérir un phénotype de myofibroblastes ou de cellules musculaires lisses. Ces cellules vont perdre leurs jonctions intercellulaires et sous-exprimer les marqueurs endothéliaux (VWF, CD31, CD34...) tout en exprimant des marqueurs mésenchymateux comme FSP1 ou encore l' α -actine. Cette transition a principalement lieu pendant le développement du cœur mais peut aussi être observé après la naissance dans de nombreuses pathologies dont la fibrose et le cancer (Stresemann *et al.*, 2006; Zeisberg *et al.*, 2007). En effet, des études *in vivo* réalisées sur des

modèles de souris de mélanomes et de cancer pancréatiques ont montré qu'il existait une population de CAFs potentiellement issue de l'EndMT où les cellules co-exprimaient CD31 (marqueur endothéliale) avec FSP1 ou l' α -actine (Zeisberg *et al.*, 2007). Ainsi, dans le CaP où le rôle des CAFs est important, les cellules endothéliales pourraient également constituer un pool de cellules qui supporte la formation de CAFs.

e. Les péricytes

Dernièrement, les péricytes qui sont des cellules périvasculaires ont également été proposés comme une source potentielle pour la formation de CAFs. Ces cellules pourraient représenter une sous-population qui est mobilisée en fonction des besoins des cellules tumorales. En effet, les péricytes expriment de nombreux marqueurs communs avec les CAFs tels que le NG2, PDGFR β ou encore Thy-1 qui sont retrouvés dans les zones où les péricytes résident mais également dans la masse tumorale (Sugimoto *et al.*, 2006).

f. Les fibroblastes sénescents

Bien qu'on ne puisse pas les considérer à part entière comme des CAFs, les fibroblastes sénescents contribueraient également au développement du cancer. La sénescence correspond à un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G0/G1 où les cellules ne se divisent plus mais restent métaboliquement actives (Roninson, 2003; Povysil *et al.*, 2008). Cette sénescence est causée par plusieurs conditions stressantes telles que l'exposition aux ROS, les carcinogènes, les irradiations ainsi que le raccourcissement des télomères augmentant avec l'âge (dans ce cas, on parle de sénescence répllicative). Ces cellules font intégralement parties du stroma tumoral prostatique, leur fréquence augmentant chez les personnes âgées les plus touchées par le CaP et participent activement au soutien des cellules tumorales. En effet, des études ont montré que les fibroblastes isolés d'hommes de plus de 60 ans exprimaient de manière importante des chimiokines pro-inflammatoires ainsi qu'un certain nombre de cytokines propices au développement du cancer appelés les SASP (senescence associated secreted proteins) (Coppe *et al.*, 2008) comparés aux fibroblastes isolés d'hommes plus jeunes (< 50 ans). De même, les expérimentateurs ont montré que les cellules prostatiques épithéliales de la lignée BPH1 (Benign prostatic hyperplasia) proliféraient davantage lorsqu'elles étaient exposées avec le milieu conditionné (MC) de fibroblastes sénescents et suivant des expériences de co-cultures comparées aux conditions contrôle avec des fibroblastes non sénescents (Eyman *et al.*, 2009).

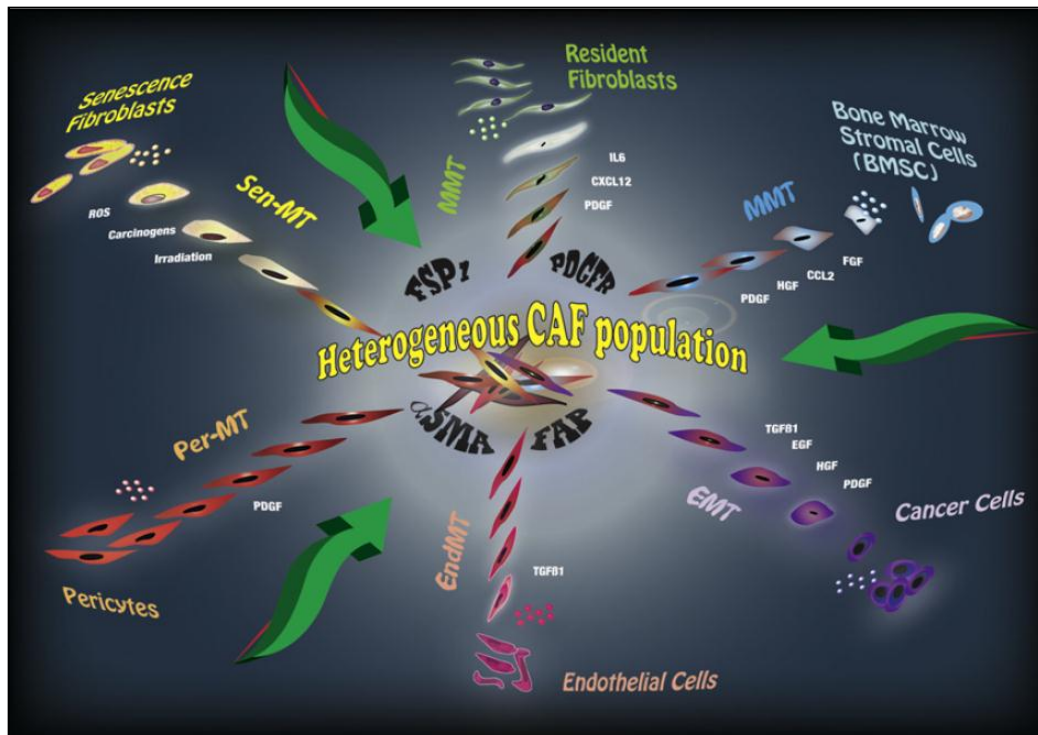


Figure 20 : Les différentes origines potentielles des CAF (Franco et Hayward, 2012).

2. Sécrétome des CAFs

Une fois activé par les cellules tumorales et inflammatoires, les myofibroblastes vont en retour sécréter un grand nombre de protéines dont de nombreux composants de la MEC (comme les fibres de collagène, la fibronectine, la ténascine, la laminine, la galectine...) ainsi que des protéases, des facteurs de croissance et des cytokines. L'ensemble de ces facteurs solubles et insolubles va alors promouvoir un environnement propice à la croissance, la migration et l'invasion des cellules tumorales ainsi qu'à l'angiogenèse et à l'échappement au système immunitaire (Hanson *et al.*, 2006; Cano *et al.*, 2007; Rodriguez-Canales *et al.*, 2007).

a. Les facteurs de croissance et cytokines

Contrairement aux fibroblastes normaux, les CAFs possèdent une forte activité sécrétrice, souvent indépendante de la concentration en androgènes, constituée de facteurs de croissance et de cytokines, tels que : HGF, VEGF, EGF, TGF β , IGF-1, FGF, PDGF, SDF-1 ou encore les Interleukines 6 et 8 (Pollak *et al.*, 1998; Micke et Ostman, 2004; Josson *et al.*, 2010; Orr *et al.*, 2012). Les effets de ces facteurs de croissance vont être différents au sein du cancer notamment par des différences de concentration et suivant les modifications dans les voies de signalisation intracellulaire acquises par les cellules tumorales.

-Le **TGF β** constitue l'un des facteurs de croissance les plus importants de la prostate. Ce facteur sécrété par les cellules musculaires lisses du stroma prostatique, participe activement à l'homéostasie en contribuant à la synthèse des protéines de la MEC et en maintenant la différenciation des cellules épithéliales au niveau des différentes strates du tissu glandulaire. De plus, le TGF β contrôle la croissance des cellules tumorales en inhibant leur prolifération et en induisant l'apoptose de ces cellules.

Dans le cadre du cancer de la prostate, l'expression de TGF β est fortement augmentée à la fois dans l'épithélium et le stroma prostatique. De plus, au fur et à mesure que le cancer progresse, les cellules cancéreuses deviennent insensibles à l'inhibition de croissance normalement induite par ce facteur (Bello-DeOcampo et Tindall, 2003; Danielpour, 2005). Le TGF β favorise alors la carcinogénèse en induisant l'EMT des cellules tumorales augmentant leur potentiel invasif, mais également en induisant la transdifférenciation des fibroblastes résidents en myofibroblastes. De plus, il a été montré que le TGF β pouvait stimuler l'angiogénèse, inhiber la surveillance immunitaire et favoriser la dégradation de la MEC (Bhowmick *et al.*, 2004). Une forte expression de TGF β associée à une diminution importante de l'un de ses récepteurs, T β RII (responsable de l'induction d'apoptose dans les cellules épithéliales) indiquent un CaP avancé associé à un faible pronostic vital. Enfin, plusieurs études *in vivo* ont montré que la répression de T β RII favorisait la formation de métastases (Tu *et al.*, 2003).

- **L'IGF-1** est un facteur hautement mitogénique sécrété par les cellules stromales qui assure la prolifération et la survie des cellules épithéliales prostatiques suivant la fixation sur son récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, IGF-R *via* la voie PI3K/Akt ou encore la voie des MAPK (Dillin *et al.*, 2002). Dans la prostate normale, la voie IGF-1 est inhibée par des protéines de haute affinité, les IGFBPs (IGF-binding proteins) qui séquestrent à plus de 99% l'IGF-1 libre, l'empêchant de se fixer sur son récepteur (Grimberg et Cohen, 2000; Djavan *et al.*, 2001). L'expression des IGFBPs est essentiellement régulée par les voies de signalisation classiques (SMAD) induites par le TGF β (Nickerson *et al.*, 1997; Gajewska et Motyl, 2004). Dans les CaP, l'IGF-1 est surexprimé et des IGFBPs comme IGFBP 3 sont réprimées, les voies de signalisation du TGF β étant altérées menant à une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales tumorales prostatiques (Tennant *et al.*, 1996). Il existerait une corrélation directe entre les taux plasmatiques importants d'IGF-1 libre et la progression du cancer en faisant un marqueur pronostic prometteur (Stattin *et al.*, 2004).

- **L'HGF ou scatter factor** qui agit *via* le récepteur transmembranaire c-Met exprimé par les cellules tumorales et endothéliales, est une cytokine capable de stimuler la prolifération, et en

particulier, la motilité et la morphogénèse dont l'EMT des cellules épithéliales (Takayama *et al.*, 1997) ainsi que l'angiogénèse (Bussolino *et al.*, 1992; Shojaei *et al.*, 2010). Dans les stades avancés de CaP, c-Met est surexprimé (Pisters *et al.*, 1995) et associé à une importante sécrétion d'HGF par le stroma réactif. Les voies de signalisation induites par l'HGF *via* l'activation de son récepteur c-Met sont connues pour favoriser la progression tumorale et les métastases dans de nombreux cancers dont celui de la prostate. Des taux élevés d'HGF dans le sang sont systématiquement observés chez les patients atteints de CaP ayant métastasé contrairement à des patients qui ont un cancer localisé (Gupta *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2009). Enfin, les voies de signalisation mises en place par l'axe HGF/c-Met constituent un des mécanismes communs de résistance des cellules tumorales contre les thérapies ciblées (Yu *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2015).

- **Le VEGF** est l'un des principaux facteurs intervenant dans la formation des vaisseaux sanguins en stimulant la prolifération des cellules endothéliales suite à la fixation sur ses récepteurs localisés à la membrane des cellules endothéliales, VEGFR (Jackson *et al.*, 2002; Ferrara *et al.*, 2003). Dans le CaP, le VEGF est exprimé par les CAFs mais également par les cellules épithéliales tumorales jouant un rôle central dans l'angiogénèse tumorale et la néovascularisation. La formation de ces vaisseaux va permettre le développement tumoral par un apport régulier en nutriments et en oxygène permettant de pallier à l'hypoxie ainsi qu'à la carence en nutriments (Muir *et al.*, 2006) et par la suite permettre aux cellules tumorales de se disséminer dans l'organisme *via* la circulation sanguine. Une forte expression de VEGF-C, une isoforme du VEGF, et de VEGFR-3, est associée avec la progression du CaP ainsi qu'à la présence de métastases dans les nœuds lymphatiques régionaux (Jennbacken *et al.*, 2005). La synthèse de VEGF est essentiellement régulée par les androgènes, l'hormonothérapie diminuant fortement son expression impactant ainsi négativement sur l'angiogénèse (Cheng *et al.*, 2004).

- **Le PDGF** est exprimé par de nombreux types cellulaires dont les CAFs, les cellules tumorales, les cellules endothéliales mais également les neurones. Ce facteur stimule la sécrétion de nombreux autres facteurs de croissance tels que le TGF β , l'IGF-1, l'HGF ou encore le FGF-2 ainsi que la prolifération et la motilité des cellules mésenchymateuses (Heldin *et al.*, 2002). De plus, ce facteur contribue à l'EMT des cellules tumorales améliorant leurs propriétés invasives (Kong *et al.*, 2008).

-**Le FGF** est abondamment exprimé par les cellules stromales du cancer prostatique et se compose de nombreuses isoformes qui exercent des effets paracrines sur les cellules tumorales et endothéliales mais également des effets autocrines sur les CAFs induisant de très

nombreuses fonctions comme l'angiogenèse, la prolifération, la résistance à l'apoptose, la motilité, l'invasion, la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie ainsi que la résistance à l'hormonothérapie des cellules épithéliales tumorales, FGF-7 et FGF-8 étant capables d'interagir avec le récepteur aux androgènes (Kwabi-Addo *et al.*, 2004).

-**L'EGF** est un facteur sécrété de manière importante par les cellules tumorales et stromales, bien connu pour son implication dans la progression de nombreux cancers dont celui de la prostate. Ce facteur de croissance intervient principalement dans la prolifération des cellules tumorales dont les voies de signalisation régulent de nombreux gènes communs avec ceux régulés par AR constituant un mécanisme d'androgéno-indépendance permettant l'échappement thérapeutique (Oosterhoff *et al.*, 2005).

-**Le SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) ou CXCL12** est une chimiokine spécifiquement sécrétée par les CAFs qui stimule la croissance et la survie des cellules tumorales, la progression tumorale, la formation de métastases ainsi que l'angiogenèse. Ses effets sont assurés par sa fixation sur son récepteur CXCR4 exprimé à la membrane des cellules cancéreuses et des cellules endothéliales et induisant de nombreuses voies de signalisation dont PI3K/AKT, la voie des MAPK et NK- κ B. L'expression du récepteur CXCR4 dans le CaP est souvent associée à un faible pronostic, son expression étant fortement augmentée dans les cas de cancers métastatiques (Sun *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

- **L'interleukine 6** est fortement exprimée par les CAFs et intervient dans la régulation de la réponse immunitaire, la croissance cellulaire et la différenciation des cellules tumorales (Culig *et al.*, 2005). Elle participe également à l'angiogenèse en régulant l'expression de VEGF et a un rôle clé dans l'induction de la différenciation neuroendocrine (Lee *et al.*, 2007).

b. Remodelage de la MEC

Les protéines constituant la MEC jouent un rôle clé dans l'adhésion et la signalisation cellulaire et participent activement à l'invasion des cellules tumorales. En effet, la formation du stroma réactif lié à la tumorigenèse va complètement remodeler la MEC principalement *via* les sécrétions des myofibroblastes. Parmi ces protéines de la MEC qui participent au développement du cancer, il y a :

- **Les métalloprotéinases (MMP)**. Ces protéases, en particulier MMP-2, MMP-3 et MMP-9 sont connues pour être fortement sécrétées à des stades avancés des cancers à la fois par les cellules cancéreuses épithéliales mais également par les CAFs afin de favoriser fortement l'invasion tumorale, l'inflammation et l'angiogenèse en dégradant de nombreuses protéines dont les protéines de la MEC (Bair *et al.*, 2005; Sounni et Noel, 2005).

- **Les fibres de collagènes.** Ces protéines fibrillaires forment un réseau tridimensionnel composant la MEC avec un rôle majeur dans le soutien des tissus leur conférant une résistance mécanique à l'étirement mais également un rôle important dans les processus de signalisation et de métabolisme intracellulaire. Dans le CaP, l'organisation du réseau de fibres de collagène est totalement altérée avec une diminution de la densité des fibres de collagène ainsi que des fibres réticulées (Pupa *et al.*, 2002; Taboga et Vidal Bde, 2003; Taylor et Risbridger, 2008). Cette désorganisation va permettre la création de nombreux espaces propices à l'angiogenèse ainsi que la formation de peptides de collagène de type I biologiquement actifs qui vont faciliter la prolifération et l'invasion des cellules tumorales (Tuxhorn *et al.*, 2001). En effet, le collagène de type I est capable d'induire une répression de l'E-Cadhérine qui intervient dans l'attachement des cellules tumorales entre elles. Cette répression améliore ainsi la motilité et la capacité invasive des cellules tumorales.

- **Les fibres élastiques.** Contrairement aux fibres de collagènes, elles confèrent une certaine flexibilité au tissu, et les peptides formés par leur dégradation participeraient également à la formation du stroma réactif ainsi qu'à l'invasion tumorale en stimulant des récepteurs exprimés par les cellules tumorales connus pour participer à la chimiotaxie (Pupa *et al.*, 2002; Goncalves *et al.*, 2015).

- **Les laminines** sont des molécules hétérotrimériques comportant une chaîne α , une chaîne β et une chaîne γ elles même composées de différentes isoformes qui composent la membrane basale. Les laminines sont associées à la différenciation cellulaire, le maintien de l'intégrité des tissus ainsi que de la lame basale et interviennent dans la motilité cellulaire. Durant le CaP, il a été observé une diminution significative des laminines dans les zones cancéreuses comparé au tissu prostatique adjacent encore sain morphologiquement (Tomas *et al.*, 2006). Cette diminution de la laminine serait liée à sa dégradation par des métalloprotéases comme MMP1 (membrane type 1 matrix metalloprotease). Cette dégradation affecte alors membrane basale et l'intégrité du tissu, ce qui participe à la transformation de la prostate et l'augmentation des capacités invasives des cellules tumorales (Bair *et al.*, 2005; Sounni et Noel, 2005; Tomas *et al.*, 2006).

- **La ténascine-c** est une glycoprotéine de haut poids moléculaire (180-300 kDa) qui est impliquée dans l'adhésion intercellulaire. Cette molécule possède des propriétés anti-adhésives dans le stroma en modulant les interactions entre les cellules *via* la fibronectine. Normalement, l'expression de ténascine est abolie une fois la maturation de la glande prostatique terminée. Cependant, plusieurs études ont reportées une augmentation importante

de son expression dans le stroma durant le CaP principalement dans les régions bordant les cellules tumorales, le ténascine ayant alors un rôle potentiel dans le développement du cancer (Chiquet-Ehrismann, 1993; Vollmer, 1997; Bair *et al.*, 2005).

- **La galéctine-3** tout comme la ténascine interagit avec de nombreuses molécules intervenant dans l'adhésion dont des glycoprotéines intracellulaires présentes dans les cellules épithéliales, des molécules de surface cellulaire mais également d'autres protéines constituant la MEC. Dans le PCa, la galéctine-3 est sous-réglée. De manière intéressante, des études ont montré que selon sa localisation dans les cellules cancéreuses épithéliales, la galéctine-3 impacterait différemment sur la carcinogenèse avec un effet pro-tumoral lorsqu'elle est située dans le noyau et un effet anti-tumoral lorsqu'elle est retrouvée dans le cytoplasme des cellules tumorales. En effet, l'expression cytoplasmique de galéctine-3 dans les cellules tumorales corrèlerait positivement avec la progression du CaP (Takenaka *et al.*, 2004). De plus, la galéctine-3 favoriserait la résistance à l'apoptose des cellules tumorales normalement induite par des agents chimiothérapeutiques par la régulation du facteur pro-apoptotique Bad et la suppression de la voie apoptotique mitochondriale (Fukumori *et al.*, 2006).

- **Le syndecan-2 (SDC2)** est un héparane sulfate qui participe comme les autres protéines de la MEC, à l'adhésion cellulaire et la migration jouant également un rôle dans la progression du cancer et la néoangiogenèse (Tkachenko *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009). La surexpression de SDC2 dans le CaP est associée à un mauvais pronostic avec un haut score de Gleason, un taux de PSA élevé et une extension extraprostatique (Popovic *et al.*, 2010).

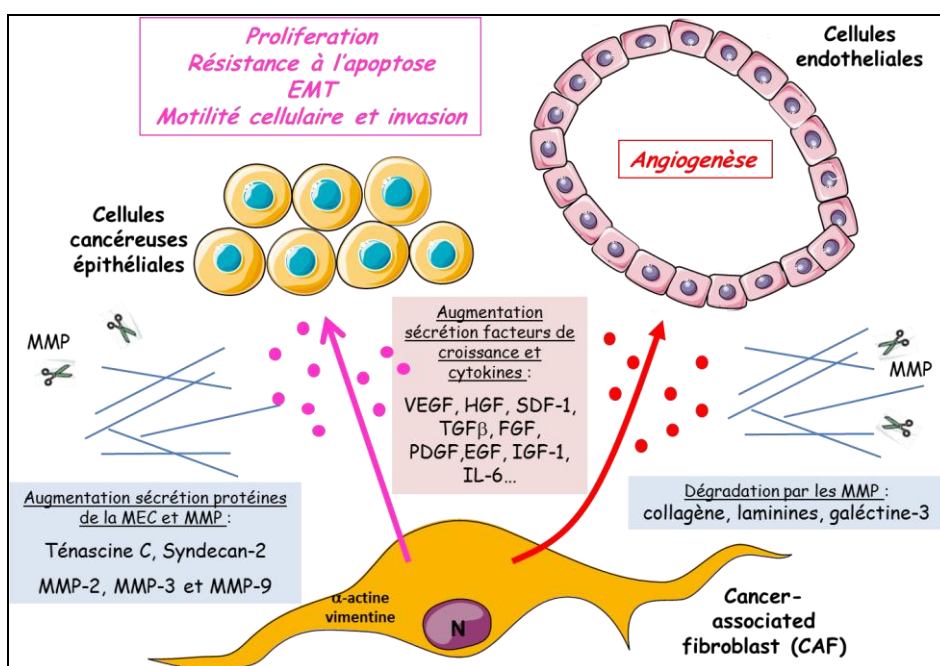


Figure 21 : Importance du sécrétome des CAF dans la tumorigenèse prostatique

Bien que les CAFs ou myofibroblastes représentent le type cellulaire majeur du stroma réactif avec un rôle clé dans le développement du CaP, la formation de métastases ainsi que la résistance aux différents traitements employés, il ne faut pas pour autant oublier les autres types cellulaires constituant le stroma tumoral qui ont également un rôle non négligeable dans la tumorigenèse et qui vont être brièvement décrits ci-dessous.

C. Les cellules endothéliales et l'angiogenèse

Les cellules endothéliales sont un type cellulaire fondamental dans la physiologie et la pathologie de nombreux organes tels que la prostate. En effet, ces cellules liées entre elles par des jonctions serrées constituent la face interne des vaisseaux sanguins et sont en contact direct avec le sang. Elles participent régulièrement à un processus appelé angiogenèse qui consiste en la formation de vaisseaux sanguins permettant le développement des tissus ainsi que la croissance tumorale et la dissémination métastatique dans le cadre de nombreux cancers dont celui de la prostate (Godoy *et al.*, 2008; Godoy *et al.*, 2011). La progression du cancer va être à l'origine de la création d'un environnement de plus en plus hypoxique et inflammatoire au sein de la tumeur induisant la formation de nouveaux vaisseaux afin d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à la croissance tumorale (Dvorak *et al.*, 1995). Cette néoangiogenèse dépendrait alors d'un switch angiogénique où il y aurait une dérégulation de l'homéostasie mise en place par les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales mais également par les autres cellules stromales associées au cancer. Cela concerne les CAFs qui agiraient sur leurs récepteurs respectifs présents sur la membrane des cellules endothéliales (Hanahan et Folkman, 1996; Eccles et Welch, 2007). Comparés aux vaisseaux du tissu sain, les nouveaux vaisseaux formés irriguant la tumeur sont désorganisés avec une structure irrégulière où les interactions entre les cellules endothéliales sont altérées et permettent aux cellules tumorales d'accéder à la circulation sanguine afin de métastaser (Folkman, 2006). En effet, dans le CaP, il y a une corrélation entre une augmentation de la densité des microvaisseaux tumoraux et un haut score de Gleason traduisant un pronostic vital faible (Gettman *et al.*, 1999). Suivant l'hormonothérapie, les cellules endothéliales prostatiques subissent une apoptose importante avec une diminution des microvaisseaux formées, la survie et la prolifération de ces cellules étant sous la dépendance des androgènes et des andromédines, comme le VEGF, sécrétées par les autres cellules stromales prostatiques (Shabsigh *et al.*, 1998; Shabsigh *et al.*, 1999). Cependant, avec l'évolution du cancer vers un stade castration-résistant associé au développement du stroma réactif, les microvaisseaux seraient régénérés rapidement augmentant fortement l'incidence des cancers métastatiques (Gustavsson *et al.*, 2005; Tomic *et al.*, 2012). Enfin, en plus de participer à la formation de vaisseaux, les cellules

endothéliales, tout comme les autres types cellulaires du stroma tumoral sécrètent de nombreux facteurs de croissance, chimiokines et cytokines comme l'IL-6 (Culig et Puhr, 2012) favorisant grandement le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales prostatiques.

D. Les macrophages associés à la tumeur ou TAM (Tumor-associated macrophages)

Le système immunitaire est essentiel pour lutter contre les anomalies provenant de l'extérieur mais également celles présentes au sein même de notre organisme comme les cellules cancéreuses. Ainsi, le système immunitaire est capable d'intervenir à des stades précoces comme la néoplasie dans le but d'éradiquer les menaces potentielles. Plusieurs types cellulaires représentant le système immunitaire inné et adaptatif sont alors recrutés comme les macrophages et cellules présentatrices d'antigène (Ag) ou encore les lymphocytes T (CD8+ et Natural Killer) afin de reconnaître et de détruire les cellules tumorales. Malheureusement, les cellules tumorales sont capables de supprimer les réponses immunitaires et d'échapper à leur destruction par de nombreux mécanismes inhibant l'activité des lymphocytes T, en altérant les Ag et leur présentation ou encore en recrutant plusieurs cellules immunitaires pour favoriser le développement du cancer. Les macrophages sont des cellules immunitaires innées qui proviennent de monocytes circulants eux-mêmes dérivés de la moelle osseuse et qui interviennent dans la défense de l'organisme et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Dans le cadre du cancer, ces précurseurs vont sortir de la circulation sanguine ou lymphatique pour atteindre la tumeur par extravasation et mûrir en macrophages dont le phénotype dépendra

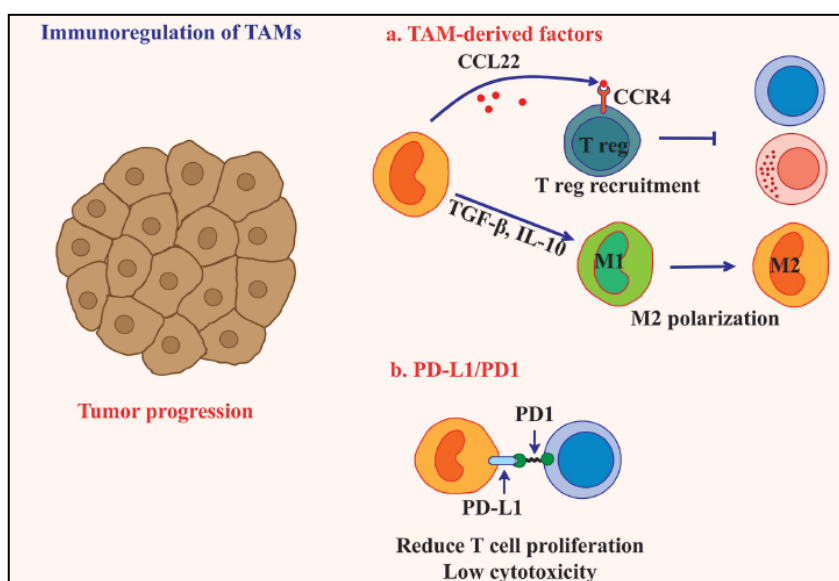


Figure 22 : Mise en place d'un environnement immunosuppresseur par les TAM permettant la progression tumorale (Chanmee *et al.*, 2014).

des stimuli auxquels ces monocytes seront soumis (Davies *et al.*, 2013). Ainsi, dans les stades précoces ou de régression du cancer, les macrophages sont polarisés dans un état dit M1 avec un phénotype pro-inflammatoire favorisant l'immunité anti-tumorale et des propriétés anti-tumorigènes. Dans des stades plus avancés, ces mêmes macrophages sont recrutés par les différents facteurs sécrétés par les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral pour être polarisé dans un état M2 et libérer de nombreux facteurs favorisant à la fois l'angiogenèse et la tumorigenèse (Gordon et Mantovani, 2011; Zaynagetdinov *et al.*, 2011). On parle alors de tumor-associated macrophages ou TAM qui en plus de promouvoir le développement et le phénotype invasif des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse, seraient capable de créer un environnement immunosuppresseur inhibant la suppression des cellules tumorales par les cellules du système immunitaire. Pour ce faire, les TAM qui possèdent une faible capacité de présentation d'Ag secrètent des facteurs immunosuppresseurs comme l'IL-10 et le TGF β qui vont induire une dysfonction et une diminution de la prolifération des lymphocytes T *via* l'expression de la protéine membranaire PD-L1 (programmed cell death 1) (Kuang *et al.*, 2009). Cette immunosuppression est également favorisée par le recrutement de lymphocytes T régulateurs infiltrant la tumeur *via* la CCL2 se fixant sur son récepteur CCR4 qui empêchent les autres lymphocytes T d'exercer leurs effets anti-tumoraux (Jellem *et al.*, 2001). Enfin, les TAM participeraient activement à la formation des niches pré-métastatiques ainsi qu'à la résistance des cellules tumorales face aux agents chimiothérapeutiques, en faisant un type cellulaire clé du stroma tumoral (Chanmee *et al.*, 2014). Une augmentation de l'infiltration des TAM dans les zones tumorales a été associée avec un faible pronostic vital dans de nombreux cancers incluant le sein, le colon et la vessie mais n'est pas bien établie pour le CaP où les études restent limitées (Gollapudi *et al.*, 2013).

E. Les fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques

Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au lien entre le système nerveux et la croissance tumorale. Le stroma prostatique est connu pour être abondamment innervé par des ramifications sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome contrôlant la croissance et assurant le maintien et l'homéostasie de la glande prostatique (McVary *et al.*, 1994; Farnsworth, 1999). Dans le cadre du cancer, plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo* ont montré l'influence que pouvaient avoir les nerfs, les cellules nerveuses et leurs sécrétions sur la prolifération tumorale ainsi que sur la dissémination métastatique (Simon *et al.*, 1980; Visintainer *et al.*, 1982; Thaker *et al.*, 2006; Schuller *et al.*, 2012). En effet, l'invasion périneurale qui consiste en la migration et le développement des cellules tumorales autour des fibres nerveuses natives, constituerait une nouvelle voie de dissémination des cellules tumorales et corrèle avec un mauvais pronostic dans les CaP

(Villers *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1998; Maru *et al.*, 2001). De plus, des études cliniques rétrospectives ont montré que des patients atteints de CaP qui prenaient des β -bloquants avaient des taux de récurrences et de mortalité plus faibles que les autres patients (Grytli *et al.*, 2013; Grytli *et al.*, 2014).

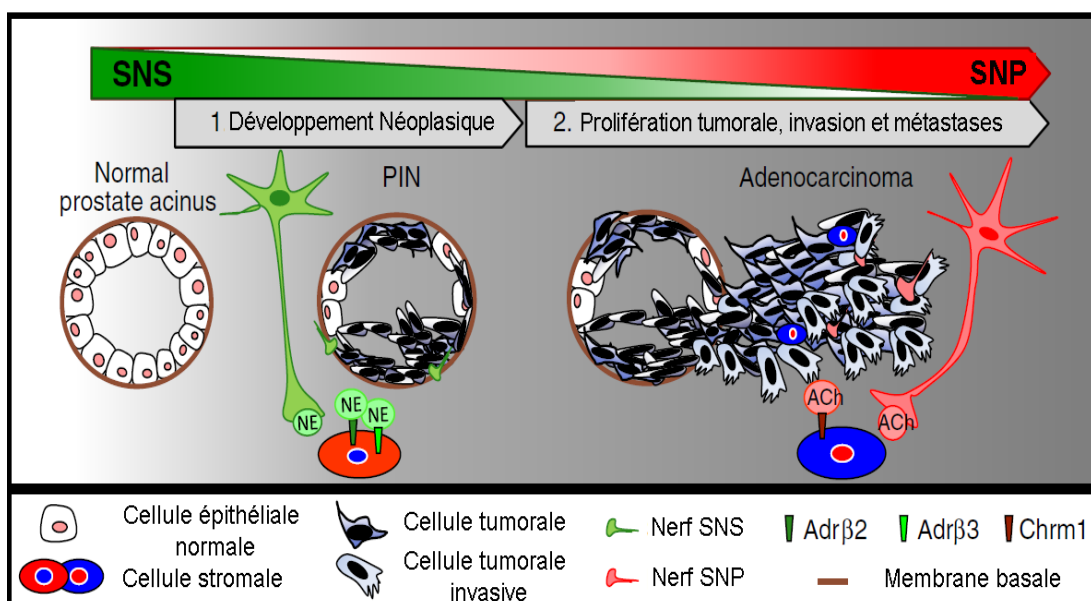


Figure 23 : Impact des nerfs du système nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNP) sur le développement du CaP. Ach, Acétylcholine. NE, Norépinephrine. D'après (Magnon *et al.*, 2013)

(Grytli *et al.*, 2013; Grytli *et al.*, 2014). Les dernières découvertes montrent qu'il existe dans le CaP, une neurogenèse (Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005) où la tumeur est infiltrée par un réseau de projections de nerfs autonomes nouvellement formés qui régulent l'initiation et la progression du cancer. Dans ce modèle, d'un côté les fibres adrénergiques du système nerveux sympathique libéreraient de la norépinephrine (NE) qui se fixe sur les récepteurs $\beta 2$ et $\beta 3$ adrénergiques exprimés par les cellules stromales afin d'assurer l'initiation du cancer pendant la néoplasie intra-épithéliale et la survie des cellules tumorales. D'un autre côté, les fibres cholinergique du système nerveux parasympathique infiltrent aussi la tumeur, libéreraient de l'acétylcholine (ACh) qui agit sur son récepteur muscarinique de type 1 également exprimé par les cellules stromales afin d'assurer la migration, l'invasion et la formation de métastases par les cellules tumorales à des stades plus avancés (Magnon *et al.*, 2013).

F. Les adipocytes associés au cancer ou CAA (cancer-associated adipocytes)

En plus des nombreux types cellulaires cités précédemment, la glande prostatique est entourée par du tissu adipeux périprostatique (periprostatic adipose tissue, PPAT) principalement composé d'adipocytes qui en plus de stocker l'énergie et les graisses, sont capables de sécréter des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines appelés « adipokines », en faisant des cellules endocrines particulièrement actives qui sont capables de supporter les cellules tumorales (Ouchi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Il a été observé une corrélation positive entre l'obésité caractérisée par une augmentation du PPAT associée à une altération de l'intégrité du tissu adipeux et le risque de CaP agressif avec une dissémination locale augmentée (Parker *et al.*, 2013). Tout comme pour les autres cellules stromales, les cellules tumorales envahissant le tissu adipeux sont capables de modifier les caractéristiques des adipocytes afin de favoriser leur propre développement en induisant la délipidation de ces cellules par lipolyse ainsi que l'acquisition d'un phénotype fibroblastique. Dans ce contexte, les adipocytes sont appelés cancer-associated adipocytes (CAA) (Dirat *et al.*, 2010; Dirat *et al.*, 2011) et supportent le développement du cancer en sécrétant des protéases, des cytokines pro-inflammatoires (IL-6) ainsi qu'en modulant le métabolisme des cellules tumorales par libération d'acides gras afin d'améliorer les capacités prolifératives et invasives de ces dernières (Wang *et al.*, 2012; Hefetz-Sela et Scherer, 2013). Récemment, une étude a montré que la dissémination locale des cellules tumorales serait liée aux CAA qui favorisent leur migration en sécrétant des chimiokines dont le gradient attirerait les cellules invasives hors de la tumeur primaire par chimiotactisme dans les cas d'obésités associés au CaP (Laurent *et al.*, 2016), ces cellules jouant ainsi un rôle clé dans l'évolution de la maladie.

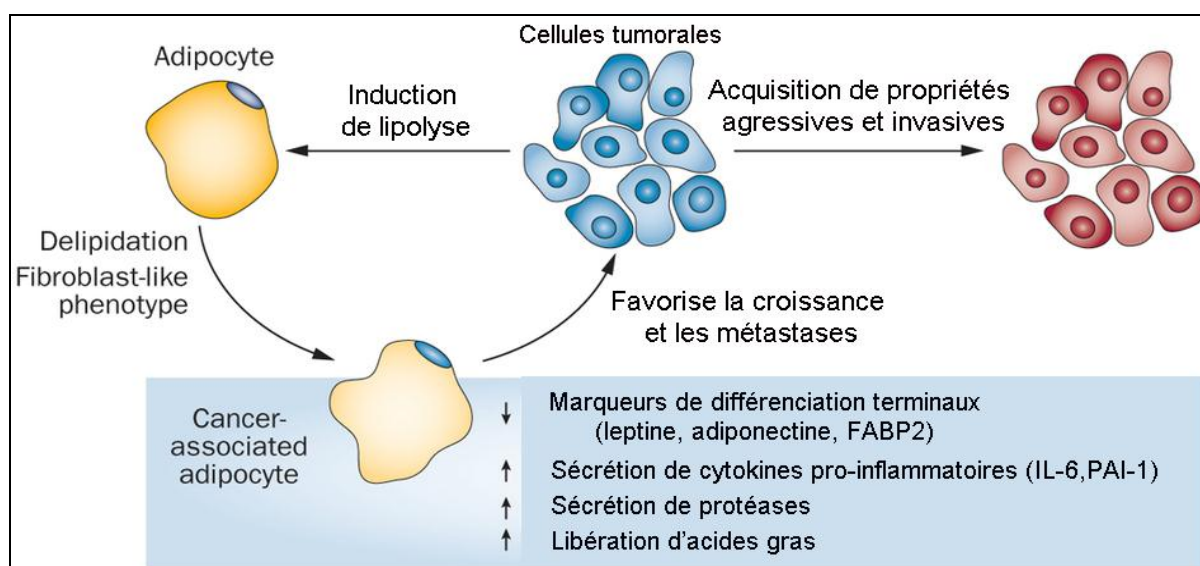


Figure 24 : Rôle des cancer-associated adipocytes dans la tumorigenèse prostatique. D'après (Park *et al.*, 2014).

G. Le récepteur aux androgènes dans le stroma

Comme cela a été décrit précédemment, dans la prostate saine, les cellules stromales sont en contact étroit avec les cellules épithéliales de manière à maintenir l'homéostasie du tissu glandulaire prostatique en limitant la prolifération et en favorisant la survie et le maintien de la différenciation de ces cellules. Cette homéostasie étant assurée par la sécrétion de nombreux facteurs appelés andromédines qui sont libérés sous la dépendance des androgènes. Ainsi, il est légitime de penser que l'hormonothérapie devrait être particulièrement efficace, l'absence de l'action des androgènes permettant d'induire un arrêt de la prolifération ainsi que l'apoptose des cellules tumorales en agissant à la fois sur les cellules épithéliales mais également sur les cellules stromales associées. Cependant, il a été observé dans de nombreuses études que l'expression d'AR stromal commençait à décliner à des stades relativement précoces comme la NIP de haut grade (Olapade-Olaopa *et al.*, 1999). Cette diminution d'AR stromal était significative dans les zones entourant les cellules cancéreuses comparée à la prostate bénigne (Li *et al.*, 2008). La diminution d'AR stromal serait directement corrélée avec une évolution de la maladie et des stades élevés de Gleason et serait davantage observée dans les cancers métastatiques et les cancers « castration-résistants » (Li *et al.*, 2008; Wikstrom *et al.*, 2009). En effet, des expériences mettant en place des co-cultures *in vitro* de cellules épithéliales tumorales et de cellules stromales (CAFs) ainsi que des xénogreffes *in vivo* ont montré que les cellules stromales n'exprimant pas AR (AR-) favorisaient la prolifération des cellules cancéreuses par la sécrétion de facteurs paracrine. Au contraire, les cellules stromales AR+, sous la dépendance des androgènes, inhiberaient la croissance des cellules tumorales. D'autre part, **en l'absence d'androgènes**, les cellules stromales AR+ seraient également capables de promouvoir la croissance des cellules tumorales prostatiques remettant en cause l'hormonothérapie majoritairement employée pour traiter le CaP (Tenniswood, 1986; Chang et Chung, 1989; Gleave *et al.*, 1991; Gleave *et al.*, 1992).

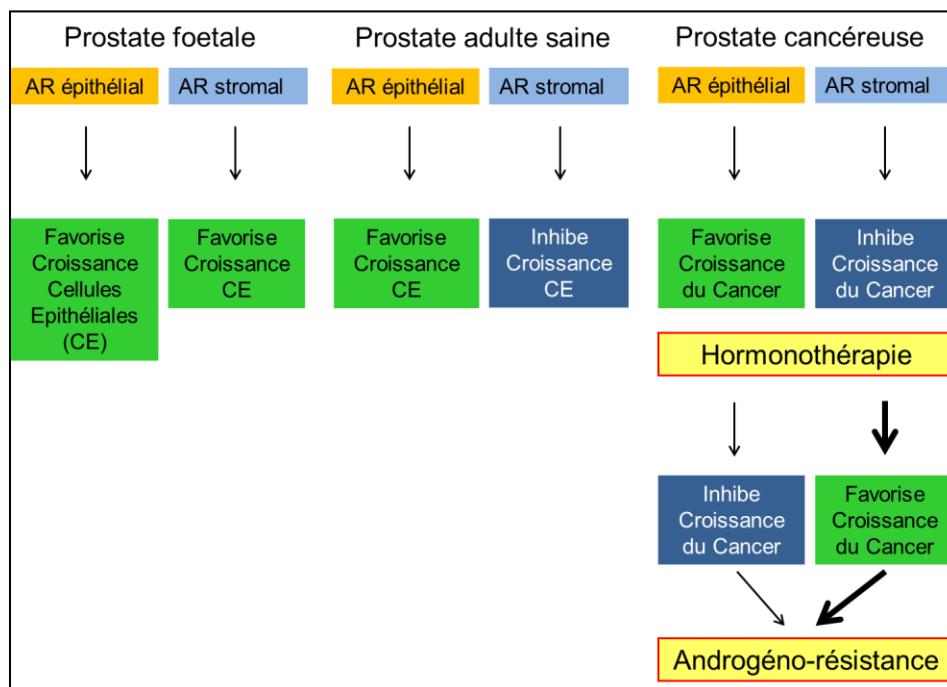


Figure 25 : Rôle d'AR dans la prostate de son développement fœtal au développement du cancer avant et après traitement. D'après (Singh *et al.*, 2014)

H. Le stroma métastatique

Lorsque le CaP évolue, les cellules tumorales vont métastaser pour se développer dans des tissus distants dont les os qui représentent le site métastatique le plus fréquent des CaP et la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de CaP. Tout comme pour la tumeur primaire, une fois installées dans le tissu osseux, les cellules tumorales vont entrer en interaction avec leur microenvironnement afin de favoriser leur propre développement. Ce stroma métastatique comporte des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales et des macrophages qui vont également participer au développement des métastases mais il est aussi composé des cellules responsables de la formation et du remodelage des os : les ostéoblastes participant à la minéralisation des os et les ostéoclastes participant à leur résorption. En plus de certains agonistes comme l'endothéline-1 (ET-1), les cellules tumorales sont capables « d'ostéomimétisme » en sécrétant de nombreuses protéines normalement restreintes au tissu osseux telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'osteonectine, la sialoprotéine osseuse ou encore la β 2-Microglobuline (β 2M) qui stimulent la croissance ostéoblastique ainsi que la maturation des ostéoclastes. En retour, le turnover osseux serait fortement augmenté avec (1) des ostéoblastes sécrétant plusieurs facteurs de croissance comme l'IGF-1, le TGF- β , le FGF, des BMP (bone morphogenetic proteins) mais également des nutriments et du calcium qui sont incorporés dans la matrice osseuse minéralisée et (2) les ostéoclastes qui par la sécrétion d'acides et de protéases favorisent le relargage de ces différents éléments par dégradation de la matrice osseuse nouvellement formée afin de permettre d'améliorer le développement et la capacité métastatique des

cellules tumorales nichées au sein du tissu osseux (Josson *et al.*, 2010; Rucci et Angelucci, 2014).

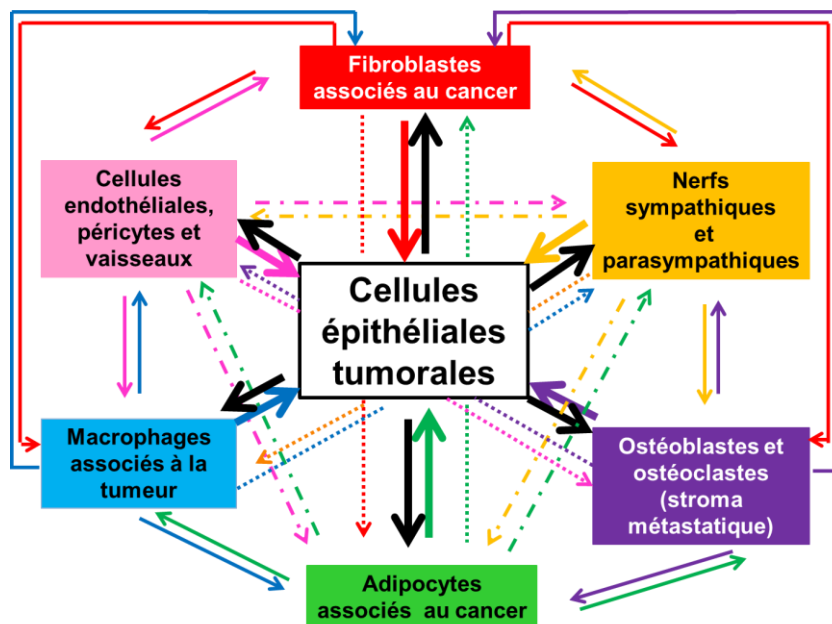


Figure 26 : Complexité des interactions réciproques entre les cellules du microenvironnement tumoral et les cellules épithéliales tumorales prostatiques. Les flèches symbolisent les interactions paracrines (sécrétions de facteurs solubles et insolubles) possibles entre chaque type cellulaire, ces derniers ayant également la capacité de s'auto-stimuler *via* la voie autocrine.

Le cancer de la prostate est une maladie complexe se caractérisant par des interactions mutuelles entre les cellules épithéliales cancéreuses et les différents types cellulaires composant le stroma tumoral du tissu primaire et des sites métastatiques. Alors que ce microenvironnement finement régulé par les androgènes participait au maintien de l'homéostasie de la glande prostatique et limitait la genèse tumorale par le contrôle de la croissance des cellules épithéliales, la physiologie du stroma va être irrémédiablement altérée par différents stress délétères tels que l'inflammation et l'hypoxie mais également par les cellules tumorales afin de favoriser leur propre développement. Les cellules cancéreuses prostatiques et le stroma tumoral vont alors co-évoluer de la naissance de la tumeur jusqu'à la formation de métastases et palier aux différents traitements utilisés contre les cellules tumorales via des interactions réciproques directes et impliquant un grand nombre de molécules (hormones, facteurs de croissance, cytokines, chimiokines, MMP, protéines de la MEC...).

Ainsi, l'amélioration des thérapies actuelles des CaP et le développement de nouvelles approches doit se faire par le ciblage des interactions épithélio-stromales. Dans ce contexte, de nombreux travaux dont ceux de notre laboratoire ont montré que l'homéostasie calcique et les canaux ioniques exprimés par les cellules tumorales jouaient un rôle clé dans la tumorigenèse prostatique. Les canaux ioniques étant également exprimés par les cellules stromales et participant à la physiologie de ces cellules, l'étude de leur rôle dans le microenvironnement tumoral permettrait de caractériser de potentielles cibles thérapeutiques dans le cadre du traitement des CaP en interférant sur le dialogue épithélio-stromal pro-tumoral.

IV. Les canaux ioniques et le cancer

A. Rôle du calcium dans la physiologie cellulaire

Le calcium (Ca^{2+}) est un ion métallique alcalino-terreux qui est le cinquième élément le plus abondant de la croûte terrestre et le métal le plus abondant du corps humain (2% de la masse totale) participant à la formation des os et des dents mais ayant également un rôle physiologique fondamental au sein des cellules composant notre organisme. La vie serait impossible sans Ca^{2+} permettant les battements cardiaques, la contraction des muscles, l'activation du système immunitaire pour assurer la défense contre les pathogènes ou encore la libération des neurotransmetteurs afin d'assurer les fonctions cognitives. En effet, cet ion possède une grande réactivité chimique et module l'activité et la stabilité de nombreuses protéines auxquelles il est capable de se lier avec une forte affinité. Tout au long de la vie de l'individu, va se mettre en place une homéostasie calcique reposant sur un équilibre entre efflux et influx de part et d'autre de la membrane plasmique mais également entre libération et stockage des ions Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires principalement pourvus par les organites tels que le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries. Cette homéostasie se caractérise par le maintien d'un gradient de Ca^{2+} avec une concentration de l'ordre de 1 à 2 mM dans le milieu extracellulaire contre une concentration beaucoup plus faible de l'ordre de 100 nM dans le cytosol et de 300 à 500 μM dans le RE. Suite à l'ouverture de protéines transmembranaires appelées canaux calciques, ce gradient va être favorable à la mise en place d'une signalisation calcique consistant en une augmentation de calcium intracellulaire assurée par une entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Cette augmentation est également assurée par une libération des stocks calciques intracellulaires dans le cytosol afin de moduler le phénotype et l'activité de la cellule. Le Ca^{2+} est ainsi considéré comme un messager intracellulaire dont la signalisation détermine le phénotype cellulaire comme la prolifération, la différenciation,

l'apoptose, la migration, l'autophagie (Munaron *et al.*, 2004; Munaron *et al.*, 2004; Wang et El-Deiry, 2004) mais également la contraction, la sécrétion ainsi que l'excitabilité cellulaire (Berridge *et al.*, 2003). Ainsi, chaque phénotype cellulaire comporte une « signature calcique » propre caractérisée par l'amplitude, la durée, la fréquence et la localisation subcellulaire des signaux calciques engendrés (Berridge *et al.*, 1998).

L'ensemble des protéines intervenant dans la signalisation calcique et dans le maintien de l'homéostasie calcique est appelé : « calciosome » et comporte :

- Des canaux calciques assurant la diffusion facilitée du Ca^{2+} dont des canaux calciques voltages dépendants (VOC pour Voltage-Operated Channel) activés suite à un changement du potentiel membranaire, des canaux calciques chimio-dépendants (ROC pour Receptor-Operated Channel) dont l'ouverture est consécutive à la fixation d'un ligand sur son récepteur sans passer par les voies de signalisation intracellulaire, des canaux SMOCs (Second Messenger-Operated Channels) qui, contrairement aux ROCs, sont activés par les seconds messagers générés dans les voies de signalisation (Berridge, 1996), et enfin les SOCs (Store-Operated Channels) dont l'ouverture va être secondaire à la mobilisation des stocks calciques intracellulaires afin de permettre une entrée importante de Ca^{2+} dans le cytosol appelée entrée capacitive (Parekh et Penner, 1997) .

- Des canaux calciques présents au niveau des organites assurant la régulation des stocks calciques intracellulaires dont le récepteur à l' IP_3 (IP_3R), le récepteur à la Ryanodine (RyR) présents à la membrane du RE (Réticulum Endoplasmique) participant à la vidange des stocks calcique réticulaire dans le cytosol, les canaux de fuite également présents à la membrane du RE qui sont constitutivement ouverts pour laisser sortir le Ca^{2+} et enfin un uniport calcique VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) présent au niveau de la membrane mitochondriale externe participant à la captation de Ca^{2+} intracellulaire.

- Des pompes calciques ou Ca^{2+} ATPases dont l'ouverture est conditionnée par l'hydrolyse d'ATP en ADP comportant les pompes PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) exprimées à la membrane plasmique permettant d'extruder le Ca^{2+} et les pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) présentes sur la membrane du RE et permettant la recapture du Ca^{2+} cytosolique afin de régénérer les stocks réticulaires.

- Des échangeurs comme l'échangeur $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) qui permettent d'extruder le Ca^{2+} en utilisant l'énergie fournie par le gradient électrochimique de sodium (Na^+) : importation de 3 ions Na^+ contre sortie d'un ion Ca^{2+} hors de la cellule.

pour conséquence, le recrutement et la mobilisation de protéines d'échafaudages telles que les SNAREs ou la synaptotagmine capables de fixer le Ca^{2+} afin d'assurer la libération des neurotransmetteurs *via* l'exocytose dans un rayon de 200 nm (Augustine, 2001; Fernandez-Chacon *et al.*, 2001; Beaumont *et al.*, 2005). Un autre exemple de l'importance de cette localisation des signaux calciques concerne la régulation de l'activité des cellules musculaires lisses. En effet, il a été montré dans ces cellules que la genèse de pics calciques localisés va permettre l'activation de canaux potassiques et la relaxation musculaire alors que ces mêmes pics calciques lorsqu'ils sont étendus dans la cellule, vont être coordonnés pour générer une vague calcique se propageant dans tout le cytosol et entraînant la contraction musculaire (Nelson *et al.*, 1995; Porter *et al.*, 1998)

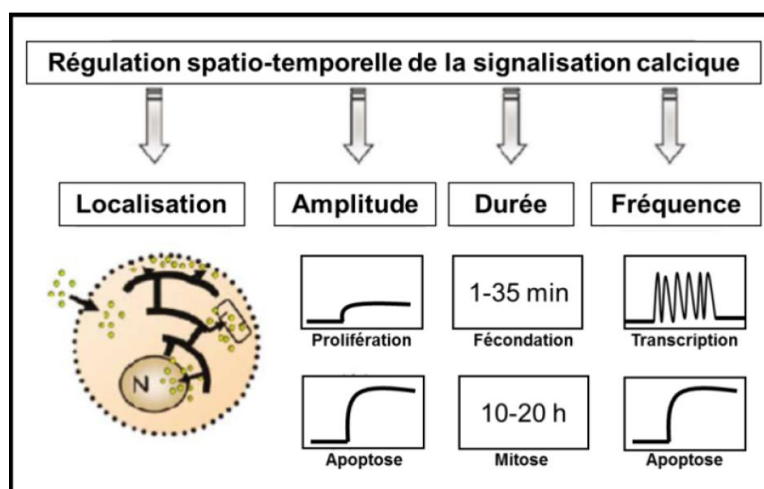


Figure 28 : Régulation spatio-temporelle du signal calcique, d'après (Prevarskaya *et al.*, 2007). Cette régulation est caractérisée par une «signature particulière» qui reflète la cinétique (durée et fréquence), l'amplitude et la localisation subcellulaire du signal calcique.

b. Cinétique du signal calcique

Les signaux calciques sont aussi régulés dans le temps. De même que pour sa localisation subcellulaire, la réponse calcique peut varier en fonction de la fréquence et/ou de la durée des oscillations calciques qui vont engendrer différentes réponses notamment en modulant le profil d'expression génique *via* le recrutement spécifique et la translocation de facteurs de transcription (Dolmetsch *et al.*, 1998). Ainsi, une élévation trop prolongée de la concentration en Ca^{2+} libre intracellulaire va induire la mort cellulaire (Vanoverberghe *et al.*, 2003) alors que des oscillations calciques répétées vont favoriser la translocation nucléaire du facteur de transcription Ca^{2+} dépendant NFAT afin d'assurer l'expression de gènes qui interviennent dans la prolifération cellulaire (Thebault *et al.*, 2003). Il a également été montré que la fréquence des oscillations calciques pouvaient favoriser la sécrétion cellulaire comme c'est le cas dans les cellules β pancréatiques où des oscillations calciques de hautes fréquences permettaient la sécrétion d'insuline (Berggren *et al.*, 2004).

c. Amplitude du signal calcique

Enfin, il existe de nombreuses protéines Ca^{2+} -senseur (calmoduline, calréticuline, calnexine, synaptotagmine, PKC...) qui possèdent des domaines particuliers tels que les domaines EF-hand ou C2 capables de fixer le calcium avec une certaine affinité délimitant un seuil de concentration calcique pour lequel ces protéines sont activées (Ikura, 1996). Ainsi, selon l'amplitude et l'intensité des signaux calciques, plusieurs protéines effectrices vont être spécifiquement recrutées afin d'assurer leurs effets biologiques dans la cellule comme la calmoduline dont le K_d est de $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ à $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ pour le Ca^{2+} (Chin et Means, 2000).

Ainsi, en fonction des variations de concentration en Ca^{2+} dans la cellule qu'elles soient fines ou importantes, localisées ou globales, simples ou oscillatoires, courtes ou maintenues, différentes protéines vont être mobilisées dont des facteurs de transcription afin d'assurer des effets phénotypiques diverses, ce qui illustre bien l'importance de la signalisation calcique dans la physiologie cellulaire.

2. Calcium et transcription

Comme cité précédemment, le Ca^{2+} est capable d'activer des protéines effectrices Ca^{2+} -senseur telles que des protéines kinases ou phosphatases qui, par des réactions en cascades, vont activer des facteurs de transcription afin de moduler l'expression de gènes intervenant dans la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la migration cellulaire (Alonso et Garcia-Sancho, 2011). Ces changements de concentration calcique affectent alors l'expression génique en agissant sur les effecteurs présents dans le cytoplasme qui vont transloquer au noyau ou induire la translocation des facteurs de transcription. De même, le Ca^{2+} peut affecter les effecteurs et les facteurs de transcription directement dans le noyau, le Ca^{2+} étant capable de passer à travers les pores nucléaires (Hardingham *et al.*, 1997)

Selon l'état de phosphorylation du facteur de transcription induit par le signal calcique, il y aura une modulation de sa localisation subcellulaire, de sa stabilité, de son activité transcriptionnelle, de son association avec des cofacteurs ou de sa capacité à effectuer un remodelage ciblé de la chromatine.

a. Régulation de l'expression génique par les kinases Ca^{2+} -dépendantes

Deux familles de kinases activées par le Ca^{2+} sont activement impliquées dans la modulation de l'expression génique : les Ca^{2+} /Calmoduline-dépendant kinases (CaMK) et les protéines kinases C (PKC) dont les cibles principales sont les facteurs de transcription CREB (Cyclic AMP Response Element Binding) et NF- κ B (Nuclear Factor kappa B).

- Les CaMK sont des sérine-thréonine kinases comportant 3 types : CaMKI, CaMKII et CaMKIV qui diffèrent selon leur structure (monomérique pour CaMKI et CaMKIV, multimérique pour CaMKII) mais qui ont en commun un domaine N-terminal responsable de l'activité catalytique et un domaine C-terminal régulateur où vient se fixer le complexe Ca^{2+} / calmoduline (Mellstrom *et al.*, 2008). En effet, le Ca^{2+} ne se fixe pas directement sur les CaMK pour les activer mais doit au préalable se fixer sur une protéine majoritairement impliquée dans la signalisation calcique appelée calmoduline. En général, la distribution cellulaire des CaMK est différente avec CaMKII plutôt situé dans le cytoplasme tandis que CaMKIV est exclusivement nucléaire, ces dernières ayant souvent un rôle antagoniste vis à vis de la phosphorylation de CREB. Ainsi, suivant une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le noyau, la CaMKIV va phosphoryler le facteur de transcription CREB sur son site activateur (Ser 133) et permettre à ce dernier de se fixer sur son élément de réponse CRE (Cyclic AMP Response element) et d'interagir avec un co-activateur, la CBP (CREB Binding Protein) également activé par les CaMK et le Ca^{2+} déclenchant la transcription de ses gènes cibles. A l'inverse, une augmentation de Ca^{2+} dans le cytoplasme va recruter la CaMKIV qui va transloquer au noyau afin de phosphoryler le facteur de transcription CREB sur son site inhibiteur (Ser 142) empêchant l'interaction avec CBP et la fixation sur CRE (Sun *et al.*, 1994; Coulon et Blanchard, 2001; Alonso et Garcia-Sancho, 2011). En plus de CREB, les CaMK sont responsables de la translocation du facteur NF- κ B (Alonso et Garcia-Sancho, 2011) mais sont également capables d'activer des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine telle que la methyl CpG-binding protein 2 (MeCP2) afin de réguler plus globalement la transcription de nombreux gènes (Zhou *et al.*, 2006; Buchthal *et al.*, 2012).

- Les PKC comptent de très nombreuses isoformes (plus de 11 recensées) classées en 3 groupes selon leur mode d'activation réalisé par la fixation de DAG (DiAcylGlycérol) et/ou de Ca^{2+} (Newton, 1995) et sont très souvent activées comme effecteurs de nombreuses voies de signalisation comme c'est le cas pour la PKC α activée secondairement dans les voies de transduction impliquant la phospholipase C β (PLC β). Plusieurs études ont montré un rôle important des PKC activées par le Ca^{2+} dans la régulation de l'expression génique, ces PKC étant capables, suite à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, tout comme les CaMK, d'assurer la translocation

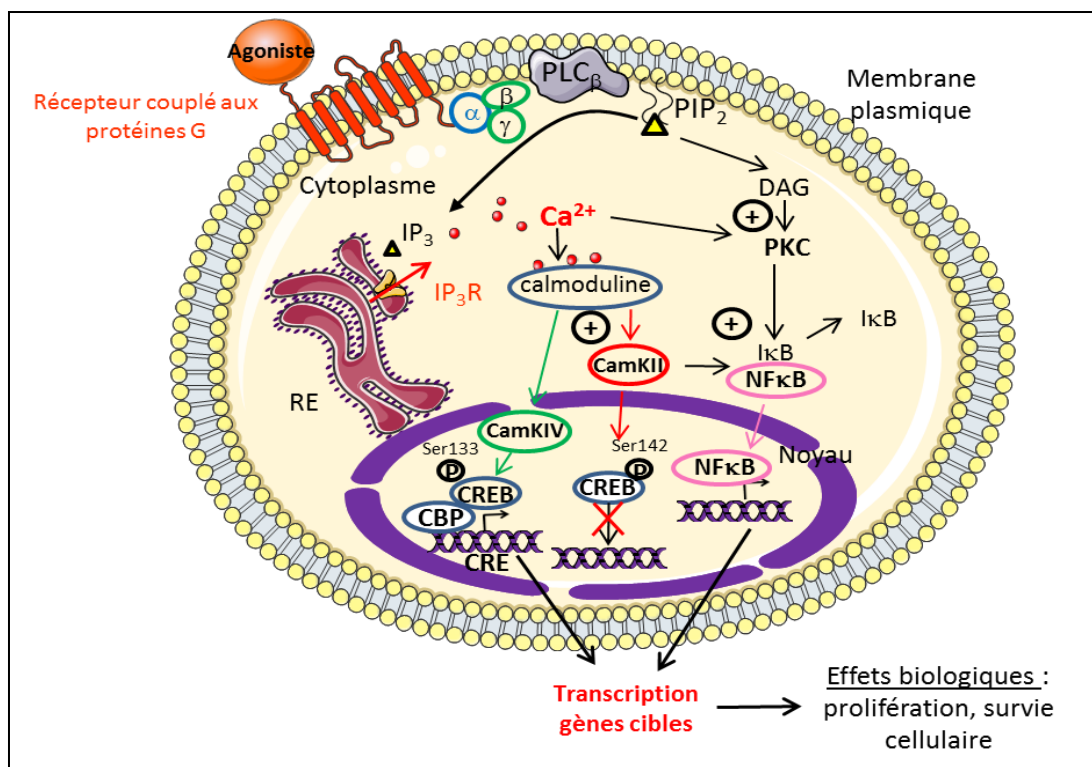


Figure 29 : Mécanismes de régulation de l'expression génique par les kinases Ca^{2+} dépendantes

nucléaire du facteur NF- κ B en phosphorylant une protéine associée à ce dernier nommée I κ B qui le séquestre dans le cytoplasme (Saijo *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2002). NF- κ B peut alors activer la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération (Hussain *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013). De plus, la PKC est également capable de moduler l'expression génique en modifiant la conformation de la chromatine, comme par exemple en modulant l'activité nucléaire de l'histone acétyltransférase (HAT) favorisant la formation d'une chromatine propice à la transcription de gènes intervenant dans la différenciation des cellules épidermiques (Dlugosz et Yuspa, 1993).

b. Régulation de l'expression génique par les phosphatases Ca^{2+} -dépendantes

La voie de transduction calcineurine/ NFAT constitue une voie de transduction majeure qui illustre bien le rôle des phosphatases Ca^{2+} dépendantes dans la régulation de la transcription. En effet, la calcineurine qui est une sérine/thréonine phosphatase capable de fixer le Ca^{2+} et la calmoduline va, suite à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, déphosphoryler le facteur de transcription NFAT présent dans le cytoplasme démasquant des domaines NLS (Nuclear Localization Sequence). Ce démasquage va permettre la translocation nucléaire de NFAT afin qu'il se fixe sur son élément de réponse et active la transcription de ses gènes cibles. Dès que le signal calcique est dissipé, des kinases présentes dans le noyau phosphorylent rapidement NFAT, qui quitte alors le compartiment nucléaire stoppant l'activité transcriptionnelle de ce dernier. Ainsi, le maintien de NFAT dans le noyau dépend de son état déphosphorylé grâce à une activation soutenue de la calcineurine (Coulon et Blanchard, 2001; Alonso et Garcia-Sancho, 2011).

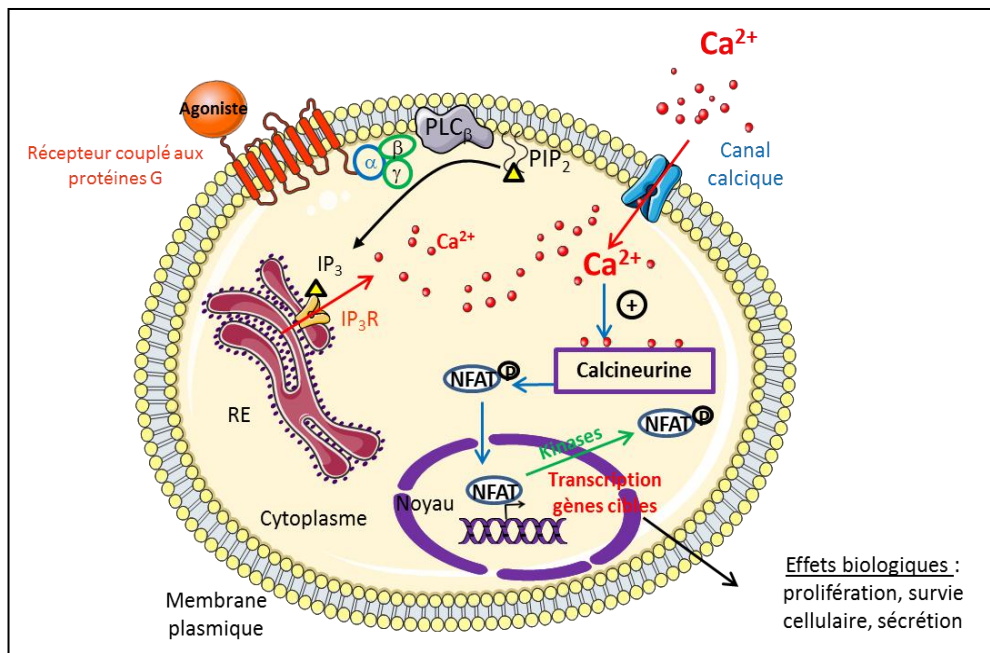


Figure 30 : Représentation schématique de la translocation calcium-dépendante du facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of Activated T-cells) dans le cas de la voie de transduction de la PLCβ.

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

En plus d'agir sur les effecteurs des voies de transduction et les facteurs de transcription, le Ca^{2+} est capable de directement réguler l'expression des gènes comme c'est le cas avec la protéine DREAM (Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator) aussi appelée calseniline et KChIP3, qui possède 4 sites de fixation de type EF hand lui permettant de fixer le Ca^{2+} (Carrion *et al.*, 1999). A des faibles concentrations calciques nucléaires, DREAM réprime la transcription *via* son interaction avec les sites DRE (Downstream Regulatory

Element) présents dans de nombreux gènes, en bloquant l'action du complexe d'initiation de la transcription (Alonso et Garcia-Sancho, 2011). Suite à une augmentation de Ca^{2+} nucléaire, la liaison directe du Ca^{2+} aux domaines EF-hand de DREAM diminue son affinité pour les sites DRE et favorise sa dissociation de l'ADN permettant la transcription des gènes cibles et illustrant bien la capacité du Ca^{2+} à directement moduler l'expression génique.

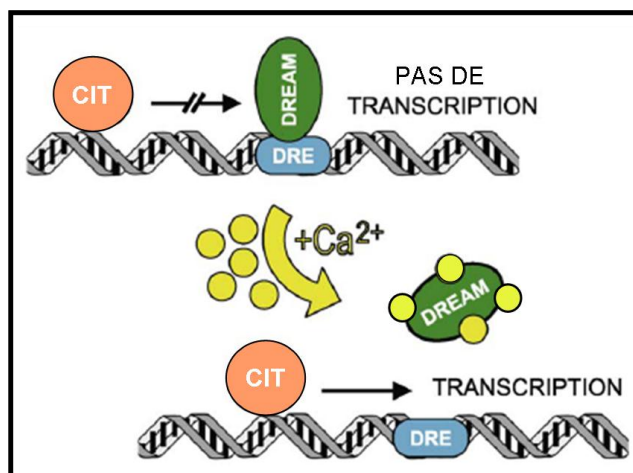


Figure 31 : Schématisation de la régulation transcriptionnelle par la protéine DREAM, d'après (Alonso et Garcia-Sancho, 2011). CIT = Complexe d'Initiation de la Transcription.

3. Importance du calcium dans la physiologie cellulaire

La signalisation calcique est activement impliquée dans de nombreux processus physiologiques dont la prolifération, l'apoptose, la migration cellulaire ou encore la sécrétion mettant en jeu un grand nombre de protéines effectrices Ca^{2+} dépendantes qui ont été décrites précédemment. Ainsi, une dérégulation de l'homéostasie calcique est propice à la mise en place et au développement de pathologies telles que le cancer, les cellules tumorales ayant des signatures calciques particulières leur permettant de se développer mais également de résister aux différents traitements utilisés pour induire leur apoptose. Il est donc important de bien comprendre comment le Ca^{2+} intervient dans la régulation du phénotype cellulaire afin de mieux comprendre les mécanismes de tumorigenèse calcium-dépendants.

a. Calcium et prolifération

Plusieurs voies de signalisation mettant en jeu le Ca^{2+} ont été montrées être impliquées dans la prolifération cellulaire, ces voies étant induites suite à la fixation de facteurs de croissance sur leurs récepteurs à activités tyrosine kinase (Coulon et Blanchard, 2001; Chandra et Angle, 2005) ou suite à la fixation de certains agonistes sur leurs récepteurs couplés aux protéines G (Rozengurt, 1992). C'est le cas de la voie de la phospholipase C (PLC), qui suite à son activation par une protéine G, va générer du DAG (DiAcylGlycérol) et de l' IP_3 à partir de

PIP₂, l'IP₃ se liant sur son récepteur IP₃R réticulaire afin d'entraîner la libération des stocks calciques du RE dans le cytosol (Fukami *et al.*, 2010). Ce Ca²⁺ est alors capable en association ou non avec le DAG, d'activer la PKC qui va assurer la translocation nucléaire de plusieurs facteurs de transcription comme le NF-κB et la transcription de gènes cibles intervenant dans la prolifération cellulaire [263, 264, 270, 271].

De nombreux travaux ont également montré que le Ca²⁺ jouait un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en intervenant au niveau de ses différents points de contrôle : le début de la phase G1, la transition G1/S et G2/M (Roderick et Cook, 2008). Par exemple, lors de la phase G1, une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire est observée où il y a recrutement de plusieurs enzymes effectrices comme les CaMKs qui sont capables de phosphoryler pRB1 (protéine du rétinoblastome 1) et d'activer des facteurs de transcription tels que jun, fos, myc ou encore CREB directement activé par les CaMKII et IV. Cela va avoir pour effet de favoriser la transcription des gènes précoces comme la cycline D1 intervenant dans la progression des cellules dans la phase G1 ainsi que la transition G1/S (Daniel *et al.*, 2014). De même, cette augmentation de Ca²⁺ est capable d'activer la calcineurine afin de déphosphoryler NFAT cytosolique et permettre sa translocation nucléaire et la transcription consécutive de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Putney, 2012).

b. Calcium et apoptose

Plusieurs voies de signalisation impliquant le calcium sont répertoriées comme étant inductrice d'apoptose, les plus connues étant : (1) la voie extrinsèque des récepteurs de mort activés par leur ligand spécifique (TGF-β, Fas ligand...) et (2) la voie intrinsèque mitochondriale impliquant les protéines de la famille Bcl-2, ces deux voies pouvant être mises en place en commun ou indépendamment (Galluzzi *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2015).

Ainsi, il a été montré qu'une concentration importante et soutenue de Ca²⁺ dans le cytosol était capable d'activer plusieurs protéines comme des endonucléases dégradant l'ADN (Robertson *et al.*, 2000) ainsi que des protéases Ca²⁺ dépendantes appelées calpaïnes à l'origine de la protéolyse d'un grand nombre de substrats protéiques. De nombreuses études ont montré l'implication des calpaïnes au cours de l'apoptose sur le clivage de molécules impliquées dans le programme apoptotique comme la protéine pro-apoptotique Bax dont la forme clivée amplifie la libération du cytochrome c et l'activation des caspases de manière Bcl-2 indépendante (Toyota *et al.*, 2003) ou encore le clivage de la pro-caspase 12 en caspase 12 active induisant l'apoptose. De même, cette augmentation importante de Ca²⁺ peut activer des calcineurines qui par déphosphorylation, vont-elles-mêmes activer des facteurs pro-apoptotiques comme Bad avec une activation consécutive de la caspase 3 menant à la mort cellulaire (Shou *et al.*, 2004).

Parallèlement à ces évènements cytosoliques, une vidange réticulaire prolongée peut également être inductrice d'apoptose. En effet, le RE constitue la principale source de calcium intracellulaire ainsi que le lieu de maturation des protéines nouvellement synthétisées. Ainsi, une altération de l'homéostasie calcique du RE est responsable d'un stress réticulaire empêchant les protéines d'acquérir une bonne conformation et induisant un flux maintenu et important de Ca^{2+} dans le cytosol. Ce flux peut alors lui-même induire des changements de conformation de facteurs pro-apoptotiques comme Bax et Bak (Zong *et al.*, 2003) ou encore mettre en jeu la protéine CHOP (C/EBP-homologous protein) capable d'inhiber le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Li *et al.*, 2014). Dans ce contexte de régulation de l'apoptose par le Ca^{2+} réticulaire, il a été montré que Bcl-2, grâce à son domaine N-terminal (site BH4) était capable d'inhiber IP_3R , principal canal responsable de la vidange des stocks calciques réticulaires afin d'améliorer la résistance des cellules à l'apoptose (Rong *et al.*, 2009; Monaco *et al.*, 2012).

Enfin, les mitochondries participent également au maintien de l'homéostasie calcique dans les cellules en captant une partie du Ca^{2+} par l'intermédiaire d'un uniport calcique. Ainsi, une trop forte augmentation de Ca^{2+} dans la cellule va entraîner une surcharge calcique mitochondriale qui, associée à la production de ROS (Reactive Oxygen Species), va participer à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) situé à l'interphase entre les membranes mitochondriales interne et externe et favorisant la libération des facteurs clés dans l'induction de l'apoptose tels que le cytochrome c ou encore AIF (Apoptosis inducing factor) (Galluzzi *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2015).

c. Calcium et migration

La migration cellulaire est connue pour être un processus Ca^{2+} -dépendant faisant intervenir un grand nombre de canaux ioniques et de transporteurs ainsi que de nombreux effecteurs Ca^{2+} -senseurs tels que la myosine, les intégrines, la calcineurine, les calpaïnes, les CaMK, la gelsoline ou encore la protéine S100 (Schwab *et al.*, 2012). La concentration en Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) régule la migration dans le temps et l'espace avec la mise en place d'un gradient de Ca^{2+} global. Pendant une vingtaine d'années, il était admis que ce gradient de Ca^{2+} se mettait en place le long de l'axe de la cellule où la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ était la plus importante à l'arrière des cellules et décroissante jusqu'au niveau du front de migration situé à l'avant (Brundage *et al.*, 1991; Hahn *et al.*, 1992). Cependant, il a été observé que dans les fibroblastes motiles, il existait de fortes augmentations de Ca^{2+} appelées « Ca^{2+} flickers » localisées dans des microdomaines principalement situés au niveau du front de migration où se forment les lamellipodes, extensions membranaires assurant la migration. Ces Ca^{2+} -flickers superposés au front global de migration de Ca^{2+} seraient responsables de la

polarisation cellulaire lors de la migration dirigeant les cellules vers une direction donnée en modulant l'adhésion cellulaire *via* des calcineurines et des calpaïnes. De plus, le Ca^{2+} est également impliqué dans la rétractation de l'arrière des cellules en mouvement en modulant *via* les effecteurs Ca^{2+} -senseurs le réseau d'actine/myosine ainsi que les protéines d'adhésion focales. L'implication de l'élévation transitoire de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ serait nécessaire à la motilité de nombreux types cellulaires tels que les cellules épithéliales cancéreuses, les neutrophiles, les cellules musculaires lisses vasculaires ou encore les neuroblastes illustrant bien l'importance du Ca^{2+} dans la migration cellulaire (Schwab *et al.*, 2012).

d. Calcium et sécrétion

Le Ca^{2+} joue également un rôle clé dans les communications paracrines entre les différents types cellulaires en participant aux phénomènes de sécrétion contrôlés par une élévation du taux de Ca^{2+} cytosolique. Cette augmentation est capable d'induire directement l'exocytose des vésicules contenant les hormones, facteurs de croissance, cytokines, neurotransmetteurs et autres peptides, le Ca^{2+} contrôlant la quantité et la cinétique des vésicules sécrétées (Berridge *et al.*, 2000; Martineau *et al.*, 2004; Gustavsson *et al.*, 2012). Les synapses de neurones représentent l'un des modèles les plus connus du rôle joué par le Ca^{2+} dans la sécrétion. En effet, suite à une dépolarisation membranaire, l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendants permet une entrée de Ca^{2+} dans la cellule qui va alors recruter et activer directement ou par l'intermédiaire d'effecteurs Ca^{2+} -senseurs (PKC, CaMK), les protéines intervenant dans le processus d'exocytose. L'exocytose consiste en la fusion de vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique de manière à permettre la libération de leur contenu dans le milieu extérieur (Mansvelder et Kits, 2000; Giancippoli *et al.*, 2006). Les protéines ayant un rôle majeur dans l'exocytose sont les SNAREs (Synaptic-soluble NSF Attachment protein REceptors) consistant en l'association des SNAREs de la membrane plasmique : la syntaxine-1 et SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa) avec une SNARE ancrée dans la membrane vésiculaire appelée synaptobrévine ou VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein) afin de permettre la fusion membranaire. On considère que la formation de ce complexe constitue la machinerie minimale pour assurer l'exocytose. La formation du complexe SNARE est déclenchée par une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hu *et al.*, 2002) qui va directement activer des kinases telles que PKC et CaMKII qui vont à leur tour, phosphoryler les protéines SNAREs mais également des protéines présentes sur les membranes plasmiques et vésiculaires et favorisant l'exocytose comme Munc-18 (Fujita *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 2000) ou encore les synapsines (Hilfiker *et al.*, 1999). Enfin, le Ca^{2+} est capable d'activer directement plusieurs protéines accessoires associées aux phospholipides membranaires dont le rôle est d'améliorer la précision spatiale et temporelle des SNAREs

conduisant l'exocytose. Ces protéines ont en commun un domaine C2, également possédé par PKC, qui tout comme le domaine EF-hand, est capable de directement lier le Ca^{2+} afin d'induire un changement de conformation de la protéine cible et favoriser l'exocytose. Ces protéines sont : la synaptotagmine, Munc13, RIM (Rab3-interacting molecule), Piccolo, la rabphilin 3A et Doc2 (double C2-domain protein) (Barclay *et al.*, 2005).

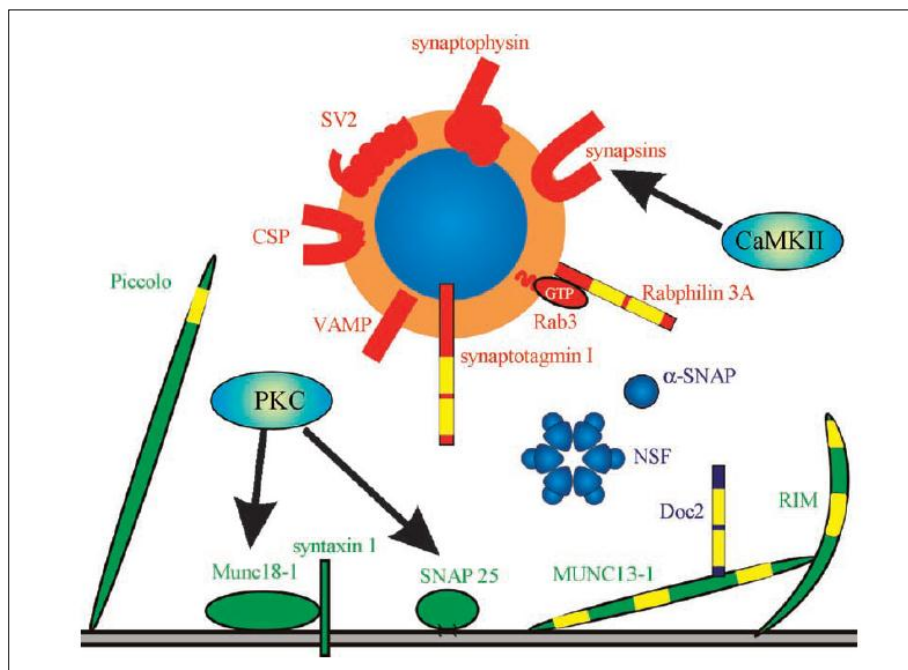


Figure 32 : Ensemble des protéines intervenant dans le phénomène d'exocytose Ca^{2+} - dépendant, les protéines fixant directement le Ca^{2+} ayant un ou plusieurs domaines C2 (en jaune) et les autres étant activées par des effecteurs Ca^{2+} dépendants tels que PKC et CaMKII afin de favoriser la formation du complexe SNARE et la fusion membranaire.

Le Ca^{2+} constitue donc un facteur majeur dans le contrôle des processus physiologiques, la régulation de sa concentration et de l'homéostasie calcique dans la cellule étant principalement régulée par l'ouverture de 2 types de canaux ioniques : les canaux calciques permettant une entrée de Ca^{2+} directe dans la cellule et les canaux potassiques permettant une modulation du potentiel de membrane favorable au driving force pour le Ca^{2+} situés au niveau de la membrane plasmique et des organites intracellulaires.

B. Canaux ioniques et homéostasie calcique

1. Les canaux calciques

Les canaux calciques sont des protéines transmembranaires dont le rôle est essentiel dans la cellule, formant des « pores » dont l'ouverture permet le passage rapide et sélectif d'ions Ca^{2+} au travers de la membrane plasmique et des membranes des organites dont le sens est fonction du gradient électrochimique avec un influx de Ca^{2+} et une vidange des stocks réticulaires dans le cytosol. Les canaux calciques peuvent être classés en fonction de leur mode d'activation : les canaux calciques voltages dépendants ou VOC (Voltage-Operated Channel) activés suite à un changement du potentiel membranaire, des canaux calciques chimio-dépendants (ROC pour Receptor-Operated Channel) dont l'ouverture est consécutive à la fixation d'un ligand sur son récepteur sans passer par les voies de signalisation intracellulaire. Il existe aussi des canaux SMOCs (Second Messenger-Operated Channels) qui contrairement aux ROCs sont activés par les seconds messagers générés dans les voies de signalisation (Berridge, 1996), et enfin les SOC (Store-Operated Channels) dont l'ouverture va être secondaire à la mobilisation des stocks calciques intracellulaires afin de permettre une entrée importante de Ca^{2+} dans le cytosol appelée entrée capacitive (Parekh et Penner, 1997) .

a. *Les canaux calciques voltage-dépendants*

Ce type de canal calcique possède la caractéristique d'être activé suite à un changement du potentiel membranaire. En effet, ces canaux sont généralement fermés lorsque la membrane est à son potentiel de repos alors qu'une dépolarisation induit leur ouverture et une entrée consécutive de Ca^{2+} dans la cellule permettant d'assurer les effets biologiques. Ces canaux sont exprimés à la membrane des cellules excitables mais également des cellules non excitables où leur fonction est tout aussi importante. Ils ont un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, les battements cardiaques en assurant l'activité « pacemaker » des cellules myocardiques, la contraction musculaire ainsi que la prolifération et la migration cellulaire. En fonction de leur propriétés électrophysiologiques, on distingue 2 types de VOC : (1) les canaux à bas seuil d'activation (LVA pour Low Voltage-Activated) activés par de faibles dépolarisations membranaires (entre -80 et -60 mV) et regroupant uniquement les canaux de type T et (2) les canaux à haut seuil d'activation (HVA pour High Voltage-Activated) qui sont activés pour des potentiels de membrane supérieurs à -30mV regroupant les canaux de type L,P/Q, N et R. Ces canaux ont une grande conductance et une inactivation plutôt lente.

Les canaux calciques voltage-dépendants sont composés d'une sous-unité $\alpha 1$ formant le pore ionique responsable des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques principales des

VOC, qui se compose elle-même de quatre domaines (I à IV) reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques et qui sont chacun constitués par 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Ce sont les segments S4 riches en acides aminés (AA) basiques Arginine et Lysine qui sont responsables de la propriété de senseur de voltage (voltage-sensor) permettant un changement de conformation du canal suite à une dépolarisation et son ouverture consécutive. Dans les CaP, les VOC jouent un rôle important dans la tumorigenèse prostatique comme le canal Cav3.2 de type T qui est surexprimé dans les cas de différenciation neuroendocrine des cancers prostatiques (Mariot *et al.*, 2002) et dont l'ouverture est capable d'induire la prolifération (Gackiere *et al.*, 2013) ainsi que la sécrétion des cellules neuroendocrines cancéreuses prostatique (Gackiere *et al.*, 2008).

b. Les canaux calciques voltage-indépendants

- Les canaux ROC et SMOC :

- Les canaux ROC (Receptor-Operated Channels) sont des récepteurs-canaux aussi appelés récepteurs ionotropes dont l'ouverture est directement stimulée par la fixation du ligand sur son récepteur. Ils peuvent être membranaires comme c'est le cas pour le récepteur nicotinique à l'acétylcholine, le récepteur NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) au glutamate ou encore les récepteurs purinergiques P2X pouvant être activés par l'ATP. Ils peuvent également être réticulaires dont deux sont majoritairement impliqués dans la vidange calcique réticulaire : les récepteurs à l'IP₃ (IP₃R) et les récepteurs à la ryanodine (RyR, Ryanodine Receptor).

Les IP₃Rs comportent 3 isoformes présentes dans de nombreux types cellulaires et sont des glycoprotéines d'environ 310 KDa qui forment des tétramères intervenant dans la libération des stocks calciques réticulaires dans le cytosol responsable de la régulation de la prolifération, de l'apoptose, de la migration ainsi que de la sécrétion cellulaire. Les IP₃R sont directement activés par la fixation de l'IP₃, second messenger généré par le clivage du PIP₂ en IP₃ catalysé par la PLC mise en jeu par de nombreux récepteurs en particulier les récepteurs couplés aux protéines G. Les RyRs comportent également 3 isoformes majeurs chez l'homme et sont des récepteurs canaux formés de 4 sous-unités identiques, possédant des sites de liaison et d'activation pour la ryanodine, un alcaloïde végétal ainsi que le Ca²⁺ (Dulhunty *et al.*, 1996). Ils sont exprimés dans de nombreux types cellulaires dont les cellules musculaires striées mais également les cellules épithéliales prostatiques humaines (Socci *et al.*, 1993; Mariot *et al.*, 2000). Ils sont principalement

impliqués dans le couplage excitation-contraction des fibres musculaires striées cardiaques et lisses (Pessah *et al.*, 1985; Missiaen *et al.*, 1992; Sorrentino et Volpe, 1993) et sont responsables d'un processus appelé CICR (Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Released) (Endo *et al.*, 1970) où une faible élévation du Ca^{2+} cytosolique à proximité des RyRs peut les activer directement, la libération de Ca^{2+} par un RyR pouvant activer l'ouverture d'un autre RyR adjacent entraînant une vague calcique.

- Les canaux SMOC (Second Messenger-Operated Channels) sont comme leur nom l'indique, des canaux activés par un second messenger généré suite à la mise en place de voies de signalisation comme le DAG, l' IP_3 ou encore l'Acide Arachidonique (AA). Parmi ces canaux, il y a les canaux ARC (Arachidonic acid regulated Channel), les CNGC (Cyclic-Nucleotides Gated Channels) ou de nombreux canaux de la famille des TRPs (Transient Receptor Potential) comme le canal TRPC6 dont l'activation par le DAG va entraîner une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire induisant la translocation nucléaire de NFAT et la prolifération des cellules cancéreuses épithéliales prostatiques (Thebault *et al.*, 2006).

- Les canaux SOC (Store-operated channel) regroupent l'ensemble des canaux membranaires activés suite à la déplétion des stocks calciques réticulaires permise grâce à l'ouverture des IP_3 Rs ou des RyRs (Bennett *et al.*, 1998; Putney *et al.*, 2001). Ces canaux sont responsables d'une entrée massive de Ca^{2+} appelée entrée capacitive de Ca^{2+} ou SOCE (Store-Operated Calcium Entry) considérée comme la principale entrée de Ca^{2+} dans les cellules non excitables (Putney, 2011) dont le but principal est de régénérer les stocks calciques réticulaires ainsi qu'induire de nombreux processus physiologiques dont la prolifération, l'apoptose, la migration ou encore la sécrétion. Pendant de nombreuses années, l'origine des canaux SOC et des protéines permettant leur activation suivant la vidange des stocks calcique réticulaire a été débattue jusqu'à la découverte de 2 protéines ayant un rôle majeur dans le SOCE : les protéines STIM1 et Orai1. STIM (STromal Interacting Molecule) est une protéine transmembranaire du RE de 77 kDa possédant 2 isoformes : STIM1 et STIM2, STIM1 étant davantage caractérisée pour son implication dans le SOCE. STIM1 possède un domaine N-terminal présent dans la lumière du réticulum qui contient un domaine EF-hand liant le Ca^{2+} avec une faible affinité (200-600 nM) et un domaine C-terminal cytosolique permettant son interaction avec les canaux SOC. Les protéines Orai possèdent 3 isoformes Orai1, Orai2 et Orai3 dont la protéine Orai1 qui est considérée comme l'un des principaux canaux SOCs. Orai1 aussi appelée CRACM1 (Calcium release-activated calcium channel protein 1) est une protéine d'environ 33 KDa située à la membrane plasmique constituée de 4 domaines

transmembranaires avec des extrémités N- et C-terminales intracellulaires et un supposé « pore » situé entre les segments transmembranaires 2 et 3 (Feske *et al.*, 2006).

Le SOCE dépend majoritairement de l'activité de STIM1 elle-même régulée par la concentration calcique réticulaire où le Ca^{2+} est lié à STIM1 sur son domaine EF-hand lorsque le RE est rempli. Ainsi, lors de la déplétion des stocks calciques réticulaires, le Ca^{2+} va se dissocier de STIM1 entraînant son oligomérisation et sa translocation dans les régions de la cellule où le RE est très proche de la membrane plasmique. Cette translocation de STIM1 va alors lui permettre de recruter *via* son domaine Cter, les canaux SOC membranaires, leur

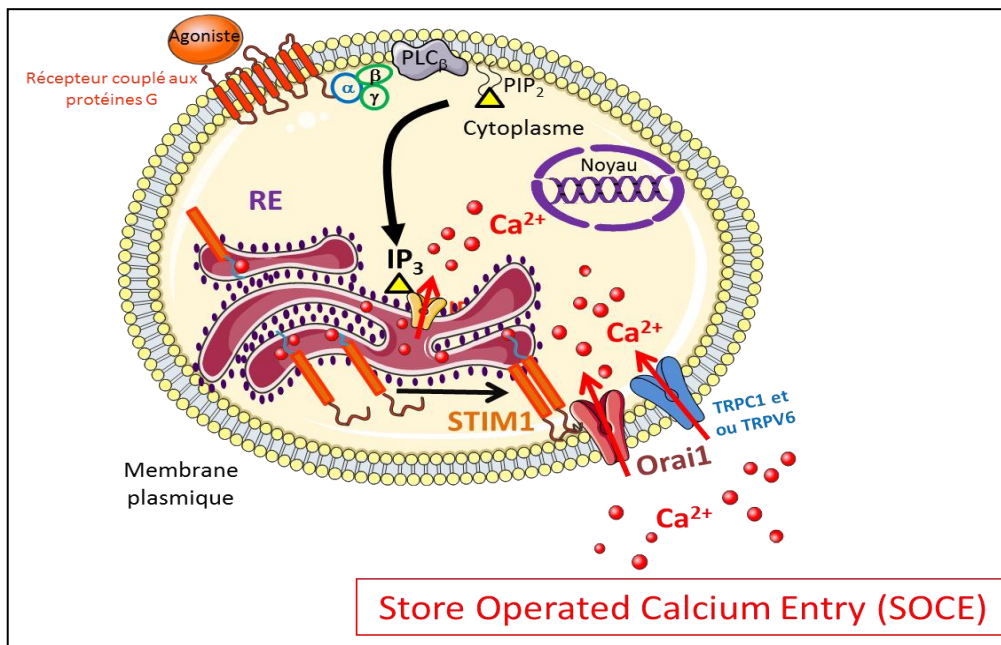


Figure 33 : Schéma simplifié du mécanisme mettant en place l'entrée capacitive de Ca^{2+} secondaire à la vidange des stocks calciques réticulaires impliquant principalement la protéine STIM1 et le canal Orai1

ouverture assurant l'entrée capacitive de Ca^{2+} (Liou *et al.*, 2005; Mercer *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Parmi ces canaux SOC, Orai1, exclusivement activé suivant la vidange réticulaire, est le principal canal intervenant dans le SOCE de nombreux modèles cellulaires. Cependant, plusieurs études ont montré l'existence d'autres canaux SOC également capables d'interagir avec STIM1, la plupart de ces canaux faisant parti de la famille des TRP (Transient Receptor Potential) comme TRPC1 ou TRPV6 constituant majoritairement le SOCE ou en collaboration avec Orai1.

c. Les canaux TRP (Transient Receptor Potential)

Initialement découverts chez la drosophile, les TRP sont des canaux ioniques non sélectifs perméables aux cations tels que le sodium, le calcium et le magnésium exprimés dans de très nombreux types cellulaires. Les canaux TRP ont un rôle fondamental dans la physiologie sensorielle en percevant les différents stimuli extérieurs comme la lumière, la température, le bruit, le toucher ou encore de nombreux produits chimiques et aliments afin de les convertir en sensations (douleur, chaud, froid, vision, ouïe...) *via* la signalisation cationique (Venkatachalam et Montell, 2007). Certains canaux TRP confèrent également aux cellules la capacité à sentir les changements de leur environnement local, tel que des altérations du pH ou de l'osmolarité.

La famille des canaux cationiques TRP regroupe plus de 28 membres qui présentent un haut degré de conservation chez les mammifères (Birbaumer *et al.*, 2003). Toutes ces protéines sont similaires sur le plan structural en formant des homo ou hétérotétramères dans lesquels chaque sous-unité TRP est composé de six segments transmembranaires avec une boucle entre les domaines S5 et S6 constituant le pore et des extrémités N et C-ter intracellulaires (Figure 34).

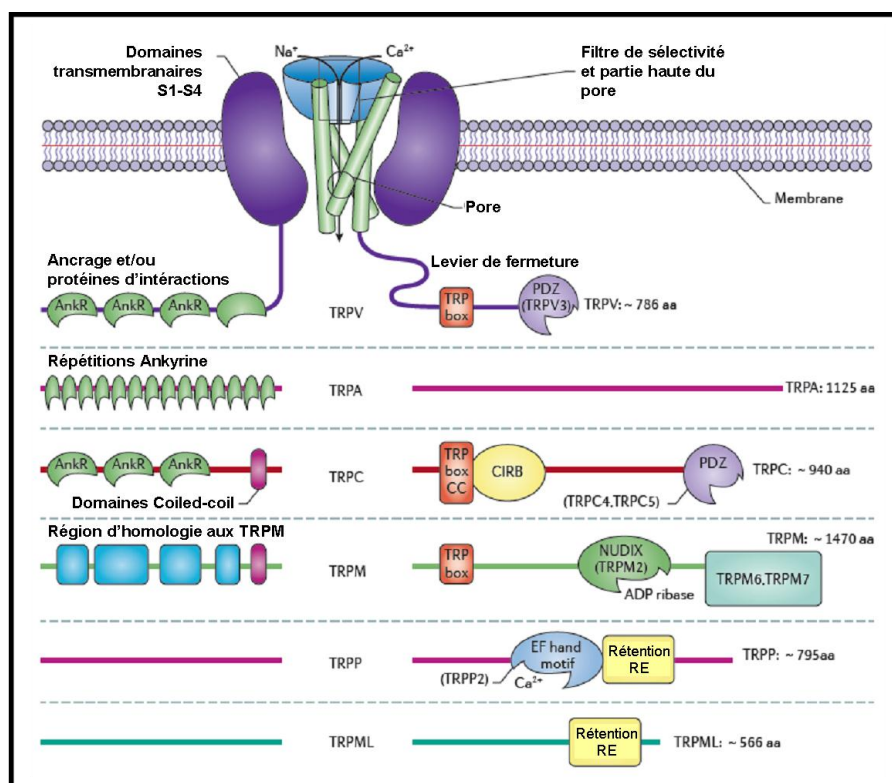


Figure 34 : Représentation schématique de la structure générale des canaux de la famille des TRP, d'après (Moran *et al.*, 2011). Plusieurs domaines sont représentés : AnkR = Répétitions Ankyrine ; TRP box = Domaine d'homologie des TRP ; CC = Domaine coiled-coil ; CIRB = Domaine Calmodulin/IP3 Receptor Binding ; PDZ= acronyme pour Postsynaptic density protein 95 (PSD95), Drosophila disc large tumour suppressor (DLGA) and Zonula occludens protein 1 (ZO1) ; NUDIX = Nucleoside Diphosphate-linked moiety X ; Rétention RE = Domaine dont la fonction est de maintenir le canal au niveau du RE.

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

- TRPA (TRPA1 ou ANKTM1) pour Ankyrine en référence aux nombreuses répétitions ankyrine présentes au niveau de son domaine N-terminal. Elle ne comprend qu'un seul membre identifié chez l'Homme. Ce canal sera plus amplement détaillé dans le chapitre V. Le canal TRPA1, présenté ci-dessous.
- TRPC (1-7) pour Canonique en raison de leur forte homologie avec la protéine TRP de la drosophile.
- TRPM (1-8) pour Mélastatine en référence également au premier membre cloné de cette famille (TRPM1) qui fut mis en évidence lors d'une analyse comparative des gènes de naevus bénins et de mélanomes malins d'un modèle murin.
- TRPML (1-3) pour MucoLipine en raison de leur association avec la mucopolysaccharidose de type IV.
- TRPP (1-5) pour Polycystic kidney disease
- TRPV (1-6) pour Vanilloïde en référence au premier membre cloné de cette famille (TRPV1) qui fut identifié comme un canal activé par la capsaïcine, le composant irritant du piment rouge de type vanilloïde.

Les TRP ont également un rôle particulièrement important dans la signalisation calcique, l'ouverture de la plupart d'entre eux, permettant d'induire une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ soit par un influx calcique lorsqu'ils sont membranaires, soit par une vidange des stocks calciques intracellulaires. Cette augmentation a pour effet de réguler les différents processus cellulaires passant ou non par la transcription de gènes tels que la prolifération, l'apoptose, la migration ou encore la sécrétion cellulaire. Ainsi, une dérégulation de l'expression ou de l'activité de ces derniers est responsable de la mise en place ou de l'évolution de nombreuses pathologies telles que le cancer. En effet, dans les CaP, plusieurs canaux TRP ont été identifiés comme marqueurs pronostics de la progression du cancer comme le canal TRPV6 dont l'expression augmente dans les tumeurs de haut grade (Fixemer *et al.*, 2003) avec un impact sur la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes *via* une voie Ca^{2+} -calcineurine/NFAT (Lehen'kyi *et al.*, 2007) ou encore le canal TRPM8 dont l'expression apparait pendant le cancer, ce canal étant absent dans les prostates saines et les cas d'HBP (Tsavaler *et al.*, 2001) avec un rôle évolutif en fonction des différents stades de la maladie (Tsavaler *et al.*, 2001; Gkika *et al.*, 2010; Gkika et Prevarskaya, 2011).

2. Les canaux potassiques

En plus des canaux calciques, il existe d'autres types de canaux capables de moduler indirectement l'homéostasie calcique appelés canaux potassiques qui laissent passer les ions K^+ de part et d'autre de la membrane plasmique de manière à moduler le potentiel de membrane et l'activité des canaux calciques voltage-dépendants mais également des canaux calciques voltage-indépendants en jouant sur le gradient électrochimique. Dans les conditions physiologiques, les concentrations de K^+ à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule sont respectivement de 150 mM et d'environ 4 mM. Ainsi, contrairement au flux calcique, le flux potassique est presque systématiquement dirigé vers l'extérieur afin de maintenir le potentiel de membrane (-65 mV environ) à une valeur proche de celle du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ ($E_{K^+} = -80$ mV). Tout comme les canaux calciques, les canaux K^+ participent activement à la physiologie cellulaire en modulant le volume cellulaire, la sécrétion d'hormones, l'amplitude et la cinétique des potentiels d'action dans les cellules excitables ainsi que la croissance cellulaire.

Les canaux potassiques forment la classe de canaux ioniques dont la diversité structurale et fonctionnelle est la plus grande se distinguant principalement par les différents mécanismes modulant leur activité les classant en 5 groupes fonctionnels :

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

Les canaux K_{Ca} sont particulièrement importants dans les cellules non excitables comme les cellules épithéliales prostatiques car ils régulent le potentiel de membrane en fonction du Ca^{2+} intracellulaire. Lorsque ces canaux sont activés par le Ca^{2+} , l'efflux de K^+ entraîné par leur ouverture va induire une hyperpolarisation membranaire suivie par une inactivation des canaux calciques voltage-dépendants. Cela va avoir pour effet d'augmenter la force électromotrice du Ca^{2+} et favoriser par la même occasion, l'ouverture des canaux calciques voltage-indépendants permettant un influx calcique et la modulation de la physiologie cellulaire. Les canaux K_{Ca} sont composés de 3 types de canaux différenciés par leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques : les canaux BK (Big conductance K channels), SK (Small conductance K channels) et IK (Intermediate conductance K channels). Les canaux BK possédant 7 segments transmembranaires, ont une forte sélectivité au K^+ ainsi qu'une forte conductance et sont activés par un mécanisme combinant la fixation du Ca^{2+} sur leur extrémité C-ter avec une dépolarisation (McManus, 1991) tandis que les canaux SK (SK1,

SK2 et SK3) et IK ayant respectivement une faible conductance et une conductance intermédiaire (Stocker, 2004; Adelman *et al.*, 2012), sont insensibles au potentiel de membrane et sont activés non pas directement par le Ca^{2+} mais par la fixation d'un complexe Ca^{2+} /calmoduline sur leur extrémité N-ter contenant un domaine spécifique de liaison appelé CaMBD (CaM Binding Domain).

C. Perturbations de l'homéostasie calcique et cancer

La régulation de l'homéostasie calcique par les canaux calciques et potassiques est une machinerie finement régulée et essentielle à la physiologie cellulaire faisant intervenir plusieurs acteurs moléculaires. Depuis plusieurs années, il a été observé que toute altération de l'homéostasie calcique était responsable de la mise en place et/ou du développement de nombreuses pathologies telles que le cancer et met bien en exergue l'importance d'étudier les canaux ioniques. En effet, des modifications de l'expression et de l'activité des canaux ioniques ont été observées dans de nombreux cancers (Prevarskaya *et al.*, 2010) modelant l'homéostasie calcique favorable à la prolifération, l'apoptose, la migration des cellules tumorales ou encore l'angiogenèse (Kunzelmann, 2005). Ces changements de l'homéostasie calcique sont très rarement associés à des mutations portées par les canaux ioniques mais correspondent davantage à des modifications de leur expression, de leur localisation subcellulaire (adressage membranaire, recyclage...), de leurs modifications post-traductionnelles, de leur interactome mais également leur ouverture favorisée par les voies de signalisation induites suite aux interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral associé.

1. Canaux ioniques et prolifération des cellules tumorales

Plusieurs canaux ioniques dont des canaux voltage-dépendants, des canaux TRP ainsi que des canaux calciques voltage-indépendants (ROC, SOC, SMOC) ont été caractérisés pour intervenir dans la prolifération cellulaire des cellules tumorales de nombreux cancers *via* le recrutement et l'activation des effecteurs Ca^{2+} -senseurs (Thebault *et al.*, 2006; Capiod, 2011; Capiod, 2013; Capiod, 2016).

De nombreux travaux dont ceux issus de notre laboratoire, ont montré un rôle clé du canal TRPV6 dans la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. Ce canal surexprimé dans les cellules tumorales, induit un influx calcique permettant d'induire la prolifération cellulaire suite à son ouverture *via* une voie Ca^{2+} / calcineurine / NFAT (Lehen'kyi *et al.*, 2007). Parmi les canaux TRP, le canal TRPC6 intervient également dans la prolifération en régulant le cycle cellulaire par modulation de l'amplitude du SOCE, son expression étant augmentée en

phase G1 et diminuée en phase S (Ichikawa et Inoue, 2014). D'autres récents travaux du laboratoire ont montré la surexpression de la protéine Orai3 dans les CaP, cette protéine s'associant davantage avec Orai1 pour former un canal hétéromérique activé par l'acide arachidonique (AA) et favorisant la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC-3 *via* une voie NFAT-dépendante (Dubois *et al.*, 2014). L'augmentation de la fréquence de formation des hétéromères diminuerait alors la formation des canaux SOC (homomères Orai1/Orai1) permettant une résistance à l'apoptose et une amplification de cette prolifération médié par la signalisation calcique. Enfin, des canaux calciques voltage-dépendants comme le canal CaV3.2 sont impliqués dans la prolifération des cellules neuroendocrines cancéreuses prostatiques (Gackiere *et al.*, 2013).

Les canaux potassiques interviennent aussi dans des voies de signalisation de facteurs protéiques modulant la croissance des cellules cancéreuses prostatiques comme la prolactine capable d'induire la prolifération des cellules LNCaP en stimulant l'activité des canaux potassiques (Prevarskaya *et al.*, 1994; Prevarskaya *et al.*, 1995; Van Coppenolle *et al.*, 2004) ou encore le canal à conductance intermédiaire IK_{Ca} dont l'activation permet une hyperpolarisation membranaire favorisant la force électromotrice du Ca^{2+} et l'activation consécutive du canal TRPV6 assurant la prolifération cellulaire (Lallet-Daher *et al.*, 2009).

2. Canaux ioniques et résistance à l'apoptose des cellules tumorales

Tout comme pour la prolifération cellulaire, plusieurs canaux ont été identifiés comme intervenant dans la résistance à l'apoptose des cellules tumorales (Vanden Abeele *et al.*, 2002; Lehen'kyi *et al.*, 2007; Kondratska *et al.*, 2014; Raphael *et al.*, 2014). C'est le cas des canaux Orai1 dont l'expression est diminuée dans les cellules tumorales prostatiques androgéno-indépendantes afin de permettre une diminution du SOCE induisant normalement l'apoptose *via* une surcharge calcique mitochondriale. C'est également le cas d' IP_3R dont l'altération de l'expression conduit à la chute de la concentration en Ca^{2+} réticulaire et à un défaut d'apoptose (Boehning *et al.*, 2004), la fonction de ce dernier étant directement affectée par l'activation de proto-oncogènes et/ ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Akl *et al.*, 2013). Des mutations d' IP_3R ont été identifiées et associées à des cellules tumorales résistantes à l'apoptose et plus agressives (Boehning *et al.*, 2004).

3. Canaux ioniques et migration des cellules tumorales

La motilité cellulaire étant un mécanisme Ca^{2+} -dépendant, le rôle des canaux ioniques dans la migration des cellules tumorales a émergé ces dernières années. En effet, des études menées dans notre laboratoire ont mis en évidence l'implication du canal calcique TRPV2 dans la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Monet *et al.*, 2009; Monet *et al.*, 2010) dont

les influx calciques générés par l'ouverture du canal modulent l'activité des kinases d'adhésions focales (FAK) et la motilité des cellules (Oulidi *et al.*, 2013). De même, l'activité du canal TRPM8 stimulé par le PSA, intervient également dans la motilité des cellules cancéreuses prostatiques, l'activation de ce dernier ayant des rôles différents en fonction de l'évolution du cancer (Gkika *et al.*, 2010). Dans le cancer du sein, des expériences *in vitro* réalisées sur des cellules tumorales mammaires ainsi que des expériences *in vivo* réalisées sur des modèle murins de métastases générées par xénogreffes tumorales ont montré que les constituants ubiquitaires du SOCE (Orai1 et STIM1) sont impliqués dans la migration et l'invasion des cellules tumorales mammaires (Yang *et al.*, 2009). En effet, l'inhibition directe du SOCE avec l'agent pharmacologique non spécifique SKF96365 ou la répression d'Orai1 et STIM1 par l'utilisation de siARN diminuait fortement l'invasion métastatique des cellules tumorales injectées par xénogreffes chez la souris. Enfin, il a été montré, que la protéine Orai1 était capable de s'associer au canal potassique de faible conductance SK3 dans les cellules cancéreuses épithéliales du sein pour former un complexe protéique responsable d'un influx calcique favorisant la migration de ces cellules et la formation de métastase osseuse (Chantome *et al.*, 2013).

4. Perturbations de l'homéostasie calcique et angiogénèse

En plus d'intervenir dans la signalisation calcique des cellules tumorales, les canaux ioniques modulent les processus physiologiques d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales en favorisant leur prolifération, leur migration permettant une induction de l'angiogénèse propice au développement tumoral et à la formation de métastases (Patton *et al.*, 2003; Sakurai et Kudo, 2011). Le rôle du Ca^{2+} dans la régulation de la vascularisation et du processus métastatique a été mis en évidence dans différents modèles cellulaires de cancers et proposé comme cible thérapeutique (Munaron *et al.*, 2013). En effet, plusieurs canaux ioniques, en particulier des canaux de la famille des TRP sont activés *via* les voies de signalisation induits par les facteurs de croissance pour permettre un influx calcique favorable à la prolifération et la migration des cellules endothéliales. C'est par exemple le cas des canaux TRPC6 qui sont impliqués dans les voies de transduction induits par la fixation du VEGF sur son récepteur VEGFR2 (Ge *et al.*, 2009). En fonction du gradient de VEGF et des concentrations auxquelles les cellules endothéliales vont être exposées, plusieurs signaux calciques vont se mettre en place, leur nature déterminant vers quel processus les cellules endothéliales vont se diriger pendant l'angiogénèse. Ainsi, une étude a montré que la présence d'oscillations calciques de grande fréquence favorisait plutôt la translocation nucléaire du facteur NFAT et la transcription des gènes cibles intervenant dans la prolifération cellulaire tandis qu'un faible signal calcique persistant recrute les MLCK (Myosin Light Chain Kinase)

Ca²⁺-dépendante qui à leur tour vont activer les chaînes légères de myosine en les phosphorylant facilitant la formation des fibres du stress et la contraction cellulaire nécessaire au mouvement des cellules endothéliales (Noren *et al.*, 2016).

Dans ce contexte, des chercheurs du laboratoire ont montré qu'un canal membre de la famille des TRP, le canal TRPA1 était spécifiquement exprimé dans les cellule stromales associées aux cancers de la prostate et non dans les cellules épithéliales tumorales. Ainsi, il est important de bien comprendre le fonctionnement de ce canal afin d'étudier son rôle dans le CaP.

V. Le canal TRPA1

Le canal TRPA1 (Transient receptor potential ankyrin 1) humain, anciennement appelé ANKTM1, a été découvert par Jacquemar *et al.* en 1999 (Jaquemar *et al.*, 1999) lors d'un screening des gènes sous-exprimés après transformation oncogénique de fibroblastes pulmonaires humains caractérisé à l'époque comme une protéine pourvue de très nombreuses répétitions ankyrine. Il est composé de 1119 acides aminés et encodé par le gène *trpa1* localisé sur le chromosome 8q13. Il fonctionne comme un canal cationique non spécifique perméable à de nombreux ions comme le Ca²⁺ et le sodium (Na⁺) pour lesquelles la perméabilité est la même et plus importante par rapport aux autres ions (Story *et al.*, 2003). Il est également perméable au K⁺, rubidium, césium, lithium et le zinc, et possède une forte conductance unitaire (98 pS) en solution physiologique lui permettant de supporter des influx calciques importants (Nagata *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2009; Nilius *et al.*, 2011). Ce canal de la famille des TRP a été montré comme intervenant dans de nombreux processus physiologiques incluant la nociception, la mécanotransduction, la thermosensation ainsi que la perception de nombreuses substances chimiques. Il est exprimé dans différents types de neurones sensoriels intervenant dans la perception des signaux chimiques endogènes et exogènes tels que les neurones des ganglions rachidiens (DRG pour Dorsal Root Ganglia) (Nagata *et al.*, 2005) ou encore les neurones myentériques et les cellules entérochromaffines intestinales (Anand *et al.*, 2008; Nozawa *et al.*, 2009; Poole *et al.*, 2011; Kono *et al.*, 2013). Il est également exprimé dans de nombreux tissus participant activement à leur homéostasie dont la peau (kératinocytes, mélanocytes et fibroblastes) (Anand *et al.*, 2008; Atoyian *et al.*, 2009; Tsutsumi *et al.*, 2010), les poumons (cellules épithéliales alvéolaires, cellules musculaires lisses et fibroblastes) (Mukhopadhyay *et al.*, 2011; Nassini *et al.*, 2012), les vaisseaux sanguins (Gratzke *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2013), le tractus urinaire (Streng *et al.*, 2008; Gratzke *et al.*, 2010) ou encore les cellules β-pancréatiques où il intervient dans la sécrétion d'insuline (Cao *et al.*, 2012). Ces rôles dans la physiopathologie sont multiples, ce dernier

intervenant dans les cas de douleurs inflammatoires chroniques comme les neuropathies diabétiques (Eberhardt *et al.*, 2012; Andersson *et al.*, 2013) ainsi que les neuropathies et allodynies induites par les agents chimiothérapeutiques comme le paclitaxel (Materazzi *et al.*, 2012; Trevisan *et al.*, 2013) mais également dans des pathologies respiratoires comme l’asthme, une toux chronique ou des cas de rhinites (Dolovich *et al.*, 1970; Winterbourn et Kettle, 2000). Ce canal étant un chimiosenseur central dans la détection de l’environnement extérieur à la cellule et ayant un rôle clé dans la physiologie et la pathologie de nombreux organes, il demeure essentiel de mieux comprendre son fonctionnement et de pouvoir cibler ce dernier.

A. Structure

Ce canal de la famille des TRP est le seul membre de la sous-famille des TRPA chez les mammifères et possède tout comme les autres TRP, une structure tétramérique avec un seul pore présent au niveau de l’axe central. Chaque sous-unité contient six segments transmembranaires (hélices α de S1 à S6) avec un filtre de sélectivité formant le pore entre les segments S5 et S6 et possède des domaines N et C-ter intracellulaires. Ce canal se caractérise par son domaine N-terminal constitué de 14 à 18 répétitions ankyrine (AnkR) similaires à ceux des canaux TRPV et TRPC qui n’en contiennent que 3 à 6. Ces AnkR sont des motifs protéiques d’environ 33 acides aminés qui constituent 2 hélices α reliées par un coude β et sont en grande partie responsables des propriétés d’activation du canal (Gaudet, 2008). En effet, bien que ces modes d’activations soient controversés, les AnkR interviendraient dans l’ouverture du canal lié à la mécanosensation ainsi qu’à la thermosensation où ils

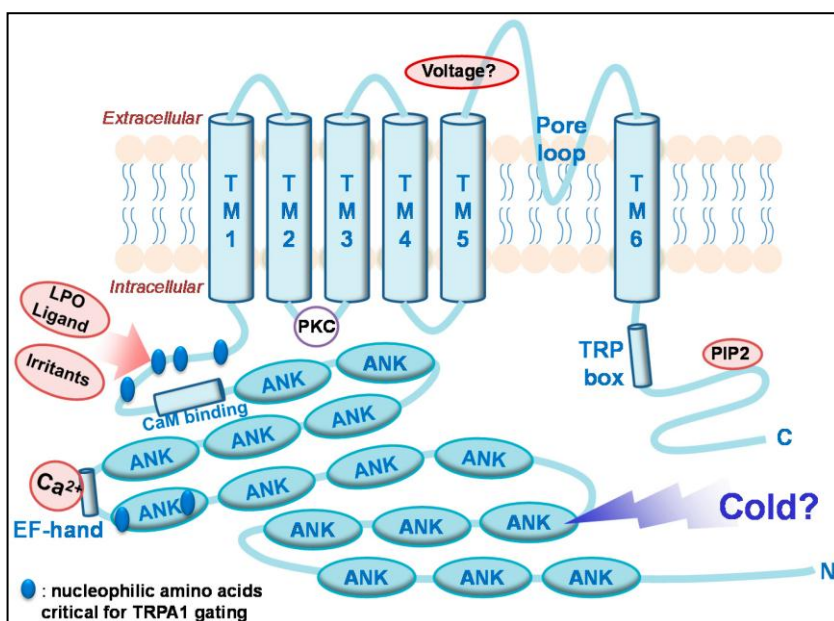


Figure 35 : Représentation schématique de la structure du canal TRPA1. (Choi *et al.*, 2014)

fonctionneraient comme un ressort moléculaire reliant le canal à la matrice du cytosquelette afin de permettre son ouverture (Nagata *et al.*, 2005; Sotomayor *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006) et s'activeraient pour des températures inférieures à 17°C, les résultats entre les différentes études étant contradictoires sur ce point (Bautista *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2006).

Parallèlement à ces répétitions ankyrine, le canal possède sur son extrémité Nter de nombreux résidus cystéines et lysines avec lesquels plusieurs composés électrophiles ou composés chimiques irritants (décrits ci-dessous) sont capables de former des liaisons covalentes réversibles afin d'induire l'ouverture du canal. Le domaine N terminal du canal TRPA1 est également pourvu d'un site EF-hand permettant la fixation du Ca²⁺ intracellulaire sur le canal qui est capable de directement réguler son activité ou augmenter sa sensibilité aux agonistes (Doerner *et al.*, 2007; Zurborg *et al.*, 2007). Enfin, le canal TRPA1 possède 2 sites putatifs de N-glycosylation (N747 et N753) intervenant dans la sensibilité du canal à différents agonistes (Egan *et al.*, 2016).

B. Modulation de l'activité du canal TRPA1

1. Activateurs exogènes

Le canal TRPA1 peut clairement être considéré comme un chimiosenseur capable de percevoir de nombreux signaux liés au stress oxydatif et à l'inflammation provenant de l'extérieur et de l'intérieur de la cellule afin de transduire l'information et d'assurer les effets biologiques en modulant le potentiel de membrane ou en intervenant dans la signalisation calcique. Régulièrement, de nombreux composés chimiques exogènes du canal TRPA1 sont découverts, la plupart étant des substances irritantes qualifiés d'agonistes électrophiles qui proviennent pour la plupart des végétaux, de l'alimentation et des nombreux agents polluants issus des fumées et gaz nocifs pour la santé. Ces derniers ont la capacité, grâce à leur noyau carbone électrophile, de former des adduits covalents réversibles avec les groupements thiol SH des résidus lysines et cystéine de l'extrémité N terminal du canal afin de l'activer. (Hinman *et al.*, 2006; Macpherson *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2008; Sadofsky *et al.*, 2011). Plusieurs résidus se sont ainsi avérés critiques pour ce type de liaison : les cystéines C415, C421, C422, C619, C621, C622, C639 et C663 ainsi que la lysine K708. Parmi les activateurs les plus connus du canal, il y a l'allylthiocyanate (AITC) dérivé du wasabi, le cinnamaldéhyde extrait de la cannelle (Bandell *et al.*, 2004; Jordt *et al.*, 2004), l'allicine dérivé de l'ail (Bautista *et al.*, 2005) l'acroléine, substance irritante provenant des gaz des pots d'échappements ainsi que de la fumée de cigarette (Bautista *et al.*, 2006). De nombreux composés phytochimiques non-électrophiles et certains composés chimiques synthétiques comme le Δ 9-tetrahydrocannabinol, la nicotine, le menthol ou l'iciline peuvent également activer le canal TRPA1 par des mécanismes encore inconnus et montrent une rapide

réversibilité (Jordt *et al.*, 2004; Karashima *et al.*, 2007; Talavera *et al.*, 2009).

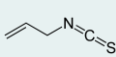
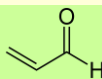
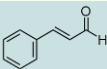
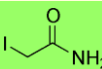
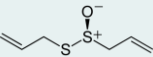
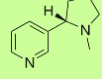
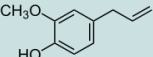


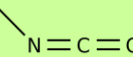
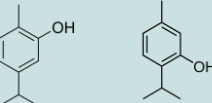
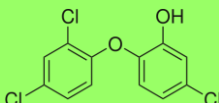
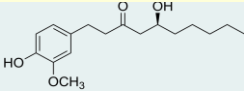
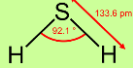
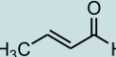
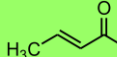
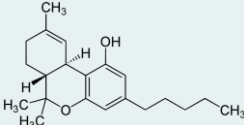
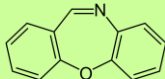
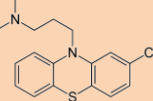
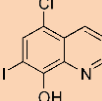
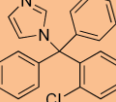
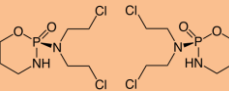
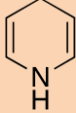
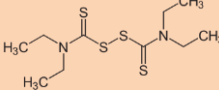
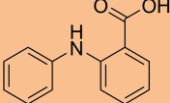
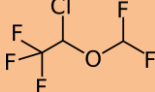
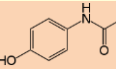
Agonistes exogènes	Structure	Agonistes exogènes	Structure
Alimentation, plantes et huiles		Polluants	
Allyl Isothiocyanate (moutarde et wasabi)		Acrolein (fumée de cigarette et gaz lacrimogènes)	
Cinnamaldéhyde (cannelle)		Iodoacétamide	
Allicin (ail et oignon)		Nicotine	
Eugenol (clou de girofle)		Formaldéhyde	
Menthol (pour de faibles concentrations)		Isocyanates	
Carvacrol et thymol (huiles essentielles)		Triclosan (antifongique et antibactérien à large spectre)	
Gingérol (gingembre)		Sulfate d'hydrogène H₂S	
Crotonaldéhyde (huile de soja)		Crotonaldéhyde (huile de soja)	
Δ9-Tétrahydrocannabinol (marijuana)		Dibenzoxazépine (gaz lacrymogène)	
Drogues à visée thérapeutique			
Chlorpromazine (antipsychotique)		Clioquinol (antiseptique)	
Clotrimazole (Antifongique et inhibiteur des canaux K ⁺)		Cyclophosphamide (agent chimiothérapeutique)	
Dihydropyridines (inhibiteurs canaux calcique voltage-dépendant de type L et vasodilatateurs)		Disulfirame (inhibiteur de l'aldéhyde déshydrogénase)	
Fénamate et Anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) qui en sont dérivés		Isoflurane (anesthésique général)	
Paracétamol Acétaminophen			

Tableau 1 : Liste non exhaustive des agonistes exogènes du canal TRPA1 humain

Le canal intervenant dans la perception de la douleur *via* son activation, des données récentes ont montré que des analgésiques et des agents vasodilatateurs comme l'acétaminophène et les dihydropyridines ainsi que des anesthésiques généraux étaient capables de stimuler le canal TRPA1 remettant en question l'utilisation de ces drogues cliniques par l'induction d'effets secondaires non négligeables (Fajardo *et al.*, 2008; Matta *et al.*, 2008; Nassini *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2011).

2. Activateurs endogènes

De nombreuses molécules endogènes ont également été montrées activer le canal TRPA1, la plupart de ces composés étant générés par le stress oxydatif comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Andersson *et al.*, 2008) ou des lipides oxydés tels que le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) (Taylor-Clark *et al.*, 2008; Trevisan *et al.*, 2014), le 4-oxo-nonenal (Andersson *et al.*, 2008) ou encore la 8-iso-prostaglandin A2 (Taylor-Clark *et al.*, 2008) pouvant activer le canal par une addition conjuguée ou formation de ponts disulfures (Andersson *et al.*, 2008). En effet, le canal TRPA1 peut être caractérisé comme un senseur du stress oxydatif directement activé par l'accumulation de ligands endogènes et contribuant à la douleur inflammatoire (Trevisan *et al.*, 2013; Trevisan *et al.*, 2013; Trevisan *et al.*, 2014) comme c'est le cas du méthylglyoxal. Ce métabolite réactif qui s'accumule pendant le diabète (Brownlee, 2001; Nakayama *et al.*, 2008) est capable de directement activer TRPA1 induisant des cas de neuropathies périphériques douloureuses (Eberhardt *et al.*, 2012; Andersson *et al.*, 2013). Les agonistes exogènes et endogènes du canal TRPA1 étant particulièrement nombreux, la plupart sont listés dans le tableau 1 présenté ci-dessus et le tableau 2 ci-dessous.

Agonistes endogènes	Structure	Agonistes endogènes	Structure
Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂		15-deoxy-delta-12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2)	
Peroxynitrite		5,6-epoxyeicosatrienoic acid (5-6-EET)	
Monoxyde d'azote		nitro-oleic acid	
Hypochlorite		4-hydroxynonenal	
Sulfate d'hydrogène H ₂ S		Méthylglyoxal	

Tableau 2 : Liste non exhaustive des agonistes endogènes modulant l'activité du canal TRPA1 humain

3. Inhibiteurs

Contrairement aux agonistes généralement constitués de substances irritantes, de produits du stress oxydatif et de médiateurs de l'inflammation, les inhibiteurs naturels du canal TRPA1 commencent seulement à être identifiés depuis quelques années. Ces molécules sont le camphre (Xu *et al.*, 2005), le curcumin (Leamy *et al.*, 2011), l'eucalyptol (aussi appelé 1,8-cineole) dérivé de l'huile d'eucalyptus (Takaishi *et al.*, 2012), l'acide α lipoïque (Trevisan *et al.*, 2013), puissant antioxydant présent dans l'alimentation dont l'utilisation sur des modèles animaux a diminué considérablement les douleurs liés aux neuropathies périphériques causés par des agents chimiothérapeutiques. Il ya également le resveratrol (Yu *et al.*, 2013; Nalli *et al.*, 2016), un polyphénol naturel trouvé dans le vin rouge et l'alimentation (raisins et cacahuètes) dont les effets bénéfiques sont multiples (cardioprotection et anticancéreux), la caféine (Nagatomo et Kubo, 2008), et enfin la cardamonine (2, 4-dihydroxy-6-methoxychalcone) (Wang *et al.*, 2016) issue d'herbes médicinales. Ces molécules ont comme caractéristiques communes des propriétés antioxydantes et comportent des mécanismes d'inhibition qui peuvent être très différents et sont encore mal connus à l'heure actuelle. Par exemple, le camphre et le curcumin activent le canal avant de totalement le désensibiliser alors que d'autres molécules comme l'acide lipoïque exercent un effet purement inhibiteur. De plus, les effets de ces molécules dépendent de l'espèce considérée, comme la caféine qui inhibe la forme humaine du canal TRPA1 alors que cette même molécule active la forme exprimée chez la souris. Bien que la plupart des inhibiteurs naturels du canal soient prometteurs, ces derniers n'ont été découverts que récemment et demeurent pour la plupart, moins efficaces et spécifiques que les molécules pharmacologiques qui ont été développés pour inhiber le canal. Ainsi, pour palier à ce manque d'antagonistes, des molécules pharmacologiques avaient été développés de manière à sélectivement inhiber le canal, la plus connu étant HC-030031 ($IC_{50} = 6,2 \mu M$ pour la réponse à l'AITC) dont l'efficacité *in vitro* a été prouvé dans de nombreuses études (McNamara *et al.*, 2007; Eid *et al.*, 2008). Malheureusement, cet inhibiteur majoritairement utilisé dans la littérature a montré ses limites dans les modèles *in vivo* avec de faibles propriétés pharmacocinétiques, ce dernier ayant une très faible demi-vie (32 min) et se liant à plus de 90 % des protéines plasmatiques comme cela a été montré chez le rat (Rech *et al.*, 2010). Le canal ayant un rôle important dans des pathologies liées à la douleur comme les neuropathies diabétiques, les migraines ou encore des problèmes respiratoires comme l'asthme, de nombreuses sociétés pharmaceutiques comme GlenMarck, Hydra Bioscience, Janssen ou encore Merck ont développé de nouveaux antagonistes du canal plus performants dont A-967079 développé par Abbott dont l' IC_{50} n'est que de 67nM pour l'inhibition de la forme humaine du canal (Chen *et al.*, 2011; Copeland *et al.*, 2014; Rooney *et al.*, 2014). Le canal étant impliqué dans de nombreux problèmes

inflammatoires et pathologies respiratoires, deux antagonistes pharmacologiques GRC 17536 (Glenmark) and HX100 (Hydra Biosciences) ont été développés pour traiter les patients atteints de douleurs liées aux neuropathies diabétiques ainsi que des patients atteints d'asthme qui ont montré des résultats prometteurs, les antagonistes étant respectivement en essais clinique de phase 2a et 1. Enfin, des anticorps monoclonaux ciblant le canal TRPA1 ont été développés dont l'anticorps 2B10 dirigé contre le domaine pore du canal qui a montré une grande efficacité avec une inhibition de plus de 70% de la réponse à l'AITC (Lee *et al.*, 2014).

Inhibiteurs naturels	Structure	Inhibiteurs synthétiques	Structure
Curcumin		AP-18	
Resveratrol		HC-030031	
Eucalyptol (1,8 cineole)		A-967079	
Camphre		HC-067047	
Acide- α -lipoïque		Chembridge-5861528	
Caféine			

Tableau 3 : Liste non exhaustive des antagonistes naturels et synthétiques modulant l'activité du canal TRPA1 humain

4. Modulation de l'activité du canal par l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

En plus des différents ligands cités précédemment, il a été montré dans les neurones DRG que le canal TRPA1 pouvait être activé *via* les voies de transductions induites par des RCPG comme le récepteur à la bradykinine (BK), une hormone peptidique vasodilatatrice intervenant dans l'inflammation ou encore le PAR2 (Protease-Activated Receptor 2).

En effet, l'activation de ces RCPG induit une activation directe du canal TRPA1 et/ou la sensibilisation du canal à divers agonistes comme l'AITC, le cinnamaldéhyde ou des agonistes endogènes. Ces effets passent principalement par l'activation de la phospholipase C

avec la génération d'IP₃ qui, suite à la fixation sur son récepteur, va permettre une déplétion des stocks calciques réticulaires et l'éventuelle fixation du Ca²⁺ sur le canal TRPA1 sensibilisant ce dernier aux agonistes ou l'activant directement (Jordt *et al.*, 2004). Le PIP₂ ayant été montré capable d'inhiber le canal TRPA1, l'activation de la PLC lèverait l'inhibition en hydrolysant le PIP₂ en IP₃ et en DAG (Dai *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). De plus, cette activation du canal *via* la voie PLC ne serait pas dépendante de la PKC, des expériences ayant montré que ni l'inhibition avec GF109203X, un puissant inhibiteur de PKC, ni l'activation de la PKC avec PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) n'impactait sur la sensibilisation du canal aux agonistes médiée par la bradykinine. Au contraire, la PKA peut également jouer un rôle dans la modulation de l'activité du canal (Wang *et al.*, 2008). Enfin, dans la voie de transduction générée par la chloroquine dans les neurones DRG également capable d'activer le canal TRPA1, il a été observé que les sous-unités βγ constituant les protéines G pouvaient directement interagir avec le canal TRPA1 pour réguler son activité,

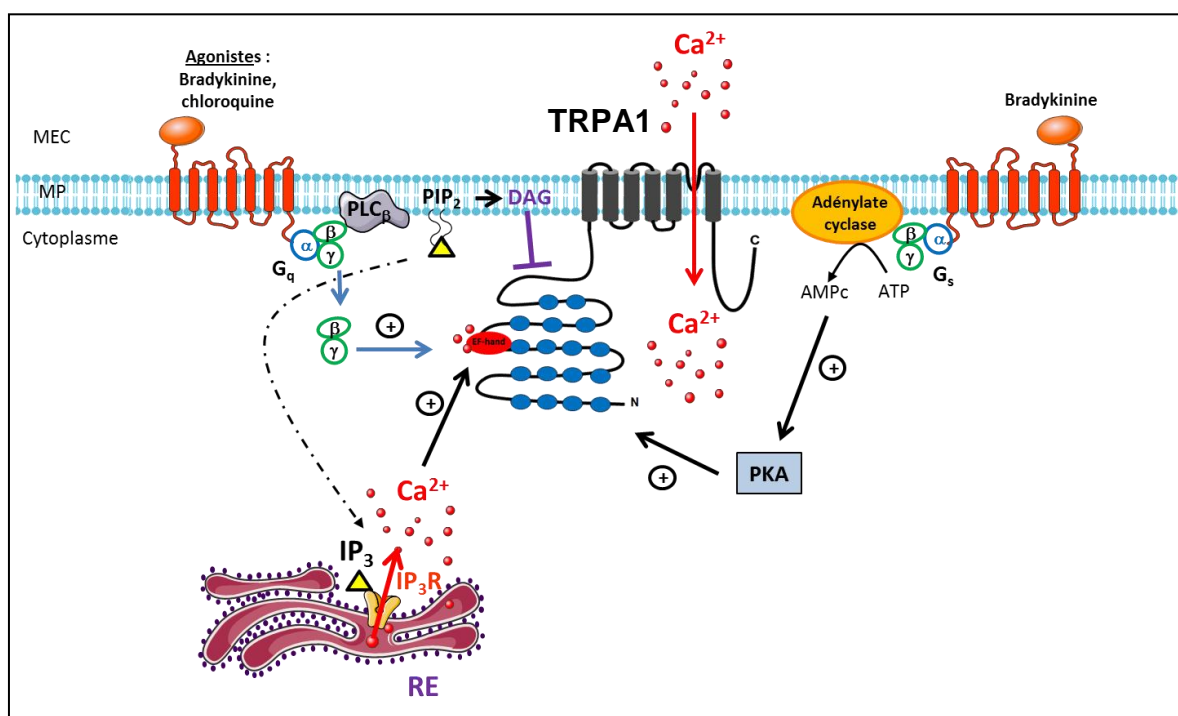


Figure 36 : Modulation de l'activité du canal *via* les voies de transduction couplées aux protéines G et la vidange des stocks calciques intracellulaires

leur inhibition avec la galléine diminuant significativement l'influx calcique généré par le canal TRPA1 et ce, indépendamment de la PLC dont l'inhibition n'avait pas d'effet dans ce modèle (Wilson *et al.*, 2011; Lieu *et al.*, 2014)

5. Modulation du canal par le Ca²⁺

Comme décrit précédemment, le Ca²⁺ possède un rôle très important dans la régulation de l'activité du canal TRPA1 en l'activant directement et/ ou en le sensibilisant aux agonistes suite à sa fixation sur un domaine EF-hand présent au niveau du domaine Nter du canal. Ce domaine putatif est présent au niveau des Ankr entre les AA 466 et 479. En effet, des études électrophysiologiques et d'imagerie calcique ont montré que lorsque des mutations étaient induites dans cette zone, en particulier l'AA 474 (L474A), la sensibilité au Ca²⁺ était supprimée et l'activation du canal suivant la vidange des stocks calciques réticulaires était diminuée de manière significative (Doerner *et al.*, 2007; Zurborg *et al.*, 2007). Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'un influx calcique est également capable d'inactiver le canal pour des concentrations importantes en Ca²⁺ intracellulaire localisées (Wang *et al.*, 2008), le Ca²⁺ pouvant se fixer sur un domaine différent du EF-hand également localisé sur l'extrémité Nter (Cordero-Morales *et al.*, 2011).

C. Polymorphismes et mutations

Chaque individu est différent et défini par une interaction permanente entre son génome qui lui est propre et l'environnement auquel il est soumis. Ainsi, pour optimiser les traitements, il est nécessaire de pratiquer une médecine personnalisée prenant en compte à la fois ses gènes et les facteurs auxquels il est exposé. Cette variabilité génétique caractéristique de chaque individu est associée à des mutations et aux polymorphismes qui en découlent, en particulier les polymorphismes touchant un seul nucléotide où SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) transmissibles à la descendance et dont la fréquence est variable suivant les individus. Dans ce contexte, il est possible que ces SNPs et mutations augmentent la possibilité d'être atteint d'une pathologie particulière ou encore de modifier l'activité et la sensibilité de protéines comme les canaux ioniques. De nombreuses études sont ainsi essentielles pour établir un lien entre la présence des polymorphismes et mutations, et les modifications biologiques induites par ces dernières afin d'améliorer les thérapies actuelles et de mieux appréhender certaines pathologies.

1. Mutations du canal TRPA1

Concernant le canal TRPA1, il n'existe qu'un seul cas de mutation délétère recensé dans une famille Colombienne résultant en la substitution d'une Asparagine en Sérine (N855S) au niveau de son domaine S4 transmembranaire. Cette mutation ponctuelle est responsable d'une pathologie appelée syndrome douloureux épisodique familial se manifestant par d'importantes douleurs principalement au niveau de la partie supérieure du corps déclenchées par la fatigue, la faim et le froid. Des expériences d'électrophysiologie ont montré que cette

mutation était responsable d'un gain de fonction augmentant la sensibilité du canal au voltage ainsi que son activation directe par le Ca^{2+} extracellulaire, l'ouverture du canal étant directement impliquée dans la sensation de douleur (Kremeyer *et al.*, 2010). Cet exemple illustre bien l'impact que peut avoir une mutation ponctuelle sur les mécanismes de régulation d'une protéine comme le canal TRPA1 et explique les différences d'action des composés entre les espèces comme la caféine qui active le canal exprimé chez la souris alors qu'elle inhibe la forme humaine (Nagatomo et Kubo, 2008), ou à l'inverse, le menthol, qui active la forme du canal exprimé chez les mammifères alors qu'elle l'inhibe chez les autres espèces (Xiao *et al.*, 2008),

2. Single Nucleotid Polymorphism (SNP)

Plusieurs variants des canaux TRPA1 de fréquence plus ou moins rare dans la population humaine ont été enregistrés dans la base de données des SNPs sans que de réelles études de fond n'aient été réalisées à leur sujet afin de mieux comprendre l'impact sur leur fonctionnement et la physiopathologie. La plupart de ces SNPs touchent majoritairement l'extrémité Nter et peuvent potentiellement impacter sur l'activité du canal et les mécanismes régulant ce dernier. Dans ce contexte, des études menées par Morgan *et al.* en 2015 (Morgan *et al.*, 2015) et Deering-Rice *et al.* (Deering-Rice *et al.*, 2015) se sont intéressées à plusieurs variants (substitutions) du canal affectant le domaine Nter et les domaines de répétitions ankyrine : Y69C, E179K, K186N, A366D, E477K, et D573A. Dans ces études, 3 variants étudiés, TRPA1 Y69C, TRPA1 K186N et TRPA1 N855S ont montré une forte augmentation de la sensibilité aux agonistes par rapport à la forme sauvage avec un influx calcique plus important pour TRPA1 Y69C. De manière intéressante, ces 3 variants étaient moins sensibles à l'antagoniste A967079 que la forme sauvage montrant bien l'importance des SNPs dans la régulation de l'activité du canal et que l'existence de ces SNPs peut déterminer des réponses différentes face aux agents environnementaux déterminant une potentielle différence de phénotype bénéfique ou délétère pour l'individu concerné.

Ainsi, l'ensemble de ces données montrent bien le rôle clé du canal TRPA1 comme senseur chimique capable d'être activé par un grand nombre d'agents exogènes en particulier des substances irritantes et potentiellement nocives pour la santé fonctionnant alors comme une alarme pour l'organisme mais qui peut également être activé dans le cadre des voies de transduction impliquant le Ca^{2+} ainsi que par de nombreux facteurs endogènes synthétisés en réponse à des conditions de stress oxydatif et d'inflammation. A ce sujet, plusieurs études ont montré qu'un environnement inflammatoire comme c'est le cas pour la PIA et la PIN, est particulièrement propice à la carcinogenèse prostatique et au développement du cancer.

Ainsi, comme les autres canaux TRP, le canal TRPA1 pourrait constituer une potentielle protéine clé intervenant dans la signalisation calcique propice au cancer et dans le cas présent, aux interactions épithélio-stromales des CaP.

Problématique et Objectifs

Le cancer de la prostate est le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme dans le monde après le cancer du poumon. La croissance et la survie des cellules tumorales prostatiques étant dépendantes des androgènes, les traitements consistent à empêcher l'action des androgènes par différentes stratégies comme la castration et l'hormonothérapie. Malheureusement, après une période moyenne de rémission de 2 à 3 ans, les cellules tumorales parviennent à s'adapter et à échapper au blocage hormonal passant ainsi à un état dit androgéno-résistant où les cellules tumorales deviennent plus agressives et développent des métastases osseuses où la médiane de survie pour les patients est comprise entre 18 et 24 mois. A ce stade, les traitements employés sont limités ne permettant que d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients sans réellement permettre une rémission du cancer.

L'évolution vers un phénotype hormono-résistant et la capacité des cellules tumorales à se développer et à résister aux différents traitements employés dépend alors des capacités intrinsèques des cellules épithéliales tumorales mais aussi et surtout des interactions avec leur microenvironnement. En effet, de la genèse du cancer jusqu'à la formation des métastases, il existe des interactions mutuelles entre les cellules épithéliales cancéreuses et les différents types cellulaires composant le stroma tumoral *via* la sécrétion de nombreux facteurs de croissance et cytokines afin de permettre le développement du cancer prostatique ainsi que la résistance des cellules tumorales face aux chimiothérapies actuelles. Il s'avère donc crucial de bien comprendre ces interactions épithélio-stromales afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques utilisables dans le traitements de ces cancers.

Dans ce contexte, de nombreux travaux dont ceux de notre laboratoire ont montré que l'homéostasie calcique et les canaux ioniques exprimés par les cellules tumorales jouaient un rôle clé dans la tumorigenèse prostatique. Les canaux ioniques étant également exprimés par les cellules stromales et participant à la physiologie de ces cellules, des chercheurs du laboratoire ont montré récemment l'expression d'un canal de la famille des TRP, le canal TRPA1, dans les cellules stromales associées au cancer et plus particulièrement les CAFs. Ce canal TRPA1, un canal cationique perméable au calcium, est actuellement considéré comme un chimiosenseur capable d'être activé par de nombreuses molécules endogènes et environnementales. L'activation de ce canal calcique permettrait une augmentation du calcium intracellulaire, un processus connu pour induire la sécrétion. Il est donc important d'étudier le rôle de ce canal dans les interactions épithélio-stromales et la cancérogenèse de la prostate. Ce canal TRPA1 pourrait constituer une cible pour interférer sur le dialogue épithélium-stroma et la cancérogenèse prostatique.

Les travaux de recherche réalisés pendant cette thèse ont ainsi consisté à déterminer l'implication du canal ionique TRPA1 dans les interactions stroma-épithélium et dans le développement tumoral. Les travaux envisagés avaient pour but d'étudier par des manipulations *in vitro* :

1- Le rôle et la fonctionnalité du canal TRPA1 dans les fibroblastes associés au cancer (CAF) de la prostate :

- intervention dans la signalisation calcique,
- rôle dans l'expression et la sécrétion de facteurs de croissance.

2- L'implication du canal TRPA1 dans le dialogue réciproque épithélium-stroma des cancers prostatiques humains, c'est-à-dire la capacité des cellules épithéliales tumorales à moduler l'activité et l'expression du canal stromal ainsi que l'étude de l'impact de l'activation du canal stromal sur les cellules épithéliales (migration, résistance à l'apoptose) notamment *via* la sécrétion de facteurs de croissance.

3- L'impact de facteurs environnementaux sur l'activité du canal TRPA1 et sur le dialogue épithélio-stromale médié par l'activité de ce dernier.

L'ensemble de ces travaux suggèrent que le canal TRPA1 pourrait constituer une cible thérapeutique pour interférer sur le dialogue épithélium-stroma et la cancérogenèse prostatique. L'expression de ce canal pourrait également constituer un marqueur pronostic des cancers de la prostate chez l'homme.

L'ensemble de ces travaux ont permis la rédaction de 4 articles dont 2 (article 1 et article 4) en révision (*Oncotarget*, *Molecular Carcinogenesis*) et 2 (article 2 et article 3) actuellement en cours de soumission pour publication. Par ailleurs, j'ai participé activement à des travaux dans le cadre de la détermination de la signalisation calcique induite par un facteur du microenvironnement tumoral, l'Endotheline-1, au niveau des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques. Ces travaux ont conduit à la publication d'un article scientifique (article 5, page 244) dont je suis le co-premier auteur.

Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

A. Types cellulaires étudiés

1. Cultures primaires

Des prélèvements chirurgicaux de tissus prostatiques humains sont obtenus dans le cadre d'une collaboration avec le service d'Urologie (Pr B. Mauroy, Dr JL Bonnal) de l'Hôpital Saint Philibert (Lomme). Les cellules en culture primaires sont obtenues par la technique d'explants en sélectionnant les types cellulaires par l'emploi de différents milieux de culture. Cette technique de culture primaire sélectionnant les types cellulaires par le milieu de culture a été mise au point au laboratoire et permet d'obtenir des cellules épithéliales (hPEC pour human Primary Epithelial Cells), stromales (hPrSC pour human Prostate cancer Stromal Cells) composées ici de fibroblastes, myofibroblastes et de cellules musculaires lisses, et endothéliales. Pour cela, chaque prélèvement obtenu est découpé avec une lame de scalpel stérile en plusieurs morceaux permettant l'obtention d'explants qui sont répartis dans des boîtes de pétri avec une surface cationique permettant leur adhésion (Corning® Primaria™, Falcon® Ø 100mm). Selon le type cellulaire souhaité à cultiver, les explants sont déposés dans des gouttes de milieux différents et l'ensemble est placé dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5% de CO₂. Après 24 à 48h, on complète les gouttes de milieu afin d'éviter la dessiccation avec 7 mL de milieu. Chaque prélèvement a été identifié par un numéro attribué lors de sa mise en culture (Pr 1 à 14) puis chaque type cellulaire a été caractérisé par immunofluorescence *via* l'utilisation d'anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques à ces cellules.

2. Lignées cancéreuses et transformées

Pour ces travaux, nous avons travaillé sur 3 lignées cellulaires épithéliales cancéreuses prostatiques humaines provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, USA), les cellules LNCaP, DU145 et PC-3 ainsi qu'une lignée cellulaire stromale cancéreuse prostatique, les cellules PS30 qui nous ont été généreusement envoyées par le Dr A. Oganessian, (Department of Anesthesiology & Pain Medicine, University of Washington, USA).

- Les cellules LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) sont des cellules hormono-sensibles, établies à partir d'un ganglion lymphatique supraclaviculaire métastasé prélevé en 1977 sur un patient caucasien âgé de 50 ans souffrant d'un adénocarcinome prostatique. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes ainsi que le récepteur aux œstrogènes et sont

caractérisées par leur androgéno-dépendance qui nécessite la présence d'androgènes dans leur milieu de culture. Ces cellules expriment également le PSA (Prostate Specific Antigen).

- La lignée androgéno-indépendante PC-3. Elle a été établie en 1979 à partir d'une métastase osseuse localisée au niveau des vertèbres lombaires d'un patient caucasien âgé de 62 ans présentant un adénocarcinome prostatique de grade IV. Les cellules PC-3 n'expriment pas le PSA ni PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen) et n'ont pas de récepteur aux androgènes fonctionnel (AR). Les cellules PC-3 ont acquis la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes et ont un haut potentiel métastatique comparé aux cellules LNCaP.

- La lignée androgéno-indépendante DU145. Cette lignée a été établie à partir d'une métastase localisée au niveau du cerveau d'un patient âgé de 69 ans présentant un adénocarcinome prostatique accompagné d'une leucémie. Ces cellules sont aussi capables de former des tumeurs *in vivo* avec un potentiel métastatique modéré comparé aux cellules PC-3 et n'expriment pas le PSA ni le récepteur aux androgènes.

- La lignée PS30 est composée de fibroblastes associés au cancer (CAF) issus d'explants d'un patient atteint d'un cancer prostatique qui ont été immortalisées par infection avec un rétrovirus codant pour les cadres de lecture ouvert E6/E7 du papillomavirus de type 16 (Price *et al.*, 2000). Elles nous ont été généreusement offertes par le Dr A. Oganessian A (Department of Anesthesiology & Pain Medicine, University of Washington, USA). Ces cellules ont été caractérisées pour l'expression de marqueurs myofibroblastiques tels que l' α -actine et la vimentine et possèdent un potentiel prolifératif plus élevé que celui des cellules stromales issues des cultures primaires.

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

B. Conditions de culture

1. Généralités

L'ensemble des cellules utilisées (issues des cultures primaires et différentes lignées) sont cultivées dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère saturée en humidité et enrichie à 5% de CO₂. Les différentes manipulations sur les cellules (changement de milieu, passage, ensemencement...) sont réalisées dans un environnement stéril au sein d'un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de type II.

Hormis les cellules épithéliales issues des cultures primaires, lorsque les autres types cellulaires arrivent à environ 80% de confluence, les cellules sont rincées dans du Phosphate

Buffer Saline (PBS) 1X (Gibco, Life Technologies, France) puis sont détachées à l'aide de Trypsine-EDTA à 0.05% avec rouge de phénol (Gibco, Life Technologies, France) dont l'effet est inhibé par l'ajout de milieu complet. Les cellules sont ensuite récupérées puis centrifugées à 1.000 RPM pendant 5 min puis sont reprises dans le milieu d'intérêt après élimination du surnageant. Enfin, les cellules sontensemencées selon les expériences envisagées. Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours.

Pour l'entretien, les lignées cellulaires sontensemencées dans des flasques en plastique T75 (*TPP*) tandis que les cellules issues de cultures primaires sontensemencées dans des boîtes de Pétri spécialement adaptées (Corning® Primaria™, Falcon® Ø 100mm). Pour l'imagerie calcique (IC) et pour les expériences par l'immunofluorescence (IF), les cellules sont cultivées en boîtes de Pétri (Nunc, Ø 35mm) contenant des lamelles de verre autoclavées (3 lamelles de Ø 15 mm/ boîtes pour l'IF et 1 lamelle de verre Ø 30 mm pour l'IC, *VWR*). Les plaques multi-puits (96 puits) sont utilisées pour les expériences de prolifération (MTS/PMS) et des boîtes de Pétri (*TPP*, Ø 60mm et Ø100mm) sont utilisées pour les extractions des ARN et protéines des cellules.

Selon, les différents types cellulaires, différents milieux sont employés comme décrit ci-dessous :

Pour la culture primaire des cellules stromales, les explants sont incubés dans le milieu RPMI-1640 sans rouge de phénol (Gibco, Life Technologies, France) et contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Gibco, Life Technologies, France) et déstéroïdé, 2 mM L-glutamine (Gibco, Life Technologies, France), 1 nM de 5 α -dihydrotestostérone (DHT), 50 μ g/mL de kanamycine et 50 μ g/mL de penicilline/streptomycine.

Pour la culture primaire des cellules épithéliales, les explants sont incubés dans du milieu KSF-M (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en SVF décomplémenté (2%), en extrait pituitaire bovin (25 μ g/mL) filtré, en Epidermal Growth Factor (EGF, 0.2ng/mL), avec 100 μ M de Ca²⁺, 50 μ g/mL de kanamycine et 50 μ g/mL de penicilline/streptomycine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France). Contrairement aux autres types cellulaires, ces cellules sont détachées sans trypsine à l'aide de PBS-EDTA (0.56 mM) de manière à éviter leur différenciation suivant le passage et leur permettant de bien réadhérer au support suivant leur ensemencement.

Pour la culture primaire des cellules endothéliales, les explants sont incubés dans du milieu EBM supplémenté en SVF décomplémenté (2%), 50 μ g/mL de kanamycine et 50 μ g/mL de penicilline/streptomycine.

Les différentes lignées cellulaires cancéreuses prostatiques épithéliales (LNCaP, DU145, PC-3) et stromales PS30 sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Invitrogen, France) contenant 10% SVF décomplémenté et 2 mM de L-glutamine.

La lignée HEK-WT est incubée dans du milieu DMEM+GlutaMax™ (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté avec 10% SVF, 50µg/mL de kanamycine et 50µg/mL de pénicilline/streptomycine.

2. Préparation du sérum déstéroïdé

La solution de sérum de veau fœtal SVF (Seromed, Strasbourg) décomplémenté est additionnée de charbon actif (Charcoal activated, SIGMA, L'Isle d'Abeau, France) à une concentration de 100 g/L et laissée sous agitation pendant la nuit à 4°C. Le sérum est ensuite centrifugé une fois à 2.500×g (30 minutes à 4°C) et une deuxième fois à 10.000×g (1h à 4°C) afin d'éliminer au maximum le charbon actif. Le sérum est ensuite filtré deux fois (filtres de 0,22 µm de diamètre) sous la hotte aspirante pour le stériliser. Le sérum ainsi obtenu est conservé sous forme d'aliquots à -20°C.

3. Conservation des cellules (Congélation/Décongélation)

Après trypsination, environ 1 million de cellules sont reprises dans 1 mL de sérum décomplémenté préalablement filtré (filtre avec des pores de 0.22 µm Ø) contenant 10% de DiMéthylsulfoxyde (DMSO) stérile (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) puis transférées dans une ampoule de congélation. Les cryotubes sont ensuite placés dans une boîte de congélation dont les parois sont remplies d'isopropanol, à -80°C sur la nuit. L'isolation des tubes du froid par l'isopropanol permet au milieu cellulaire de perdre environ 1°C par minute, permettant un lent refroidissement. La conservation à -80°C est utilisée pour les ampoules de cellules servant à une décongélation régulière afin de renouveler les lignées utilisées. La congélation à long terme est réalisée en stockant les cryotubes dans un container à azote liquide à -196°C.

Afin de décongeler les cellules, les ampoules sont plongées dans un bain-marie préalablement chauffé à +37°C pendant 20 min jusqu'à décongélation de la suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite transférées dans 5 à 10 mL de milieu puis centrifugées de manière à éliminer le DMSO encore présent dans le surnageant pour enfin reprendre les cellules dans 5 à 10 mL de milieu et les ensemercer dans des flasques T25 ou T75 contenant du milieu complet.

C. Co-cultures

1. Indirecte : communications paracrine

De manière à mieux étudier les effets des interactions réciproques épithélio-stromale sur leur physiologie par l'intermédiaire de la voie paracrine (sécrétion de facteurs de croissance et cytokines) sans interaction directe entre les 2 types cellulaires, des co-cultures ont été mises en place. Pour se faire, les cellules LNCaP, DU145 ou PC-3 ont étéensemencées dans des plaques (Falcon) 24 puits (70.000 à 120.000 cellules/ puits) dans 1 mL de RPMI 1640 avec rouge de phénol supplémenté avec 0.5% ou 10 % SVF selon les expériences réalisées et séparées des CAF par un insert constitué de pores de 0.4 μm \varnothing ne laissant passer que les facteurs solubles (25. 000 à 40. 000 CAF/inserts), les CAF étant égalementensemencées dans 500 μl de RPMI 1640 avec rouge de phénol supplémenté avec 0.5% ou 10% SVF selon les expériences envisagées.

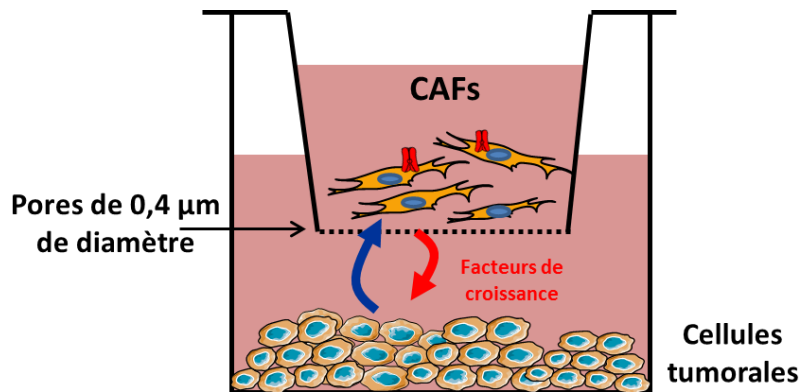


Figure 37 : Schéma représentant les co-cultures réalisées en chambre de Boyden

2. Directe : formation de sphéroïdes

Dans le cadre de l'étude des interactions épithélio-stromales, nous avons également réalisé des cultures 3D, c'est-à-dire la formation de sphéroïdes en suspension composés de cellules épithéliales tumorales et de CAF constituant un modèle d'étude plus proche de la tumeur que les cultures cellulaires en monocouche, mimant *in vitro* son organisation.

Pour se faire, après trypsinisation, des cellules LNCaP ou DU145 ont étéensemencées ($2 * 10^6$ cellules/ boîtes) avec des CAF (10^6 cellules/boîtes) dans des boîtes de pétri avec un revêtement particulier (Nunclon Sphera®, Thermo Scientific, \varnothing 60mm) empêchant à la fois l'adhésion des protéines de la MEC et l'adhésion des cellules afin de favoriser les contacts cellulaires. Dans le cadre de ces expériences, les cellules ont été incubées dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% SVF à 37°C avec une atmosphère saturée en humidité et enrichie

à 5% de CO₂ où l'agrégation cellulaire a été favorisée à l'aide d'un agitateur rotatif Orbi-Shaker™ CO₂ (Benchmark Scientific, Thermo Scientific, France) fonctionnant à 60 rpm. Après 3 à 5 jours suivant leur formation, les sphéroïdes ont été récupérés par aspiration à l'aide de cônes de pipettes (1 mL) dont l'extrémité a été préalablement sectionnée et transférées dans un tube eppendorf (1.5 mL) prétraité avec une solution de PBS-G (Phosphate Buffer Saline-Gelatin) de manière à éviter l'adhérence des sphéroïdes sur la paroi du tube.

Les sphéroïdes formant des structures de diamètre et d'épaisseur importants, les expériences utilisant la fluorescence par l'intermédiaire des manipulations de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) et d'immunofluorescence en microscopie confocale ne pouvaient se faire sans avoir préalablement réalisé des coupes de ces sphéroïdes. Nous avons donc dû trouver un moyen de paraffiner les sphéroïdes après fixation afin de pouvoir réaliser ces coupes.

Pour cela, dans un premier temps, les sphéroïdes ont été centrifugés à 500 RPM pendant 5 minutes de manière à pouvoir éliminer le surnageant, puis ont été fixés dans une solution de PBS contenant 4% de PFA (Paraformaldéhyde) sous agitation, la nuit à 4°C. Le lendemain, les sphéroïdes sont rincées 3 fois dans du PBS avec une étape de centrifugation à 1.000 RPM pendant 2 min entre chaque rinçages. Enfin, selon la taille du culot formé par les sphéroïdes, 50 à 100 µL d'une solution d'agarose de 2% à basse température de fusion (low melting point) préalablement chauffée et maintenue à l'état liquide dans un bain-marie chauffée à 37°C est ajoutée dans les eppendorfs contenant les sphéroïdes eux-mêmes disposés dans le bain-marie puis mélangée à ces derniers à l'aide d'un cône de pipette. Très rapidement, 10 à 20 µL d'une solution d'éthanol à 70% contenant 0.2% de noir soudan filtré est ajoutée au mélange de manière à pouvoir repérer par la suite les culots contenant les sphéroïdes gélifiés et paraffinés pendant la coupe au microtome. Enfin, les sphéroïdes sont centrifugés à 6.000 RPM pendant 5 min à 40°C, puis une fois que les culots enrobés dans l'agarose sont refroidis, ils sont transférés à l'aide d'une aiguille fine dans des eppendorfs de 2 ml afin de pouvoir réaliser les étapes de déshydratation à l'éthanol, d'inclusion dans la paraffine, de coupes au microtomes, de réhydratation (toutes ces étapes étant décrites par la suite) afin de réaliser les expériences d'immunofluorescence indirect et de TUNEL.

II. Transfections

A. Lipofection des siARN

L'ARN interférent, qui provoque l'inactivation de l'ARN messager par inhibition de sa traduction ou par sa dégradation, existe notamment sous forme de siARN. Les siARN sont administrés par lipofection sur cellules stromales adhérentes. Les cellules sont transfectées avec 10 à 25 nM de siARN dirigées contre des séquences cibles spécifiques des ARN codant pour les protéines TRPA1 (siTRPA1), Orai1 (siOrai1) et STIM1 (siSTIM1) ainsi que pour la luciférase, ici utilisée comme contrôle (siCTL), la lipofection étant réalisée à l'aide du kit « Hiperfect » (Qiagen). Selon la procédure conseillée par le fournisseur et pour une boîte Ø 35 mm avec un volume final de 1 mL, un mélange est réalisé dans l'ordre suivant : 100 µL de milieu de culture (RPMI ou DMEM) sans SVF ni antibiotiques, 10 à 25 nM de siARN puis 6 µL d'Hiperfect, le mélange étant incubé 10 min à température ambiante. Le milieu de culture des cellules est ensuite éliminé et remplacé par 900 µL de milieu complet auxquels sont ajoutés goutte à goutte les 100 µL du mélange contenant les siARN. Après 24 heures d'incubation, le milieu de culture contenant les siARN est remplacé par du nouveau milieu complété. Les cellules peuvent alors être utilisées 48 à 72h après transfection.

Les siARN sont synthétisés par Dharmacon Research Inc (Lafayette, USA). Les séquences des siARN utilisés dans cette étude sont indiquées dans le [Tableau 4](#). L'efficacité de ces siARN est vérifiée par RT-PCR (Retro-Transcription et par la réaction en chaîne de la Polymerase) au niveau de l'ARNm et par western blot et immunofluorescence au niveau protéique du marqueur ciblé.

siARN	Séquences ciblées 5'-3'	Position	Numéro d'accèsion
siCTL Luciférase	CUUACGCUGAGUACUUCGA (dTdT)	153-171	FN554878
siOrai1	UGAGCAACGUGCACAAUCU (dTdT)	645-663	NM_032790
siSTIM1	GGCUCUGGAUACAGUGCUC (dTdT)	1147-1165	NM_003156
siTRPA1 1	GGUGGGAUGUUAUCCAUUAU (dTdT)	3212-3230	NM_007332.2
siTRPA1 2	GAAGGACGCUCUCCACUUA (dTdT)	1196-1214	NM_007332.2
siTRPA1 3	GGCAUCAUCAUGAAACUA (dTdT)	2423-2441	NM_007332.2

[Tableau 4](#) : Liste des siARN utilisés

B. Lipofection transitoire de vecteurs d'expression

Afin d'obtenir des cellules surexprimant la forme sauvage du canal TRPA1 (hTRPA1-wt), une forme mutée de la protéine TRPA1 humaine pour son domaine EF-hand (hTRPA1-L474A), ainsi que la protéine NFATc3 couplée à la GFP (NFAT-GFP), les cellules PS30 et LNCaP ont été lipofectées avec les vecteurs d'expression contenant les gènes d'intérêt. Les transfections ont été réalisées en utilisant le kit lipofectamine® 3000 (ThermoFisher Scientific, France). Selon la procédure conseillée par le fournisseur, pour une boîte Ø 35 mm et 2 µg de plasmides transfectés, 2 mélanges sont préparés dans des tubes « low-binding » autoclavés: un contenant 125 µL d'Opti-MEM™ (Gibco, Life Technologies, France) sans SVF où est ajoutée la lipofectamine (3µl/µg d'ADN) et l'autre contenant 125 µL d'Opti-MEM™ où est ajouté 2µg de plasmide et le réactif P3000 (2µl/µg d'ADN). Les 2 tubes sont ensuite vortexés puis centrifugés brièvement avant de former une solution commune dans un seul tube également vortexé et incubé 5 minutes à température ambiante. Enfin, le mélange est ajouté goutte à goutte sur les cellules adhérentes (80% de confluence minimum) sans avoir changé le milieu de ces dernières. Les cellules peuvent alors être utilisées pour des expériences comme l'imagerie calcique 24 à 48h après transfection. Afin de repérer les cellules transfectées avec 2µg du vecteur d'expression codant pour la protéine d'intérêt, une co-transfection est réalisée avec 0.5 µg d'un vecteur d'expression codant pour la GFP (ratio 3 : 1) où les cellules transfectées émettent à une longueur d'onde de 512 nm lorsqu'elles sont excitées avec une longueur d'onde de 488 nm permettant de les identifier par microscopie à fluorescence.

III. Biologie Moléculaire

A. Etudes d'expression des ARNm

1. Extraction des ARNm

L'extraction des acides ribonucléiques (ARN) est effectuée à l'aide du réactif Trizol®, qui est une solution de phénol et de guanidium isothiocyanate, basée sur la méthode démontrée par Chomczynski et Sacchi (1987) (Chomczynski et Sacchi, 1987). Dans un premier temps, les cellules sont lysées dans ce réactif, puis par addition de chloroforme, les ARN totaux sont séparés des autres constituants cellulaires (lipides, protéines et ADN). Ensuite, ces ARN sont précipités avec de l'isopropanol et lavés par de l'éthanol 75% pendant 30 min avant d'être séchés de manière à éliminer l'éthanol puis repris dans de l'eau milli-Q®.

2. Traitement à la Désoxyribonucléase 1 (DNase I) et Transcription inverse (RT)

Après dosage au spectrophotomètre et contrôle de leur qualité sur gel d'agarose, 1 µg des ARN totaux est traitée à la désoxyribonucléase (DNaseI) afin de dégrader les ADN génomiques résiduels. Dans le but d'inactiver la DNase I, l'EDTA (2,5 mM finale) est ajouté à ces échantillons d'ARN puis l'ensemble est chauffé à 65°C pendant 10 minutes. Les ARN ainsi traités sont ensuite soumis à la transcription inverse pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ils sont tout d'abord incubés à 70°C en présence d'amorces hexamériques aléatoires (Applied Biosystems), puis la réaction de transcription inverse est amorcée par l'addition de tampon 10X (sans Mg²⁺), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (2,5 mM/dNTP), d'ARN polymérase MULV (Applied Biosystems, 50U/µL) ainsi que d'un inhibiteur de RNase (Applied Biosystems, 20U/µL). La RT est réalisée pendant 15 min à température ambiante puis, les tubes sont incubés à 42°C pendant 30 minutes. Les ADN complémentaires (ADNc) sont ensuite incubés à 70°C pendant 10 minutes, puis placés dans la glace pendant au moins 5 minutes et conservés à -20°C pour les études ultérieures par PCR.

3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La réaction de PCR est réalisée dans un volume total de 25 µL avec 1 à 2 µL d'ADNc (50 à 100 ng équivalent ARN). L'ADN matrice est mélangé avec les amorces sens et antisens (concentration finale : 500 nM), des dNTPs (2,5 mM/dNTP), 2.5 µL de tampon de réaction 10X (concentration finale 1X : (NH₄)₂SO₄ 16 mM ; Tris-HCl 50 mM), MgCl₂ 25 mM (concentration finale : 2,5 mM), 1 µL d'enzyme polymérase TaqGold (5 U/µL, Roche), qsp 25 µL ddH₂O. Puis la solution est placée dans le thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) et soumise au programme dont les conditions sont indiquées dans le [Tableau 5](#).

1 cycle	32 à 40 cycles			1 cycle
95 °C	95°C	58°C	72°C	72°C
5 min	30 sec	30 sec	1 min/1000pb	7 min

[Tableau 5](#) : Conditions d'amplification utilisées en PCR

Les amorces sens et anti-sens (500 nM) (Eurogentec, Belgique), utilisées lors des amplifications par PCR, sont regroupées dans le [Tableau 6](#). Les produits de PCR sont déposés dans un gel d'agarose de 1,5% ou 2% contenant du bromure d'éthidium (0,5µg/ml), ce gel étant placé dans une cuve contenant 0,5% d'une solution de TBE (Tris/Borate/EDTA) afin de

soumettre les échantillons à une migration par électrophorèse puis ces derniers sont visualisés sous UV (254-310nm) et les images sont enregistrées en utilisant le logiciel Gelcapture (Bio-imaging System).

Gène	Séquences sens (5'-3')	Séquences anti-sens (5'-3')	Taille (bp)	Numéro d'accension
TRPA1 : -TRPA1-1 -TRPA1-2 - TRPA1 N-ter - TRPA1 C-ter	AGTGGCAATGTGGAGCAA AGTGGCAATGTGGAGCAA CCAGAAGTTCTCCAGGGCTT CATTGTTTCTCAGTGACCAC	TCTGATCCACTTTGCGTA AGGAACCATGATTTACACG TGTTCCCGTCTTCATCCAGG AGGAACCATGATTTACACG	510 994 1823 1950	NM_007332
VEGF	CCTGGTGGACATCTTCCAGGA GTA	CTCACCGCCTCGGCTTGTCAC A	VEGF121 : 275 VEGF165 : 407 VEGF145 : 347 VEGF189 : 479	NM_00117162 3
ET-1	GGTTCAGTTTGAACGGGAGGT T	GAAGGTCTGTCAACCAATGTG CT	670	NM_001955
ET _A R	GATCACAATGACTTTGGCGT A	CTCAAGCTGCCATTCTCTTCT	328	NM_001957
ET _B R	TTGGTGGCTGTTTCAGTTTCT	TGCTCACCAAATACAGAGCA	351	NM_000115
HGF	TACTGCAGACCAATGTGCTA	GAATTTGTGCCGGTGTGGTG	541	NM_000601
c-MET	GGAGCCAAAGTCCTTTCATC	CTTGCTGACATACGCAGCCT	433	NM_00112750 0
NFATc1	TCTCCCAAGACCATACTACA	TGCTGAACTGAGTGCTCCAA T	689	NM_172390
NFATc2	AGCACATCATGTACTGCGAGA	AAGTGAGAGTCCGCTTAGTG	530	NM_012340
NFATc3	AAAGTTTGCCGTGGAGTCGC	TTGGGACCACCTAATGGGCT	420	NM_173165
NFATc4	TTCTCAGAGAAAGGGAGGGA	CTTCTGGTGGGGGTAATCT	555	NM_00113602 2
β-actin	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGA TC	212	NM_001101
GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA	237	NM_002046.5

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour les études par RT-PCR de l'expression des différents gènes d'intérêt. La taille attendue de l'amplicon est indiquée en paires de bases (bp).

4. Nested PCR

La réaction en chaîne par polymérase nichée ou nested PCR est une variante de la PCR classique permettant d'amplifier des grands fragments d'ADN de plus de 2.000 pb et de réduire la quantité de produits non spécifiques consécutifs à la liaison des amorces sur des sites inattendus. Elle consiste à tout d'abord lancer une PCR classique (comme décrit ci-dessus) en mélangeant de l'ADN matrice (50 à 100 ng équivalent ARN) avec un couple d'amorces externes (concentration finale : 400 nM) délimitant la séquence codante d'intérêt dans un mélange réactionnel contenant 2µL de dNTP à 2.5mM par dNTP (concentration finale : 200 µM/dNTP), 2,5 µL de tampon de réaction 10X (concentration finale 1X : (NH₄)₂SO₄ 16 mM ; Tris-HCl 50 mM), 2 µL de MgCl₂ 25 mM (concentration finale : 2 mM), 1 µL d'enzyme polymérase TaqGold (5 U/µL, Roche) et 2,5 µL de Bétaïne 5M (concentration finale : 500 µM) qsp 25 µL ddH₂O.

Ensuite, 1µL des amplicons est récupéré afin de réaliser un 2^{ème} mix réactionnel dont la composition est la même que celui utilisé pour la 1^{ère} PCR à la différence que les amplicons sont ajoutés à la place de l'ADNc non amplifiée et que des amorces internes sont utilisées afin d'amplifier spécifiquement une des séquences révélées par le couple d'amorces externes. Ainsi, la nested PCR permet, par l'implication de deux paires d'amorces utilisées successivement, d'amplifier de grands fragments d'ADN tout en limitant l'aspécificité, la seconde paire d'amorces amplifiant une séquence du produit de la première PCR.

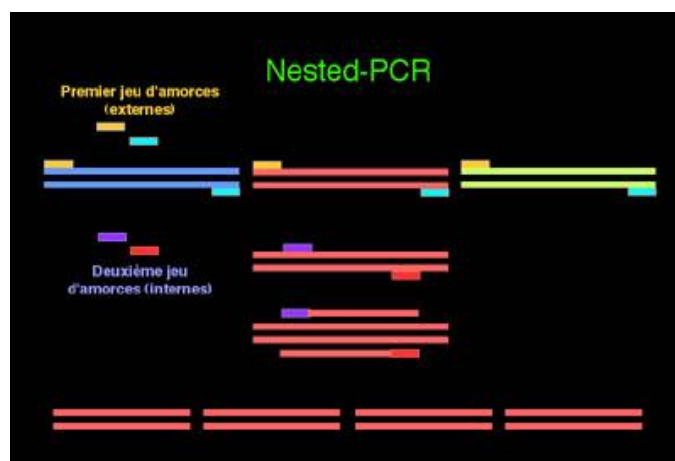


Figure 38 : Principe de la nested PCR.

<http://www.chups.jussieu.fr/polvs/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.8.11.html>

B. Clonage par PCR

1. Récupération des fragments d'ADN d'intérêt

Pour réaliser cette technique et amplifier des grands fragments de plus de 1.500 pb, il est nécessaire d'utiliser une polymérase ajoutant des adénines sur les extrémités 3' des amplifiats comme la TaqGold (5 U/µL, Roche) et de ne pas conserver à -20°C les échantillons obtenus.

Ensuite, suivant une RT-PCR classique ou une nested PCR, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% avec tampon TAE et SYBR[®] Green (0,5µg/mL) puis après migration électrophorétique, les fragments d'ADN d'intérêt sont récupérés à l'aide d'une lame de scalpel propre sur une plaque sous UV (« dark reader ») préalablement nettoyée.

2. Extraction d'ADN à partir du gel d'agarose

L'ADN est ensuite extrait des fragments du gel à l'aide du kit (Nucleospin Gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant puis 2 éluions successives sont réalisées avec 15 à 20µL du tampon d'éluion préalablement chauffé à 70°C.

3. Ligation de l'ADN dans un vecteur de clonage

L'ADN est mis à ligué dans le vecteur de clonage PGEM-T easy (Promega, France) sur la nuit à 14°C en utilisant la T4 DNA ligase (New England Biolabs[®] Inc) selon le protocole fourni. Le vecteur portant un gène de résistance à l'ampicilline, un test blanc/ bleu pourra être réalisé par la suite afin de sélectionner les bactéries transformées contenant le vecteur avec la séquence d'ADN d'intérêt à cloner.

4. Transformation des bactéries chimio-compétentes

Pour les études de clonage, nous avons travaillé avec les bactéries de la souche DH5α d'*Escherichia Coli* dont 50 µL des bactéries chimio-compétentes ont préalablement été aliquotées dans des tubes de 500 µL à -80°C. Les bactéries sont immédiatement placées dans la glace afin de les décongeler progressivement puis 5 µL du plasmide ligué est mis en contact avec les bactéries (50µL) pendant 30 minutes. Une fois le temps écoulé, les bactéries sont transformés avec le vecteur d'intérêt par un choc thermique où elles sont transférées de la glace vers un bain-marie à 42°C pendant 40 sec à 2 min, puis sont replongées dans la glace pendant quelques minutes avant d'être transférées dans des tubes de 2 mL contenant 250 µL de milieu S.O.C. placés sous agitation pendant 1 h à 37°C. Enfin, 30 µL de X-Gal (20 mg/mL) et 40 µL d'IPTG (100 mM) sont étalées sur une boîte d'agar contenant l'antibiotique de sélection (carbenicilline à 100 µg/mL final ou kanamycine à 50 µg/mL final) avant d'également étaler 250 µL de la suspension bactérienne, les boîtes d'agar étant incubées sur la nuit à 37°C.

5. Criblage des colonies positives

Afin de sélectionner les colonies bactériennes transformées avec le plasmide d'intérêt, un test blanc/bleu est réalisé. En effet, le vecteur de clonage utilisé code pour la β -galactosidase qui est capable de dégrader le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) en un chromophore bleu, cette réaction étant favorisée par ajout d'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) qui stimule la transcription de la β -galactosidase. L'avantage de cette technique est que le gène intérêt est inséré au niveau du gène codant pour la β -galactosidase le rendant non fonctionnel. Ainsi, les bactéries transformées avec le plasmide ligué avec le gène d'intérêt sont blanches en présence de X-Gal et d'IPTG alors que les colonies où l'insertion n'a pas eu lieu sont bleues. Les colonies blanches sont alors soigneusement prélevées et transférées dans des tubes de 15 mL contenant 4 mL de milieu TB avec de l'ampicilline, les tubes étant placés sous agitation sur la nuit à 37°C.

C. Extraction de plasmides

Après une nuit à 37°C, 500 μ L de la suspension bactérienne est récupérée pour congélation, le reste de la suspension étant centrifugée à 4.000 RPM pendant 10 min à 4°C. Le surnageant contenant le milieu de culture est éliminé puis une extraction plasmidique à partir des culots bactériens est réalisée grâce aux kits d'extraction plasmidique sur colonnes « Nucleospin[®] Plasmid/ Plasmid (NoLid) » (Macherey-Nagel) en suivant les instructions fournies. Enfin, 2 étapes successives d'éluion sont réalisées avec 50 μ L d'eau ultrapure à pH 8,35 et chauffée à 70°C afin de récupérer les plasmides dans des tubes de 1,5 mL. Enfin, les plasmides obtenus sont dosés par spectrophotométrie puis la présence de la séquence entière d'intérêt ainsi que son orientation dans les plasmides purifiés est contrôlé par une analyse de restriction.

D. Séquençage

Le séquençage des séquences d'ADN clonées dans des vecteurs de clonage est réalisé par la société GATC-biotech (Lightrun tube) spécialiste des séquençages Sanger à haut débit. Les plasmides purifiés sont fournis à raison de 80 à 100 ng/ μ L (5 μ L) avec 5 μ L à 5 μ M d'oligonucléotides, les mélanges étant réalisés dans des tubes de 1,5 mL sur lesquelles sont appliquées des étiquettes avec des codes-barres les identifiant et les résultats étant reçus par e-mail.

IV. Immunodétection

A. Extraction des protéines totales

Après un lavage au PBS (Phosphate Buffered Saline), les cellules sont reprises dans ce même tampon puis centrifugées 10 minutes à 1.000 xg. Les cellules ainsi obtenues sont lysées avec du tampon RIPA (PO₄Na₂/K, pH 7,2 à 20 mM ; Triton X-100 1% ; déoxycholate de sodium 1% ; NaCl 150 mM ; 5 mM EDTA) avec 0,1% de SDS (Sodium DodécylSulfate) en présence d'un cocktail d'anti-protéases (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatine, E-64, bestatine, leupeptine, aprotinine ; Sigma) et de 5 mM d'orthovanadate de sodium sur glace. Le lysat est ensuite soniqué (3 fois 3 secondes), laissé sur glace pendant 1 heure (minimum) puis homogénéisé et centrifugé à 10.000 xg à 4°C pendant 10 minutes pour éliminer les cellules non lysées et les noyaux. Un dosage du contenu protéique est effectué par la méthode BCA (Bicinchoninic Acid assay, Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) et en utilisant la sérum albumine bovine afin d'établir la courbe étalon.

B. Western Blot

Après extraction et dosage, les protéines (20 ou 50 µg par échantillon) sont analysées par électrophorèse monodimensionnelle en condition dénaturante sur gel d'acrylamide (6-15%) selon la technique SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). La densité du gel de polyacrylamide est déterminée selon la taille des protéines à séparer. La migration électrophorétique s'effectue à 15-30 mA/gel à une intensité fixe (50 à 140 V). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene Fluoride, 0.45µm, Millipore) par électrotransfert semi-sec (Biorad) préalablement perméabilisés dans du méthanol pendant 2 min. Le transfert s'effectue à 25 volts, 50 W et à 100 mA/gel pendant 1h30. Une fois, le transfert terminé, les sites aspécifiques de la membrane sont saturés sous agitation pendant 1 heure à température ambiante dans du TNT-lait 3% (Tris-HCL pH 7.5, 140 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 3% de lait en poudre écrémé). La membrane est ensuite incubée pendant la nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires spécifiques ([Tableau 7](#)). Le lendemain, après 3 rinçages de 15 minutes au TNT, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante dans du TNT-lait (1.5% de lait en poudre écrémé) en présence de l'anticorps secondaire au 1/10.000^e (anti-IgG de lapin ou de souris, laboratoire Zymed Inc, San Francisco CA) anti-souris ou anti-lapin) correspondant couplé à la peroxydase. Après cette incubation, la membrane est rincée (3x15 min) puis révélée par chimioluminescence à l'aide du substrat Supersignal West Dura / West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) dont la lumière émise est recueillie à l'aide d'une caméra CCD utilisant une puce de silicium sensible

à la lumière et captant les photons afin de les convertir en signaux digitaux dont les images sont recueillies par ordinateur (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences).

Dans certaines expériences, une densitométrie est effectuée, à l'aide du logiciel Image J, afin d'évaluer la variation d'expression de la protéine d'intérêt comme le canal TRPA1 dans les différents échantillons en utilisant l'expression d'une protéine de ménage, la β -actine ou la calnexine, comme standard interne. Pour cela, les rapports des intensités des bandes protéiques TRPA1/ β -actine ou calnexine des différents échantillons sont comparés entre eux pour conclure sur une variation d'expression protéique du canal TRPA1.

Anticorps	Société	Dilution WB	Dilution IF	Anticorps Secondaire	Poids moléculaire attendu (kDa)
α-actine	DAKO	/	1/100 ^e	Souris	42
α-actine	Santa Cruz	1/200 ^e	/	Souris	42
β-actine	Sigma	1/2000 ^e	/	Souris	43
BK_{Ca}	Alomone	1/500 ^e	/	Lapin	110
Calnexine	Sigma	1/2000 ^e	/	Souris	95
E-Cadhérine	Santa Cruz	1/250 ^e	1/100 ^e	Souris	80-120
IK_{Ca}	Santa Cruz	1/200 ^e	/	Lapin	45
NFAT4 (NFATc3)	Abcam	/	1/200 ^e	Lapin	116
Orail	Gentex	1/250 ^e	/	Lapin	55
Snail	Santa Cruz	1/200 ^e	1/50 ^e	Souris	29
SK3	Santa Cruz	1/200 ^e	1/100 ^e	Lapin	70
STIM1	Alomone	1/250 ^e	/	Lapin	84
TRPA1	Alomone	1/500 ^e	1/500 ^e	Lapin	127
TRPC1	Alomone	1/400 ^e	1/100 ^e	Lapin	100
TRPV6 (Cter)	Santa Cruz	1/250 ^e	1/50 ^e	Lapin	85-100
Vimentine	Santa Cruz	1/1000 ^e	1/100 ^e	Lapin	57
Zeb2 (SIP1)	Santa Cruz	1/200 ^e	/	Souris	157

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

C. Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation consiste à purifier la protéine d'intérêt et une partie de son interactome qui comprend dans ce cas un complexe de protéines. Pour cela, dans un premier temps, dans un tube de 1,5 mL, 40 µL d'une solution de billes d'agarose couplés à des protéines A/G fixant les IgG (Protein A/G PLUS-agarose immunoprecipitation reagent, Santa Cruz Biotechnologies) est mélangé avec 800µL de tampon IP (NaH_2PO_4 20 mM ; NaCl 150 mM ; pH8) et 1µg d'anticorps (Ac) dirigé contre la protéine d'intérêt puis incubé pendant 1h (minimum) à 4°C sur roue de manière à ce que les Ac d'intérêt soient couplés aux billes d'agarose. Ensuite, 500 µg d'extrait de protéines totales est ajouté au mélange billes/ Ac puis incubé sur roue à 4°C sur la nuit pour assurer la précipitation de la protéine d'intérêt et de son interactome. Le lendemain, le mélange est centrifugé à 1.000*g pendant 2 à 5 min puis le surnageant est aspiré afin d'éliminer les protéines qui n'ont pas été fixées par les Ac et entraînés avec les billes avec 1 mL de tampon de rinçage (800µL de tampon IP + 300 µL de tampon RIPA 1X) de manière à les remettre en suspension sans les aspirer. Cette opération est répétée 3 fois puis une dernière centrifugation est réalisée à 5.000*g pendant 5 min afin de culoter les billes sur lesquelles est appliqué 25 à 30 µL de tampon de Laemmli, le tout étant incubé 30 minutes à 37°C ou 5 min à 95°C (dépendant des conditions) de manière à dissocier les protéines d'intérêt et les complexes protéiques associés, des billes. Enfin, une dernière centrifugation brève à 1.000*g est réalisée puis les protéines sont déposées sur gel de polyacrylamide afin de subir les étapes décrites précédemment (Western Blot).

D. Préparation des sphéroïdes pour immunofluorescence

Afin de pouvoir réaliser les expériences de TUNEL et d'immunofluorescence sur les sphéroïdes, nous avons effectué des coupes des culots de sphéroïdes enrobés dans l'agarose et préalablement paraffinés. Pour cela, les culots de sphéroïdes fixés dans le PFA et enrobés dans l'agarose comme décrit précédemment, sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante : 1h dans l'éthanol 30%, 1h dans l'éthanol 70%, une demi-journée dans l'éthanol 96%, une nuit dans l'éthanol 100%, de nouveau 2h dans l'éthanol 100% et enfin une fois que toute l'eau des échantillons a été remplacé par l'éthanol, les culots enrobés sont incubés dans une solution de butanol (un solvant) sur la nuit, afin de remplacer tout l'éthanol contenu dans les échantillons, la paraffine n'étant pas miscible avec l'éthanol. Après cette étape de déshydratation, les culots enrobés sont immergés dans 4 bains de paraffine de 1h chacun de manière à bien remplacer tout le butanol contenu dans les échantillons par de la paraffine. Ils sont ensuite inclus en bloc de paraffine de manière à pouvoir réaliser de fines coupes de 5 à 10 µm d'épaisseur au microtome. Enfin, les coupes obtenues sont dépliées à l'aide d'eau ultrapure et déposées sur lame où elles vont être

incubées la nuit à 37°C de manière à bien adhérer aux lames. Les lames peuvent alors être conservées pendant plusieurs mois à 4°C avant utilisation pour des expériences d'immunofluorescence ou de TUNEL où elles devront préalablement subir un déparaffinage et être réhydratées. Pour cela, les lames sont soumises à 3 bains successifs de 10 minutes dans un solvant (ClaRal) et des bains décroissants d'alcool (Ethanol 100%, 96%, 70% et 30%, 10 minutes pour chaque). Les lames sont ensuite hydratées par un bain de PBS de 30 minutes à 4°C. Puis, en fonction de l'anticorps utilisé, une étape de démasquage peut être réalisée en incubant les lames dans du Tampon citrate 0.1 M pH 6 et chauffées à la cocotte-minute ou au micro-onde. Une fois refroidies, les lames de tissus ou de coupes de sphéroïdes sont rincées dans le PBS et sont soumises au même protocole que celles des cellules.

E. Immunohistochimie et immunofluorescence indirecte

L'immunohistochimie et l'immunofluorescence indirecte consistent à détecter une protéine spécifique par l'intermédiaire de 2 anticorps, un anticorps primaire et un anticorps secondaire. L'anticorps primaire est dirigé contre la protéine d'intérêt, le secondaire couplé à un fluorophore est dirigé contre le primaire et permet de détecter la présence de ce dernier. Les cellules cultivées sur lamelle de verre sont fixées par une incubation de 15 minutes en présence d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4°C. Après 3 rinçages de 5 min au PBS, et une étape de saturation de 30 minutes à 37°C dans une solution contenant de la BSA (0,2%), du triton X-100 (0,1%) et du sérum d'âne (2-5%), les cellules sont incubées pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire d'intérêt. Le lendemain, les cellules sont de nouveau rincées avec la solution de saturation puis incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 ou à l'Alexa 546 dilué au 1/1000^e dans du PBS dans le cas de l'immunofluorescence ou un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/200^e dans du PBS pour l'immunohistochimie (anti-IgG de souris ou de lapin, laboratoire Zymed Inc, San Francisco CA).

Pour l'immunofluorescence, les cellules sont rincées une première fois avec du PBS puis incubées avec du DAPI (longueur d'onde d'excitation : 350 nm et longueur d'onde d'émission : 470 nm) dilué dans du PBS à 50 ng/mL pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité afin de marquer le noyau. Les cellules sont à nouveau rincées deux fois dans le PBS puis les lamelles sont montées dans du Mowiol où du vernis est appliqué entre lame et lamelle afin de sceller la préparation. Enfin, les lames sont observées en microscopie à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) puis les images sont obtenues en microscopie confocale (LSM 700). Pour l'immunohistochimie par révélation enzymatique, les tissus ou sphéroïdes déparaffinés sont rincés 3 fois avec une solution de PBS puis sont mis en contact avec une solution de DAB (3.3 DiAminoBenzidine 4 HCl, Sigma, France) diluée dans le PBS avec

30% d'H₂O₂, afin de former un produit coloré par la peroxydase couplé aux anticorps secondaire. Une fois le signal observé (entre 5 et 30 min après ajout du DAB), la révélation est stoppée par un rinçage au PBS. Un contremarquage est alors réalisé avec du bleu azur dilué au 1/30.000^e dans du PBS pendant 8 min afin de visualiser le fond du tissu. Enfin, les lames sont montées avec du milieu de montage aqueux (MM France) puis observées grâce à un microscope à lumière transmise (Leica DMIRE 2).

Dans les cas de co-marquage avec les anticorps primaires anti- α -actine et anti-vimentine, toutes les étapes incluant la saturation jusqu'à l'incubation avec l'anticorps secondaire sont réalisées intégralement pour un anticorps à la fois (primaire et secondaire associé), l'anticorps anti- α -actine étant incubée sur la nuit à 4°C alors que l'anticorps vimentine est incubé 3h à température ambiante le lendemain.

V. Mesure de la sécrétion d'HGF et de VEGF

Pour mesurer le taux de sécrétion d'HGF et de VEGF par les cellules stromales, nous avons utilisé la technique d'ELSA. Pour cela, les facteurs sécrétés dans le milieu de culture sont dosés en utilisant un kit ELISA (VEGF Human ELISA Kit, et HGF Human ELISA Kit, Abcam) de type sandwich. Pour ce faire, un anticorps de « capture » dirigé contre une protéine d'intérêt est fixé au fond des puits d'une plaque 96 puits. Cent μ L d'un milieu de culture des cellules stromales (le surnageant ayant été centrifugé au préalable 5 min à 200 g) sont déposés dans chaque puits et incubés pendant 3 heures à la température ambiante. Le surnageant est ensuite éliminé, les puits sont rincés et incubés pendant 1h à la température ambiante avec l'anticorps de détection se fixant sur la protéine d'intérêt (ex : anti-HGF dirigé contre un autre épitope que l'anticorps de capture). Après rinçage, les puits sont incubés pendant 45 min avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps de détection et conjugué à un complexe streptavidine/péroxydase (HRP, pour Horseradish Peroxydase). Après un dernier rinçage, le substrat chromogène est ajouté pour 30 min. Ce dernier sera oxydé par la peroxydase et formera un produit coloré bleu. La mesure de l'absorbance à 450 nm (proportionnelle à la quantité de facteur de croissance présente dans nos surnageants) permettra, à l'aide d'une courbe étalon, de déterminer la concentration du facteur de croissance dans le surnageant des cellules stromales.

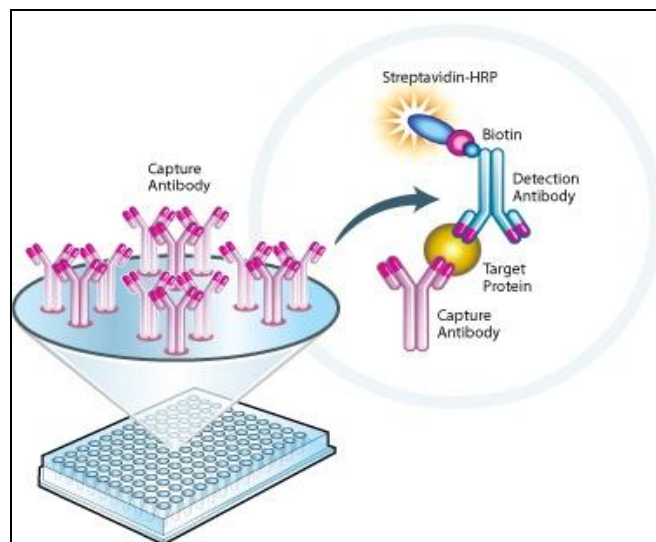


Figure 39 : Principe de l'ELISA de type sandwich
<http://www.abcam.com/cytochrome-c-profiling-elisa-kit-ab110172.html>

VI. Mesure de la viabilité cellulaire et de l'apoptose

A. Test de viabilité cellulaire MTS/PMS

Pour ces études, une méthode colorimétrique est utilisée (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, France). Cette méthode détermine le nombre de cellules viables en utilisant 2 réactifs : du MTS (sel de tétrazolium) et du PMS (phénazine méthosulfate). Des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives réduisent le MTS en formazan qui est soluble dans le milieu de culture. Cette production de formazan, mesurée par son absorbance à 490 nm, est donc directement proportionnelle au nombre de cellules viables en culture. Un mélange réactionnel est ensuite formé avec 4.75 mL de MTS à 2mg/mL et 250 µL de PMS à 0.92 µg/mL vortexé puis incubé 10 min à 37°C. Enfin, pour des cellules cultivées dans une plaque 96 puits, 40 µL du mélange réactionnel MTS/PMS est ajouté aux cellules baignant dans 200 µl de milieu de culture. La réaction s'effectue pendant 1 à 2 heures à l'obscurité dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère saturée en humidité et enrichie à 5% de CO₂ avant de mesurer l'absorbance par un lecteur de plaque (Dinex Technologies MR@422, Thermolabsystems, France).

B. Mesure de l'apoptose : coloration au Hoechst

Le bisbenzimidazole ou Hoechst 33258 (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) est un agent intercalant de l'ADN qui permet de visualiser la chromatine en microscopie à fluorescence. Après 48 à 72h de traitement avec un agent particulier comme le docétaxel par exemple, les cellules présentes dans le surnageant sont récupérées avec les cellules adhérentes préalablement

trypsinisées puis le tout est centrifugé afin d'éliminer le surnageant et le culot repris dans du PBS. Cent à deux cent μL de la suspension cellulaire est alors déposé sur une lame par force centrifuge à 1000 RPM pendant 2 min (Cytospin3, Shambon, France). Les cellules sont ensuite fixées par un bain de méthanol de 15 minutes à -20°C puis sont rincées 2 fois 5 min avec du PBS. Enfin, les lames sont incubées dans une solution de PBS contenant $4\ \mu\text{g/mL}$ de Hoechst 33258 pendant 30 minutes, à température ambiante et à l'obscurité avant d'être rincées une nouvelle fois (3 x 5 min). Les lamelles sont alors montées sur lame (au Glycergel®) et conservées à l'obscurité afin de pouvoir être observées au microscope à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) à la longueur d'onde d'excitation de 435 nm. Il est alors possible de distinguer les différentes figures apoptotiques (condensation périnucléaire de la chromatine, hyper-condensation de la chromatine, formation de vésicules apoptotiques) qui sont toutes prises en compte lors du comptage. Celui-ci nécessite 500 à 1000 cellules comptées dans des champs aléatoires et doit être répété au minimum 5 fois par condition. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellule présentant une figure apoptotique sur le nombre total de cellules comptées.

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

Durant l'apoptose, les caspases dont la caspase 3 vont activer des endonucléases spécifiques appelées CAD (Caspase Activated DNase) transloquant au noyau suite au clivage de leur inhibiteur ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase) qui masquait la séquence NLS d'adressage nucléaire. Ces endonucléases vont alors digérer l'ADN en la clivant au niveau des régions internucléosomales, générant des fragments multiples de 180 paires de bases, ce qui cause une distribution très caractéristique des fragments d'ADN en « échelle » lorsqu'ils sont séparés par électrophorèse suivant leur taille.

La technique permettant de visualiser cette échelle d'ADN est la suivante. Tout comme pour le marquage Hoechst, l'ensemble des cellules ayant ou non subi un traitement est récupéré (surnageant et cellules adhérentes trypsinisées) puis centrifugé de manière à pouvoir éliminer le surnageant et reprendre le culot dans une solution de lyse (50 mM de Tris-HCl, 10 mM d'EDTA et 1% de SDS à pH 7,5). Les protéines sont éliminées de ce lysat cellulaire par un traitement à la protéinase K ($200\ \mu\text{g/mL}$) puis le mélange lysat/protéinase K est mélangé sans utiliser le vortex pour éviter des cassures de l'ADN génomique et incubé sur la nuit à 37°C . L'ADN génomique est ensuite extrait avec un volume d'une solution de phénol-chloroforme/alcool isoamylalcool (AIA) (50 % de phénol, 48% de chloroforme et 2% d'AIA), mélangé par inversion des tubes plusieurs fois, puis laissé sur glace pendant 10 min.

L'ADN est alors isolé dans la phase supérieure par une centrifugation (10.000*g, 30 minutes) à 4°C puis le surnageant contenant l'ADN est récupéré et précipité par l'ajout d'acétate de sodium 3M (1/10ème de volume) et d'éthanol 100% (2 volumes) sur la nuit à -20°C. L'ADN est alors récupéré à l'aide d'une centrifugation (10.000*g, 30 minutes) puis lavé avec 1 mL d'éthanol 75% pendant 30 minutes à 4°C. Après l'évaporation de l'éthanol à l'air libre, l'ADN est repris dans du tampon TE (pH 8) contenant de la RNase A (20 µg/mL), sur glace. Enfin environ 10 µg d'ADN est déposé sur gel d'agarose à 1% avec BET (Bromure d'éthidium ; 0,5µg/ml) afin d'être soumis à une électrophorèse puis le gel est visualisé sous UV (254-310nm) et photographié.

D. Mesure de l'apoptose : technique du TUNEL

Tout comme l'échelle d'ADN, la technique de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) est basée sur la détection des fragments d'ADN clivé durant l'apoptose. En effet, suite au clivage par des endonucléases, l'ADN va générer des extrémités 3' OH libres. Le TUNEL consiste alors à ajouter sur les préparations un mélange composé de Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) qui va reconnaître les extrémités 3'OH libres, et de dUTPs biotinylés ou marqués avec un fluorochrome qui vont être ajoutés à ces extrémités générés par la TdT (Takayama *et al.*). Ainsi, cette technique permet de marquer les cellules apoptotiques sur coupes de tissus déparaffinés et sur les cellules cytopspinées sur lame. Durant cette Thèse, nous avons utilisé le kit « *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red » (Roche, France) afin de marquer les coupes de sphéroïdes déparaffinées ainsi que les cellules DU145 cytopspinées et fixées dans une solution de 70% de méthanol à -20°C pendant 20 min. Dans un premier temps, les coupes de sphéroïdes sont entourées de stylo hydrophobe puis perméabilisées dans du PBS contenant 0,1% de triton X-100 (le méthanol ayant déjà perméabilisé les autres préparations). Après 2 rinçages de 5 min avec du PBS, 50 µL d'un mix, composé de 50 µL de solution enzymatique contenant la TdT et 450 µL de solution contenant les dUTP couplés au TMR (TetraMethylRhodamine) red, un fluorophore (longueur d'onde d'excitation : 520-560 nm et longueur d'onde d'émission : 570-620 nm), est homogénéisé puis ajouté sur les préparations. Les lames sont alors incubées dans une atmosphère saturée en humidité à 37°C pendant 30 min à l'obscurité. Enfin, 2 rinçages sont réalisés avec du PBS avant de réaliser un contre-marquage au DAPI (50µg/mL) pendant 10 min à température ambiante également à l'obscurité afin d'établir un comptage des noyaux apoptotiques (rouge) sur la population cellulaire totale (bleu). Enfin, les lamelles sont montées dans du mowiol où du vernis est appliqué entre lame et lamelle afin de sceller la préparation puis les lames sont observées en microscopie à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) ainsi

qu'en microscopie confocale (LSM 700). Les cellules apoptotiques et non apoptotiques sont alors comptées dans plus de 10 champs choisis aléatoirement (500 cellules/champs). Cette technique du TUNEL peut être directement couplée au marquage Hoechst dans le cas des cellules appliquées sur lames par cytopspin, le contremarquage au DAPI devenant inutile.

VII. Mesure de la viabilité cellulaire et de l'apoptose

A. Test de blessure (wound healing assay)

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

B. Chambres de Boyden / Transwell®

Une autre expérience permettant d'évaluer la capacité des cellules à migrer consiste en l'utilisation des chambres de Boyden. Les cellules sontensemencées dans des inserts dont le fond est composé d'une membrane de polycarbonate percée de pores de 8 μm \varnothing qui sont eux-mêmes disposés dans une plaque 24 puits adaptée (BD Falcon). De manière à maximiser les contacts avec les pores de la membrane, environ 50 à 100.000 cellules épithéliales (LNCaP, DU145 ou PC-3) sontensemencées. Il est possible selon les traitements utilisés, de réaliser un gradient de sérum pour favoriser la migration cellulaire par chimiotactisme, avec l'insert contenant du milieu dépourvu de SVF et le puits situé en dessous contenant du milieu avec 10% de SVF (SVF). Les cellules traitées ou non sont alors incubées pendant 24h à 37°C avec une atmosphère saturée en humidité et enrichie à 5% de CO₂. Afin de faciliter le comptage par la suite, les cellules n'ayant pas migré, qui sont encore situés sur la face supérieure de l'insert,

sont retirées à l'aide de cotons tiges, les cellules de la face inférieure étant fixées en plongeant l'insert dans un nouveau puits contenant du méthanol à -20°C pendant 15 minutes. Les inserts sont ensuite marqués au Hœchst (4 µg/mL) pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité avant de subir un rinçage au PBS. Enfin, les membranes sont détachées de leur insert avec l'aide d'un scalpel et sont déposées sur une lame en prenant soin de bien appliquer la face inférieure contenant les cellules ayant migré vers le haut, puis sont montées entre lame et lamelle dans le liquide de montage Glycergel (Dako), les lames montées étant scellées à l'aide de vernis déposé entre lame et lamelle. Les lames stockées à l'obscurité peuvent alors être observées au microscope à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) à la longueur d'onde d'excitation de 435 nm afin de pouvoir réaliser les comptages dans plus de 10 champs choisis aléatoirement.

VIII. Imagerie de fluorescence quantitative du calcium libre cytosolique

L'imagerie calcique par fluorescence permet de mesurer des variations de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire sur plusieurs cellules (de 25 à 150 cellules selon le type cellulaire) simultanément dans un champ déterminé tout en respectant l'intégrité cellulaire sans endommager les membranes. Cette technique repose sur l'utilisation de sondes calciques fluorescentes. Les premières sondes permettant de mesurer le Ca^{2+} libre intracellulaire furent synthétisées dans les années 1980 par l'équipe de Tsien (Tsien, 1980; Tsien *et al.*, 1982), chercheur récemment décédé, qui a été co-lauréat en 2008 pour le prix nobel de chimie pour la découverte et le développement de la GFP et qui a participé au développement de nombreuses sondes intracellulaires. Pour les études d'imagerie calcique réalisées lors de cette thèse, nous avons essentiellement utilisé la sonde calcique ratiométrique Fura-2 pour mesurer les variations de calcium cytoplasmique.

A. Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2

Le Fura-2 se compose d'un fluorophore stilbène associé à un groupement tétracarboxylé et octacoordonné caractéristique des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA (Grykiewicz, Poenie & Tsien, 1985). Nous avons utilisé le Fura-2 sous une forme lipophile non chargée appelée Fura-2 acétoxyméthylester ou Fura-2/AM. Cette forme tranverse la membrane plasmique des cellules afin d'être retenue au sein du cytoplasme par hydrolyse du groupement acétoxyméthylester par des estérases endogènes. Le Fura-2 libéré de ce groupement peut se lier au calcium, devient acide et entraîne un déplacement du spectre d'excitation, donnant lieu à une fluorescence proportionnelle à la concentration en calcium

libre intracellulaire. La sonde Fura-2 est dite ratiométrique. En effet, lorsque la sonde est libre sa longueur d'onde d'excitation est de 380 nm alors que lorsqu'elle est liée au calcium sa longueur d'onde d'excitation est de 340 nm, avec une longueur d'onde d'émission de fluorescence de 510 nm dans les deux cas. C'est donc le rapport des intensités de fluorescence émises après excitation à 340 et 380 nm qui permet d'estimer les variations de calcium intracellulaire.

B. Système optique

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

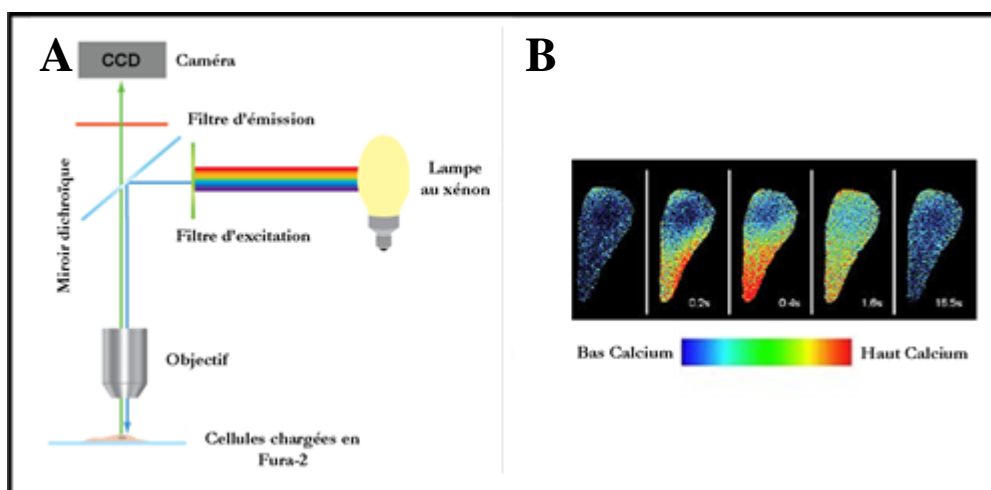


Figure 40 : A, Schéma simplifié d'un poste d'imagerie calcique. B, Spectre de couleurs représentatif des concentrations en Ca^{2+} intracellulaire complexé au Fura-2.

La lampe arc xénon de 100 W à haute pression émet de la lumière dont la longueur d'onde est réglée à l'aide d'un filtre monochromateur (Fill Photonics). Les rayonnements cheminent *via* une fibre optique et traversent les miroirs dichroïques : les signaux à 380 et 340 nm provenant du monochromateur sont orientés spécifiquement vers la préparation cellulaire, tandis que le signal de réponse à 510 nm, provenant de la préparation cellulaire, est orienté spécifiquement vers la caméra digitale (Figure 40A). Les signaux lumineux à 510 nm sont capturés par la caméra CCD et convertis en signaux numériques qui sont quantifiés par le système d'analyse et visualisés en fausse couleur en fonction de leur intensité lumineuse sur l'écran de

l'ordinateur (gamme allant du bleu au rouge, respectivement pour des concentrations basses à élevées en calcium intracellulaire) (Figure 40B). La fréquence d'acquisition moyenne utilisée est d'une image toutes les 3 secondes.

C. Calibration des signaux de fluorescence

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

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

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

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

D. Milieu d'enregistrement

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

E. Charge des cellules en Fura-2

Les cellules sont chargées pendant 45 minutes, à 37°C et à l'obscurité avec 5 μM de Fura-2/AM (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas). Une fois le temps de charge écoulé, 3 rinçages successifs sont effectués avec le milieu HBSS contenant 2 mM de Ca²⁺ (HBSS 2 Ca²⁺).

Chaque cellule présente alors une charge relativement homogène indiquant que le Fura-2 ne pénètre pas dans les organites intracellulaires connus pour stocker le calcium interne. Les données brutes d'imagerie calcique sont ensuite analysées en utilisant le logiciel d'analyse Origin 8.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA) et présentées sous forme d'une variation du calcium intracellulaire en fonction du temps.

IX. Etude de l'exocytose à l'aide de FM1-43, un marqueur du trafic membranaire

Afin d'étudier l'impact de l'activation du canal TRPA1 sur l'exocytose, une sonde lipophile a été utilisée : le FM1-43(N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-dibutylaminostyryl)pyridinium dibromide, Calbiochem) (5 μ M) qui est une sonde styryl, soluble dans l'eau où elle n'est pas fluorescente. Cette sonde est souvent utilisée pour suivre le trafic membranaire intracellulaire (Angleson *et al.*, 1999; Cochilla *et al.*, 1999; Brumback *et al.*, 2004) car en s'insérant dans le feuillet externe de la membrane plasmique, elle devient fluorescente jusqu'à atteindre un équilibre de concentration entre la membrane et le milieu externe. Ainsi, lorsque l'exocytose est induite, la surface membranaire augmente et cela est visualisé par une augmentation de fluorescence dans la zone membranaire observée. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du FM1-43 sont respectivement de 488 et 510 nm. Le FM1-43 s'internalisant très vite dans la cellule, la sonde est ajoutée est conservée dans l'HBSS pendant toute la manipulation qui se doit d'être brève dans le temps.

Résultats

Article 1

TRPA1 activation in prostate cancer-associated fibroblasts induces HGF secretion and chemotherapeutic resistance in prostate cancer cells

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Pascal Mariot, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Lucile Noyer, Marine Warnier, Alexandre Bokhobza, Christian Slomianny, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Emilie Desruelles, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki.

Manuscrit en revision dans *Oncotarget*

On considère que plus de 90% des patients avec un CaP androgéno-réfractaire développent des métastases osseuses souvent accompagnées de douleurs et de fractures osseuses (Hotte et Saad, 2010). A ce stade où le cancer est particulièrement agressif, la médiane de survie est comprise entre 18 et 24 mois (Attar *et al.*, 2009), les traitements employés à ce moment ne permettant que d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients sans réellement permettre une rémission du cancer. En effet, les cellules tumorales sont capables de développer des résistances aux différents traitements employés comme la doxorubicine ou le docétaxel, des agents chimiothérapeutiques utilisés afin de stopper la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose des cellules cibles. Parmi les facteurs intervenant dans cette résistance, il a été montré que le stroma tumoral jouait un rôle clé *via* la mise en place de communications réciproques avec les cellules tumorales en sécrétant des facteurs solubles et insolubles propices à l'acquisition d'une résistance à l'apoptose et au développement des cellules tumorales indépendamment des traitements employés. Dans ce contexte, des chercheurs du laboratoire ont montré l'expression d'un canal cationique, le canal TRPA1 dans le stroma tumoral prostatique susceptible d'intervenir dans les interactions épithélio-stromales en modulant la physiologie des cellules stromales notamment par une entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Ainsi, le but de cet article était de déterminer le rôle du canal TRPA1 dans la physiologie des cellules stromales associées au cancer (CAF) et dans les interactions épithélio-stromales mises en place dans le CaP humain et le rôle dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements anti-tumoraux.

Dans le cadre de cette étude, nous avons montré par des techniques de RT-PCR, d'immunohistochimie et de Western Blot que le canal TRPA1 était spécifiquement exprimé dans le stroma tumoral associé au cancer, en particulier dans les CAFs prostatiques alors que son expression était absente au niveau des cellules épithéliales tumorales. Par des études d'imagerie calcique et d'ELISA, nous avons également montré que le canal TRPA1 stromal était fonctionnel et que son activation induisait une entrée importante de Ca^{2+} dans les cellules conduisant à la sécrétion

d'HGF, un facteur clé dans l'induction des processus d'EMT et de motilité des cellules tumorales. Dans ces études, nous avons observé que l'activation du canal induisait la translocation nucléaire du facteur de transcription NFATc3 conduisant à l'expression génique d'HGF et de VEGF. Par la suite, nous avons mis en évidence la capacité des cellules tumorales à activer directement le canal et à favoriser son expression par la sécrétion d'agonistes comme l'ET-1, dont le rôle dans la tumorigenèse prostatique est bien établi. La fixation de l'ET-1 sur son récepteur induit la déplétion des stocks calciques intracellulaires *via* la voie PLC β /IP $_3$ et l'activation consécutive du canal TRPA1. Enfin, par des expériences de co-cultures 2D et 3D entre les cellules épithéliales prostatiques androgéno-indépendantes DU145 et les CAFs prostatiques, couplées à la technique du TUNEL et de l'échelle d'ADN, nous avons montré dans un premier temps que l'HGF et les facteurs de croissance sécrétés par les CAFs favorisaient la résistance des cellules tumorales à l'apoptose normalement induite par des agents chimiothérapeutiques comme la doxorubine et le docétaxel. De façon très intéressante, nous avons observé que l'inhibition du canal TRPA1 resensibilisait les cellules tumorales à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques.

Ces travaux mettent pour la première fois en évidence l'importance du canal TRPA1 stromal dans les interactions épithélio-stromales des CaP chez l'Homme dont l'ouverture permet un influx calcique favorable à l'expression et à la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF et dont le ciblage permet de resensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques.

Ces données suggèrent que le canal TRPA1 stromal peut constituer cible potentielle utilisable dans les co-traitements des cancers prostatiques.

Contributions : Hormis les expériences d'immunohistochimie réalisées en collaboration avec l'équipe du professeur Pierre Gosset (Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille), j'ai effectué toutes les expériences décrites dans ce papier sous la supervision du professeur Morad Roudbaraki.

Oncotarget

[MANUSCRIPT HOME](#)[AUTHOR INSTRUCTIONS](#)[CITATION FORMATTING](#)[LOGOUT](#)[JOURNAL HOME](#)

Manuscript #	019664
Current Revision #	0
Other Version	019664R1
Submission Date	2016-08-16 20:01:45
Current Stage	Revision Received
Title	TRPA1 activation in prostate cancer-associated fibroblasts induces HGF secretion and chemotherapeutic resistance in prostate cancer cells
Manuscript Type	Research Paper
Corresponding Author	Morad Roudbaraki (University of Lille 1)
Contributing Authors	Eric Vancauwenberghe , Sandra Derouiche , Pascal Mariot , Loic Lemonnier , Pierre Gosset , Lucile Noyer , Marine Warnier , Alexandre Bokhobza , Christian Slomianny , Etienne Dewailly , Philippe Delcourt , Laurent Allart , Emilie Desruelles , Brigitte Mauroy , Jean-Louis Bonnal , Natacha Prevarskaya
Abstract	<p>Carcinomas are composed of two interdependent components: the neoplastic epithelial cells and the supporting tumour stroma including cancer associated fibroblasts (CAF). The latter plays decisive roles including resistance to chemotherapeutic agents via the secretion of growth factors and cytokines. A rise in intracellular Ca²⁺ concentration via an influx through the membrane Ca²⁺ channels is the main mechanism inducing exocytosis. In this context, we have recently shown that the Ca²⁺-permeable channel TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) was expressed in human prostate cancer (PCa) stromal cells (PrCSC, CAF). Therefore, we hypothesized that TRPA1 channel could be a key mediator in epithelial-stromal interactions by modulating growth factors secretion, actively participating to prostate carcinogenesis and therapeutic escape. In the present work, by using primary cultured PrCSC (CAF) derived from human PCa patients, we studied the role of TRPA1 in the physiology of prostate cancer stromal cells and more particularly in the expression and secretion of Hepatocyte Growth Factor (HGF). We further studied the modulation of the expression and functionality of TRPA1 within epithelial-stromal crosstalk and determined the involvement of the channel in the PCa cells resistance to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. The present data suggest that the stromal (CAF) TRPA1 channel is a key actor of the prostate tumor microenvironment. Targeting the TRPA1 channel could thus constitute a valuable tool in tumor microenvironment to disrupt epithelial-stromal interactions in human PCa. In combination with chemotherapeutic agents, TRPA1 inhibition could promote apoptosis induced by chemotherapeutic agents by modulating growth factors secretion by CAF.</p>

Keywords

ion channels, TRPA1, prostate cancer, cancer-associated fibroblasts, tumor microenvironment

Conflict of Interest**No**, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.**Decision**[Major Revisions](#) / 2016-09-21**Manuscript Items**

1. Author Cover Letter [PDF \(99KB\)](#) [Source File \(DOC\) 44KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 7 Figure files. [PDF \(5588KB\)](#)
 - a. Article File [PDF \(297KB\)](#) [Source File \(DOC\) 437KB](#)
 - b. Figure 1 [PDF \(1425KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1634KB](#)
TRPA1 channel expression and functionality in prostate cancer-associated fibroblasts
 - c. Figure 2 [PDF \(283KB\)](#) [Source File \(TIF\) 371KB](#)
Involvement of TRPA1 channel in Endothelin-1 (ET-1)- induced calcium response and secretion in prostate cancer CAF cell
 - d. Figure 3 [PDF \(463KB\)](#) [Source File \(TIF\) 517KB](#)
Factors secreted by PCa cells modulate TRPA1 expression in PrCSC
 - e. Figure 4 [PDF \(605KB\)](#) [Source File \(TIF\) 767KB](#)
TRPA1 activity promotes growth factors expression through NFAT nuclear translocation
 - f. Figure 5 [PDF \(1121KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1353KB](#)
Involvement of TRPA1 channel in chemoresistance of DU145 cells via paracrine interactions
 - g. Figure 6 [PDF \(1132KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1264KB](#)
Involvement of TRPA1 channel in chemoresistance of DU145 cells in a spheroid model
 - h. Figure 7 [PDF \(263KB\)](#) [Source File \(TIF\) 446KB](#)
Schematic view of the TRPA1 ion channel involvement in epithelial-stromal interactions and in the resistance of the PCa cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents

More Manuscript Info and Tools[Send Manuscript Correspondence](#)[Decision Summary](#)[Check Status](#)[MANUSCRIPT HOME](#)[HELP FOR AUTHORS](#)[CITATION FORMATTING](#)[REVIEWER INSTRUCTIONS](#)[LOGOUT](#)

Licensed under Patent #US 7,620,555B1

Oncotarget

[MANUSCRIPT HOME](#)[AUTHOR INSTRUCTIONS](#)[CITATION FORMATTING](#)[LOGOUT](#)[JOURNAL HOME](#)

This is a revision.

Manuscript #	019664R1
Current Revision #	1
Other Version	019664
Submission Date	2016-09-23 03:10:17
<u>Current Stage</u>	Manuscript Submission
Title	TRPA1 activation in prostate cancer-associated fibroblasts induces HGF secretion and chemotherapeutic resistance in prostate cancer cells
Manuscript Type	Research Paper
Corresponding Author	Morad Roudbaraki (University of Lille 1)
Contributing Authors	Eric Vancauwenberghe , Sandra Derouiche , Pascal Mariot , Loic Lemonnier , Pierre Gosset , Lucile Noyer , Marine Warnier , Alexandre Bokhobza , Christian Slomianny , Etienne Dewailly , Philippe Delcourt , Laurent Allart , Emilie Desruelles , Brigitte Mauroy , Jean-Louis Bonnal , Natacha Prevarskaya
Abstract	
Keywords	ion channels, TRPA1, prostate cancer, cancer-associated fibroblasts, tumor microenvironment
Conflict of Interest	No , there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.

Manuscript Items

1. Author Cover Letter [PDF \(99KB\)](#) [Source File \(DOC\) 44KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 7 Figure files. [PDF \(5588KB\)](#) [Approve](#)
 - a. Article File [PDF \(297KB\)](#) [Source File \(DOC\) 437KB](#)
 - b. Figure 1 [PDF \(1425KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1634KB](#)
TRPA1 channel expression and functionality in prostate cancer-associated fibroblasts
 - c. Figure 2 [PDF \(283KB\)](#) [Source File \(TIF\) 371KB](#)
Involvement of TRPA1 channel in Endothelin-1 (ET-1)- induced calcium response and secretion in prostate cancer CAF cell
 - d. Figure 3 [PDF \(463KB\)](#) [Source File \(TIF\) 517KB](#)
Factors secreted by PCa cells modulate TRPA1 expression in PrCSC
 - e. Figure 4 [PDF \(605KB\)](#) [Source File \(TIF\) 767KB](#)
TRPA1 activity promotes growth factors expression through NFAT nuclear translocation
 - f. Figure 5 [PDF \(1121KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1353KB](#)

Involvement of TRPA1 channel in chemoresistance of DU145 cells via paracrine interactions

g. Figure 6 [PDF \(1132KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1264KB](#)

Involvement of TRPA1 channel in chemoresistance of DU145 cells in a spheroid model

h. Figure 7 [PDF \(263KB\)](#) [Source File \(TIF\) 446KB](#)

Schematic view of the TRPA1 ion channel involvement in epithelial-stromal interactions and in the resistance of the PCa cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents

There are action items pending. Please click on the links next to the arrows → .

Manuscript Workflow Tasks

→ [Continue Halted Submission](#)

More Manuscript Info and Tools

[Delete Halted Submission](#)

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Check Status](#)

[MANUSCRIPT HOME](#)

[HELP FOR AUTHORS](#)

[CITATION FORMATTING](#)

[REVIEWER INSTRUCTIONS](#)

[LOGOUT](#)



Licensed under Patent #US 7,620,555B1

TRPA1 activation in prostate cancer-associated fibroblasts induces HGF secretion and chemotherapeutic resistance in prostate cancer cells

Eric Vancauwenberghe¹, Sandra Derouiche¹, Pascal Mariot¹, Loïc Lemonnier¹, Pierre Gosset², Lucile Noyer¹, Marine Warnier¹, Alexandre Bokhobza¹, Christian Slomianny¹, Etienne Dewailly¹, Philippe Delcourt¹, Laurent Allart¹, Emilie Desruelles¹, Brigitte Mauroy^{1,3}, Jean-Louis Bonnal^{1,3}, Natalia Prevarskaya¹ and Morad Roudbaraki^{1*}.

Affiliations

¹. Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

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

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

Keywords: ion channels, TRPA1, Prostate cancer, cancer-associated fibroblasts, tumor microenvironment.

Number of figures: 7

Number of tables: 1

*To whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003

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

Fax: (33) 3 20 43 40 66

Phone: (33) 3 20 33 64 23

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

ABSTRACT

Carcinomas are composed of two interdependent components: the neoplastic epithelial cells and the supporting tumour stroma including cancer associated fibroblasts (CAF). The latter plays decisive roles including resistance to chemotherapeutic agents *via* the secretion of growth factors and cytokines. A rise in intracellular Ca^{2+} concentration *via* an influx through the membrane Ca^{2+} channels is the main mechanism inducing exocytosis. In this context, we have recently shown that the Ca^{2+} -permeable channel TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) was expressed in human prostate cancer (PCa) stromal cells (PrCSC, CAF). Therefore, we hypothesized that TRPA1 channel could be a key mediator in epithelial-stromal interactions by modulating growth factors secretion, actively participating to prostate carcinogenesis and therapeutic escape. In the present work, by using primary cultured PrCSC (CAF) derived from human

PCa patients, we studied the role of TRPA1 in the physiology of prostate cancer stromal cells and more particularly in the expression and secretion of Hepatocyte Growth Factor (HGF). We further studied the modulation of the expression and functionality of TRPA1 within epithelial-stromal crosstalk and determined the involvement of the channel in the PCa cells resistance to apoptosis induced by chemotherapeutics agents. The present data suggest that the stromal (CAF) TRPA1 channel is a key actor of the prostate tumor microenvironment. Targeting the TRPA1 channel could thus constitute a valuable tool in tumor microenvironment to disrupt epithelial-stromal interactions in human PCa. In combination with chemotherapeutic agents, TRPA1 inhibition could promote apoptosis induced by chemotherapeutic agents by modulating growth factors secretion by CAF.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the major causes of cancer-related death in men in western countries. Chemotherapies coupled with androgen-deprivation therapy (ADT) to prevent androgens from binding to the androgen receptor (AR) have been the norm for prostate cancer treatment over recent decades. Despite an early success in suppressing prostate tumor growth, in some cases the emergence of hormone-refractory cancer cells leads to tumor growth in a hormone-refractory manner and associated with an increased risk of metastasis. In these cases of advanced PCa, several other palliative treatments, such as the taxanes (paclitaxel or docetaxel), estramustine phosphate (EMP) or prednisone have been used for hormone-resistant prostate cancer (HRPC) and have shown good response [1-4]. However, HRPC treated patients with these chemotherapeutic agents also relapses and their prognosis after the relapse is extremely poor. There is thus an urgent need to investigate the mechanisms of chemotherapy resistance in order to design new therapeutic targets.

Carcinomas are composed of two interdependent components: the neoplastic epithelial cells and the supporting tumour stroma. The latter plays decisive roles in pivotal processes such as tumor cell proliferation, invasion and tumor vascularization [5-7] *via* the secretion of growth factors and cytokines. Following epithelial changes in carcinogenesis, the surrounding stroma is modified by cancer cell-derived factors. These modifications drive the emergence of the characteristic reactive stroma: modified stromal cells secreting extracellular matrix proteins and soluble factors (cytokines, growth factors), which in turn play important roles in the initiation and/or progression of certain carcinomas [8-11], including breast and prostate [12-14]. In this context of epithelial-stromal interactions, tumor cells are also able to secrete soluble factors such as Endothelin-1 (ET-1) in order to favour their own development by targeting stromal cells. ET-1 is a vasoactive peptide known to contribute to tumor progression and to be present at high plasma concentration in patients with metastatic and hormone refractory PCa [15]. In return, stromal cells secrete many cytokines and growth factors including the angiogenesis promoting factor vascular endothelial growth factor (VEGF) or the fibroblast growth factor (FGF) and hepatocyte growth factor (HGF). These stromal secreted factors such as HGF targeting the prostate cancer cells might contribute to the resistances developed by patients undergoing chemotherapy. HGF is shown to be abundantly expressed and secreted in the tumor microenvironment and is known to promote proliferation and epithelial cell motility. These effects on cancer cells are mediated *via* the c-Met receptor which is also overexpressed in prostate cancer and further increased in expression in bone metastasis and is associated with the development of castrate-resistant PCa disease. Because of its importance as a target, c-Met inhibitors have reached clinical trial for

advanced castrate-resistant prostate cancer [16]. These stromal secreted factors such as HGF targeting the prostate cancer cells could also be responsible of the resistance developed in the patients treated with chemotherapeutic agents. Binding of HGF to c-MET leads to receptor dimerization and autophosphorylation resulting in the activation of multiple cellular pathways that support cancer progression. In addition, recent data show that HGF is the main factor promoting chemoresistance in several cancers [17, 18]. Thus, inhibiting c-MET in cancer cells and/or the secretion of HGF in combination with other approaches in the tumor microenvironment could significantly improve the success of chemotherapy. Indeed, a growing number of studies have demonstrated the importance of deciphering the relationship between epithelial tumor cells and their microenvironment in order to improve available chemotherapeutics treatments. In this regard, the modulation of stromal factors secretion could impact the initiation or progression of prostate cancers and the identification of such modulators might provide new targets in the PCa chemotherapies and/or PCa treatments in general.

Ion channels are integral membrane proteins that form a pore to allow the passage of specific ions by passive diffusion. A rise in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) near the plasma membrane due to Ca^{2+} influx through the membrane Ca^{2+} channels is the main mechanism inducing exocytosis [19-21]. However, a great variation seems to exist with respect to which types of Ca^{2+} channels are expressed in secretory cells and to what degree they participate in eliciting secretion. In cancers, the alterations in Ca^{2+} homeostasis due to the modulation of ion channels expression and activity can be essential in the carcinogenesis and/or its progression by modulating processes including cell growth, differentiation, migration or secretion.

In this context, we have recently shown that TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1), a Ca^{2+} permeable non-selective cation channel, was exclusively expressed in human prostate cancer stromal cells (PrCSC). We also showed that an environmental factor, triclosan, induced the activation of the channel, leading to a calcium increase and VEGF secretion in primary cultured PrCSC cells (under publication). We thus hypothesized that TRPA1 channel could mediate epithelial-stromal interactions through growth factors secretion and could therefore actively participate in prostate carcinogenesis and therapeutic escape. In the present work, by using primary cultured stromal cells derived from prostate cancer patients, we studied the role of TRPA1 channel in the physiology of prostate cancer stromal cells, in the expression and secretion of HGF growth factor and the mechanisms involved in the latter phenomenon. We further studied the modulation of the expression and functionality of the TRPA1 channel within epithelial-stromal crosstalk, its involvement in epithelial stromal interactions and in

the resistance of the epithelial cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. Taken together, our data suggest that targeting stromal TRPA1 channel could constitute a tool in tumor microenvironment to disrupt epithelial-stromal interactions and appears as a valuable target for the treatment of prostate cancer. Indeed, in combination with chemotherapeutic agents, TRPA1 inhibition (and/or down-regulation) could decrease growth factors secretion by stromal cells and promote apoptosis induced by chemotherapeutic agents.

RESULTS

TRPA1 channel is expressed in human prostate cancer stromal cells

In a recent work, using a limited number of human PCa tissues, we have shown that TRPA1 channel was exclusively expressed in human PCa stromal cells whereas its expression was absent in tumoral epithelial cells (under publication). In the present work, we studied the expression of TRPA1 in 85 PCa tissues of commercial and non-commercial sources. By using immunohistochemical techniques, we observed that TRPA1 expression was present in PrCSC cells of 87% (74 out of 85) of prostate cancer tissues studied and that it presented a specific pattern of expression in stromal cells (Figure 1A). In these experiments, the expression of the channel in adjacent normal or Benign Prostate Hyperplasia (BPH) tissues appeared to be absent or faintly present. We further carried out *in vitro* studies using primary cultured stromal cells from prostate cancer tissues (PrCSC). As for our previous studies, we have first characterized the PrCSC in each primary culture originated from patients for the expression of stromal cells markers by immunofluorescence studies using antibodies raised against α -actin and vimentin (Figure 1A). We observed in our cultures three types of cells in a different proportion depending on primary cell culture origin: fibroblasts expressing vimentin, smooth muscle cells expressing both markers. Depending on which patient the culture originated from, these myofibroblasts ranged from 50 to 90% of the total cell populations. Before investigating the role of TRPA1 channel in the tumor microenvironment of human prostate, for each primary culture of PrCSC, we first confirmed the expression of the channel at mRNA and protein level by RT-PCR and immunofluorescence studies respectively (Figure 1A and 1B). Our results show that TRPA1 channel was expressed in all the primary cultured PrCSC used in the present work.

TRPA1 channel is functional in human prostate cancer stromal cells

To determine the channel functionality in PrCSC, we used the Ca^{2+} imaging technique by using the ratiometric dye Fura-2, in the presence of a well-known TRPA1 channel activator, allyl isothiocyanate (AITC), a synthetic compound derived from mustard-oil. We observed that AITC induces a rapid increase

in cytosolic free calcium concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in PrCSC in a dose-dependent manner and that in most cases, a sustained plateau was reached for an a concentration of 30 μM (data not shown). In order to assess the specificity of TRPA1 activation by AITC, we used HC-030031 (50 μM), a selective inhibitor of the channel. After application of HC-030031 on the cells, the amplitude of the AITC-induced calcium response was decreased by approximately $77 \pm 7.9\%$ (Figure 1E), confirming the functionality of the TRPA1 channel in these cells. Similar results were obtained by using another well-known inhibitor of the TRPA1, A967079 (1 μM), where the AITC-induced calcium response was inhibited by $81 \pm 9\%$ (Figure 1F).

To confirm the functionality of TRPA1 channel in these cells, we used 3 specific siRNAs (siTRPA1-1 to siTRPA1-3) targeting different parts of hTRPA1 coding sequence. All three siTRPA1 showed similar efficiency to decrease the TRPA1 mRNA and the proteins and the siTRPA1-1 was then used in the studies presented. As shown, the transfection of the cells with siTRPA1-1 (25nM, 48h) induced 80 to 90% reduction in both mRNA (Figure 1C) and protein expression (Figure 1D) levels. Forty eight hours after transfection of cells with siTRPA1 (25 nM), AITC-induced calcium entry was reduced by $68 \pm 3.5\%$ when measured the pic amplitude of the calcium entries (Figure 1G), confirming the involvement of TRPA1 in the AITC-induced calcium response in PrCSC. Next, we investigated the involvement of TRPA1 in secretion of PrCSC cells. We first carried out fluorescence imaging of FM1-43, a fluorescent lipophilic dye used for tracking membrane traffic [22]. When FM1-43 was admitted into the perfusion chamber, cell fluorescence progressively reached a stable level. At this stage, as observed in conventional imaging experiments, FM1-43 fluorescence was preferentially localized at the cell periphery, indicating a plasma membrane localization. At this moment, once AITC (30 μM) was introduced into the perfusion chamber, FM1-43 fluorescence rapidly increased (Figure 1H). In average, AITC (30 μM) induced an increase in FM1-43 fluorescence by $406 \pm 12\%$ ($n = 110$) (Figure 1H). Moreover, the AITC-induced increase in fluorescence was completely abolished in the presence of TRPA1 inhibitor HC-030031 (50 μM). These observations suggest that the activation of the channel by AITC increases the membrane surface of the PrCSC cells certainly due to stimulation of exocytosis.

We then used ELISA assays to further investigate the role of the channel in the secretion of growth factors by PrCSC cells, with a special focus on a factor involved in tumor cells motility and invasion and resistance to apoptosis, the HGF. For this purpose, HGF detection was realized in the conditioned media from PrCSC treated or not with HC-030031 (50-100 μM , 24h) and with AITC (10-50 μM , 24h). Interestingly, the basal HGF secretion was inhibited by HC-030031 with a maximal decrease of 45%

compared to the control (Figure 1I). On the other hand, the incubation of stromal cells with AITC

clearly induced an increase in HGF secretion in a

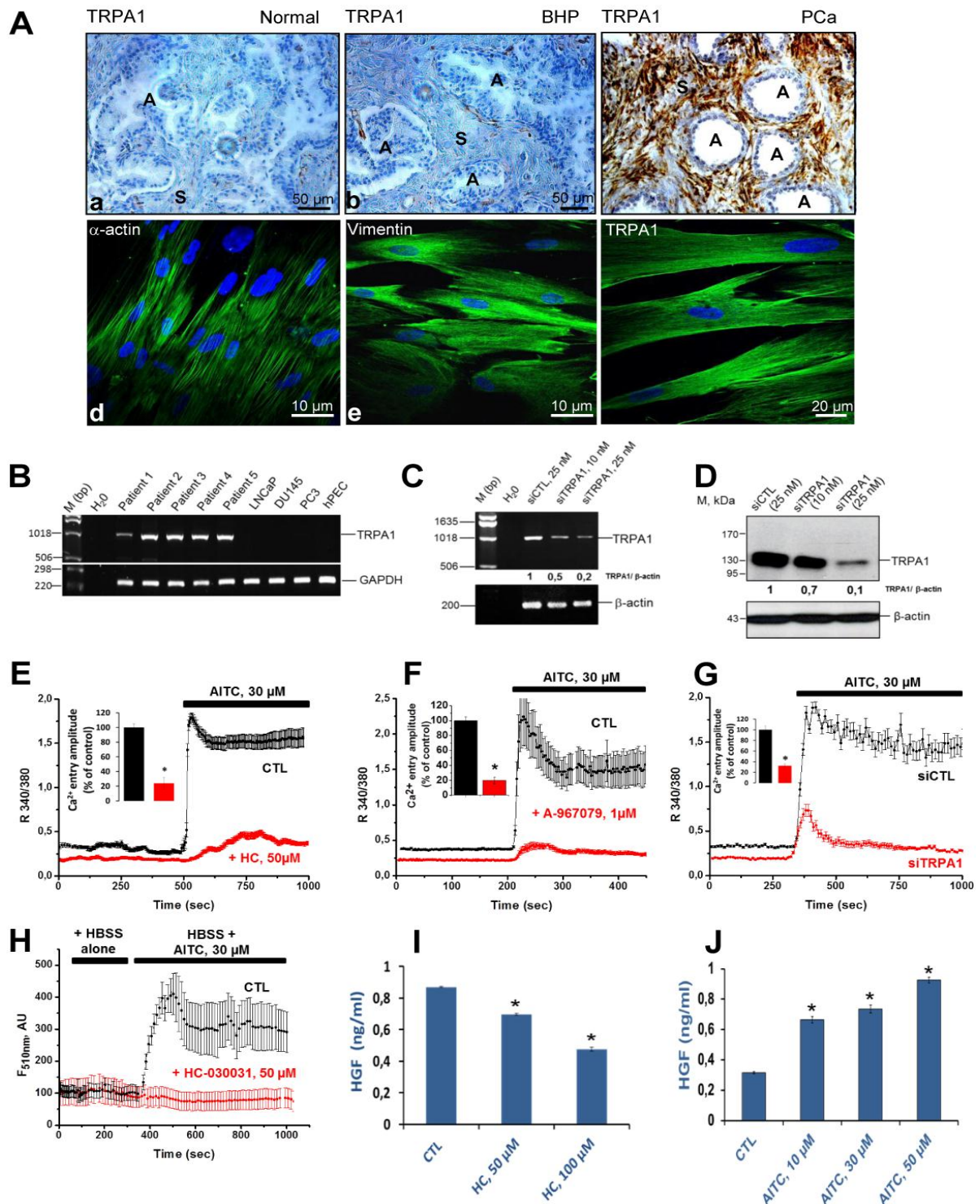


Figure 1: TRPA1 channel expression and functionality in prostate cancer-associated fibroblasts

(A) TRPA1 expression was studied by immunohistochemistry using an antibody raised against TRPA1 on human PCa and adjacent non-cancer tissues (a, b, c). BHP, Benign Prostate Hyperplasia; A, Acinus; S, Stroma. Immunofluorescence studies were performed in order to characterize primary cultured stromal cells from human prostate cancer tissues (PrSC) using α actin (d) and vimentin antibodies (e). The TRPA1 channel expression was assessed in these cells using TRPA1 antibody (f). Nuclei are stained by DAPI (blue). (B) Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed to study the expression of TRPA1 (994 bp) mRNA using specific primers in PrCSC from 5 different patients, in prostate cancer epithelial cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3) and in hPEC primary epithelial cells. siTRPA1 down-regulation efficacy was assessed by RT-PCR (C) and Western Blotting (D) on PrCSC, after siRNA treatments (10 and 25nM, 48h). TRPA1 expression rate in each sample is normalized by densitometry using β -Actin expression as intern standard. The TRPA1 functionality was studied by calcium imaging experiments using AITC (30 μ M), a known TRPA1 channel activator in the absence ($n=158$) or presence of a TRPA1 channel inhibitors (HC-030031, 50 μ M) ($n=182$) (E) or A967079 (1 μ M), $n=152$) (F) in non-transfected PrCSC and in siCTL ($n=135$) and siTRPA1-transfected cells (G) ($n=124$). (H) Conventional imaging of PrCSC cells in the presence of 5 μ M FM1-43, a membrane surface probe. In these experiments, FM1-43 was continuously present in the bath. Most of the fluorescence integrated to the cells was located in the plasma membrane. After selecting one membrane region per cell, time lapse imaging of FM1-43 was realized on PrCSC cells. (I, J), ELISA assays for HGF secretions in conditioned media. PrCSC (10^5 cells/sample) were incubated in the presence or absence of TRPA1 channel inhibitor (HC-030031) in 10% FBS for 24h (I) and TRPA1 channel activator (AITC) in 0,5%

FBS for 24h (J). Then, ELISA assays for HGF secretions were realized on 24h stromal cells conditioned media. *, $P < 0.001$ relative to CTL conditions.

dose-dependent manner, reaching more than 2.9 fold of secretion rates of the control (Figure 1J), suggesting that the activation of TRPA1 in prostate cancer stromal cells is involved in HGF secretion and that it could participate to epithelial-stromal interactions. In this crosstalk context, the TRPA1 channel activity and/or expression could be modulated by agonists originating from epithelial tumor cells.

TRPA1 channel mediates the calcium signaling induced by epithelial factors in stromal cells

Among the different factors involved in prostate cancer, ET-1 is known to be secreted by PCa epithelial tumor cells [15] and therefore could act as a paracrine regulator of the tumor stroma. For this purpose, we studied its mRNA expression by RT-PCR and its release in the conditioned media (CM) of epithelial cells by dot-blot analysis. We observed that both androgen-independent cell lines DU145 and PC-3 express and secrete abundantly ET-1 in basal conditions, whereas the androgen-dependent cell line LNCaP displayed a low mRNA expression and no secretion of the protein (Figures 2A and 2B). Moreover, we showed that ET_A-R and ET_B-R are expressed by PrCSCs issued from different PCa patients (Figure 2C). After binding to its G protein-coupled receptors ET_A-R and ET_B-R and activating

PLC β pathway on stromal cells, ET-1 can induce an increase in intracellular Ca²⁺ concentration by the concerted action of IP3 receptors and membrane ion channels that could include TRPA1 (Figure 2G). To verify this hypothesis, we performed calcium imaging experiments with a calcium switch protocol where ET-1 (100 nM) is applied first in a calcium-free medium to show the rate of calcium mobilization from internal stores and then in a 2 mM calcium containing medium to visualize the rate of calcium entry. As shown in Figure 2D, ET-1 was able to induce a Ca²⁺ mobilization followed by a rapid and transient Ca²⁺ entry in PrCSCs. In these experiments, the ET-induced calcium entry was decreased by 74 \pm 2% when TRPA1 was inhibited by HC-030031 (50 μ M) (Figure 2D) and by 62 \pm 14% in siTRPA1-transfected cells (Figure 2E). These data indicate that the ET-1 secreted by PCa epithelial cells and/or endothelial cells can induce a Ca²⁺ entry mediated by the opening of TRPA1 in PrCSCs. We further studied whether ET-1 induces secretion by PrCSCs cells and whether TRPA1 could be involved in this process. ELISA assays were performed for HGF detection in conditioned media from PrCSCs treated with ET-1 (100 nM, 24h) or AITC (30 μ M, 24h) in the presence or absence of HC-030031 (50 μ M, 24h). As shown in Figure 2F, AITC or ET-1 induced 48% and 50% of

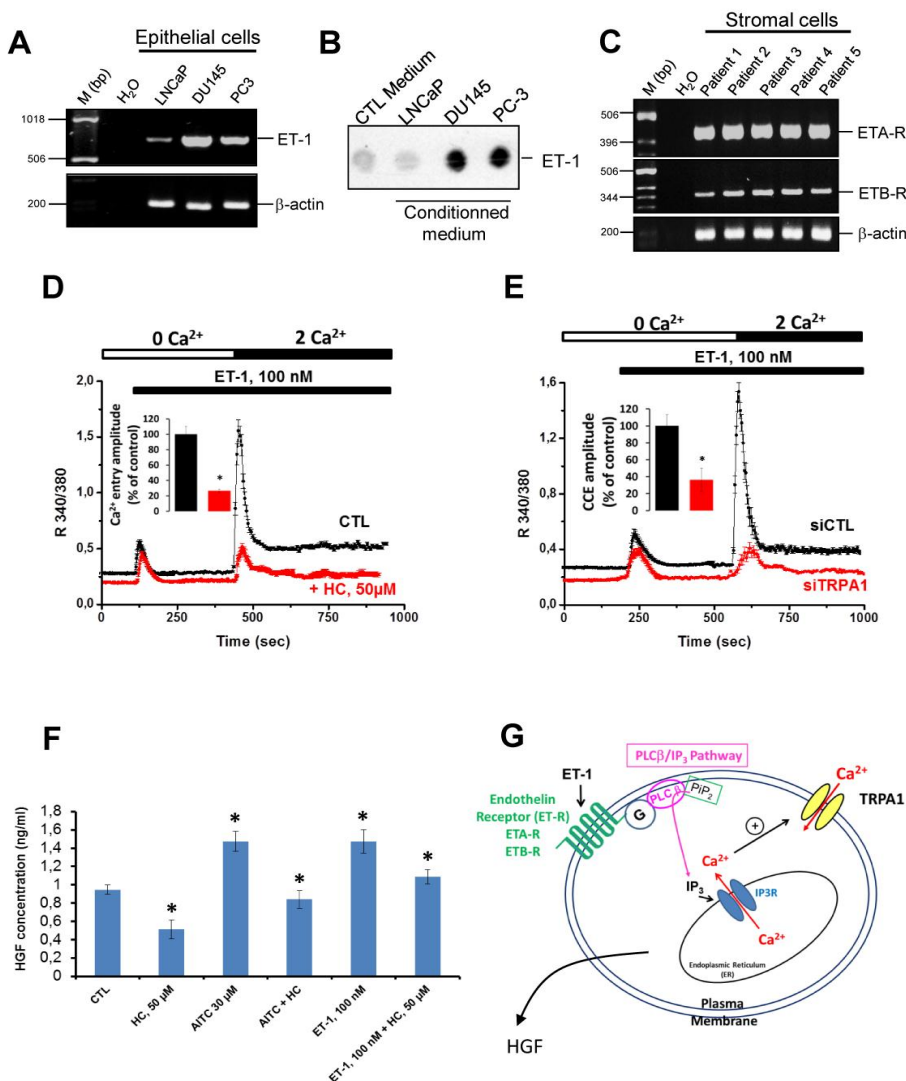


Figure 2: Involvement of TRPA1 channel in Endothelin-1 (ET-1)-induced calcium response and secretion in prostate cancer CAF cells.

(A) Semi-quantitative RT-PCR was used to study the expression of ET-1 in human epithelial prostate cancer cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3) and of the Endothelin receptors (ETA-R and ETB-R) in PrCSC (C). (B) Secretion of ET-1 by epithelial prostate cancer cell lines was studied by Dot-blot experiments realized on the conditioned media of PCa cell lines by using an antibody directed against human ET-1. (D,E) Calcium imaging experiments studying Ca²⁺ entry induced by 100 nM ET-1 in PrCSC in the presence or absence of TRPA1 inhibitor (HC-030031, 50 μ M) in non-transfected PrCSC ($n=178$) (D) and in siCTL and siTRPA1-transfected cells 48h after lipofection ($n=95$) (E). (F) ELISA sandwich assays were realized on PrCSC conditioned media in the presence or absence of AITC (30 μ M), HC-030031 (50 μ M) and ET-1 (100 nM) in order to determine the variation in the rate of HGF in the conditioned media ($n=7$). (G) Schematic representation of TRPA1 channel activation by PLC β /IP₃ pathway induced by ET-1. *, $p < 0.05$ relative to CTL conditions.

increase in HGF secretion (respectively $1.38 \text{ ng/ml} \pm 0.14$ and $1.4 \text{ ng/ml} \pm 0.22$ vs $0.93 \text{ ng/ml} \pm 0.07$ in basal conditions). Moreover, the increase in HGF secretion was inhibited completely for AITC and partially for ET-1 when the channel inhibitor HC-030031 was used ($0.81 \text{ ng/ml} \pm 0.13$ for AITC and $1.16 \text{ ng/ml} \pm 0.1$ for ET-1). Taken together, these observations suggest that, *via* its transduction pathway, the epithelial and endothelial factor ET-1 is able to activate TRPA1 channel following an intracellular Ca^{2+} increase and consequently induces HGF secretion in cancer-associated fibroblasts (CAF) cells (Figure 2G).

TRPA1 channel expression is up-regulated by epithelial factors After showing that the TRPA1 channel could be activated by the epithelial agonist ET-1, we wondered if this factor could also modulate TRPA1 expression. Indeed, when PrCSCs were treated with ET-1 (10-100 nM, 48h), we observed a dose-dependent induction of TRPA1 protein expression with a maximum 4-fold increase compared to control (Figure 3A). Similar results were obtained

with 100 nM Bradykinin (2.5-fold increase), an inflammatory mediator known to potentiate the activation of TRPA1 channel in sensory neurons. We also conducted co-incubation experiments of PrCSCs cells with epithelial-conditioned media in order to investigate further the PCa epithelial-stromal interactions (Figure 3B). After incubating PrCSCs cells with LNCaP-, DU145- and PC-3-conditioned media (CM) for 48h, RT-PCR and Western Blot studies showed that all three cell lines induced TRPA1 expression increase in PrCSCs, from a 3- to 10-fold increase compared to control (Figure 3C and 3D). We then studied the consequences of this up-regulation of TRPA1 on the amplitude of AITC-induced Ca^{2+} entry in PrCSCs. The peak amplitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by AITC (10 μM) was increased respectively by 1.83-fold ± 0.01 following treatment with LNCaP-conditioned medium and 2.04-fold ± 0.16 following treatment with DU145 and PC-3 CM compared to the control (Figure 3E). Moreover, the Ca^{2+} entry was also increased by 2-fold ± 0.13 in stromal cells treated with ET-1 (100 nM)

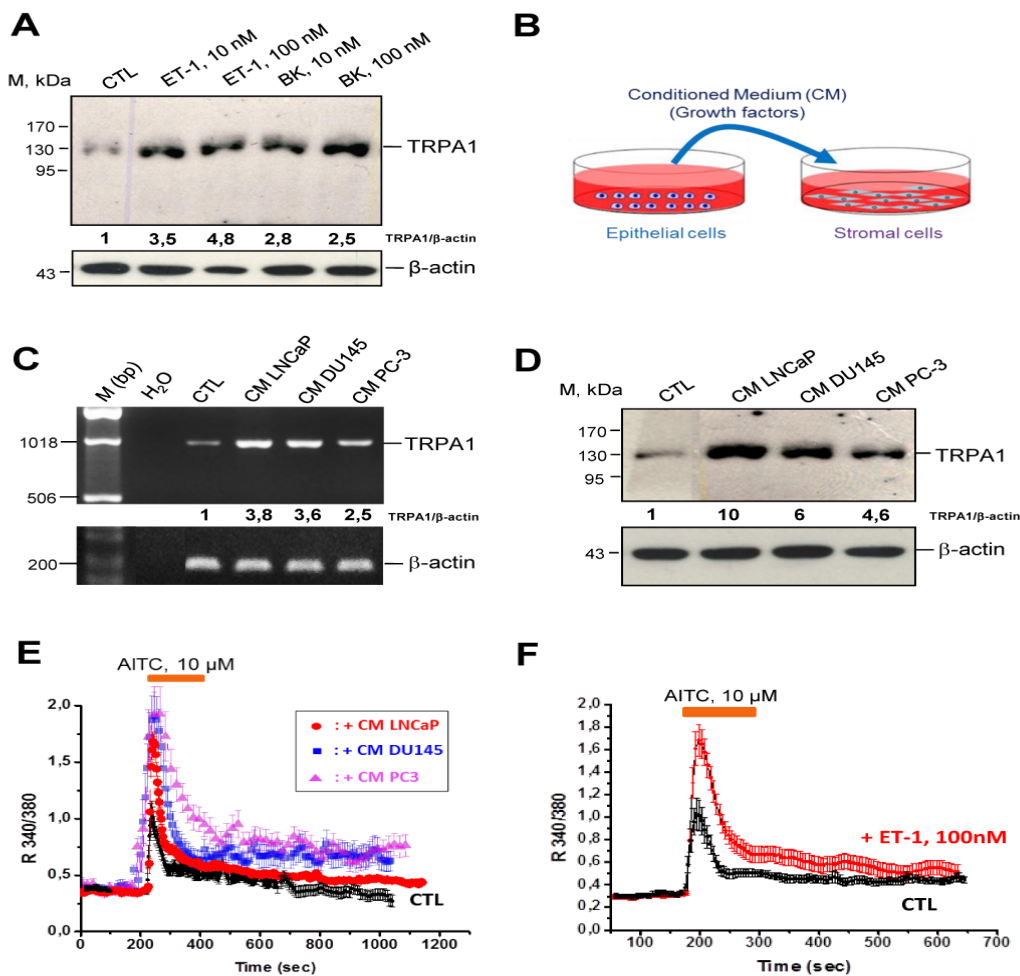


Figure 3: Factors secreted by PCa cells modulate TRPA1 expression in PrCSC.

(A) Western Blots showing TRPA1 protein expression in PrCSC treated with Bradykinin (BK) and ET-1 (10 and 100 nM) for 48h. (B) Schematic representation of the obtention and the use of conditioned media (CM) in the studies of epithelial-stromal interactions. The CM were obtained after a 48h incubation of culture media with cells. RT-PCR (C) and Western Blot (D) studies of TRPA1 expression in PrCSC treated with CM of LNCaP, DU145 and PC-3 cells for 48h. TRPA1 expression rate in each sample is normalized by densitometry studies using β -actin expression as internal standard. (E) Calcium imaging experiments studying Ca^{2+} entry induced by AITC (10 μM) in PrCSC pretreated for 48h with ET-1 (100nM) ($n = 142$) or CM of epithelial PCa epithelial cells, LNCaP ($n = 128$) DU145 ($n = 132$) and PC3 ($n = 117$) or ET-1 (100 nM) ($n = 142$).

compared to non-treated cells (Figure 3F), indicating the importance of this peptide in epithelial-stromal interactions mediated by TRPA1. As shown above, we didn't observe any ET-1 secretion by LNCaP cells. Thus, the impact of LNCaP-conditioned medium on PrCSCs cells TRPA1 expression and functionality is surely mediated by other factors than ET-1. However, these data show clearly that the PCa epithelial cells interact with stromal cells by modulating the expression and functionality of the stromal TRPA1 channel. As the channel is involved in the secretion of stromal HGF targeting the PCa epithelial cells, the TRPA1 channel could be considered as a crucial mediator of the epithelial-stromal interactions.

TRPA1 channel activation modulates HGF expression via NFAT signaling

In addition to secretion, it is established that an increase in $[Ca^{2+}]_i$ is a modulator of gene expression (for review, see Herzberg et al.[23]). We thus investigated if the TRPA1 channel activity could also be involved in the HGF gene expression. In this

context we used RT-PCR to study the expression of HGF in cells treated or not with HC-030031 (10, 50 and 100 μ M, 48h) or transfected by either siCTL or siTRPA1 (25nM, 48h). Interestingly, we observed that, in a dose-dependent manner, the treatments by HC-030031 decreased HGF expression by 85% compared to control (Figure 4A). Similarly, the down-regulation of TRPA1 decreased HGF expression by 83% compared to control (Figure 4B). Moreover, when PrCSCs were treated with ET-1 (100nM, 48h), HGF expression was increased by two-fold compared to control, and this increase was suppressed with TRPA1 inhibition (Figure 4C). So, in addition to its role in secretion, TRPA1 channel opening contributes to HGF expression following an increase in $[Ca^{2+}]_i$, which must necessarily imply translocation of transcription factors. One of the pathways involved in calcium-induced gene expression is the activation of the Calcineurin/NFAT pathway where the transcription factors NFAT undergo a nuclear translocation to activate gene transcription (for review, see Herzberg et al., 2011). Indeed, analysis of

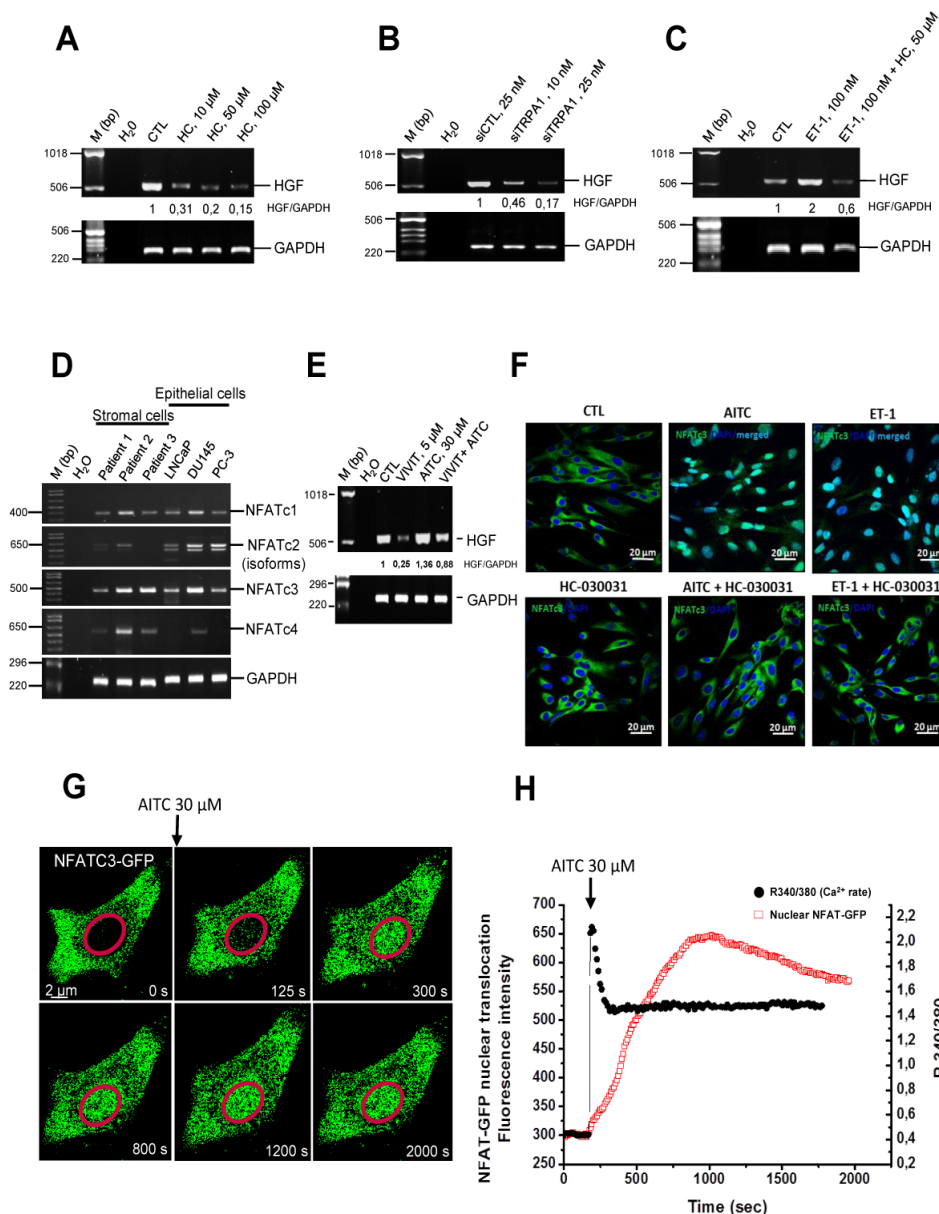


Figure 4: TRPA1 activity promotes growth factors expression through NFAT nuclear translocation.

(A, B, C) Study of HGF expression by RT-PCR experiments performed from mRNA of PrCSC treated with or without HC-030031 (50 μ M) (A) in the presence or in absence of ET-1 (100nM) (C) or in siCTL and siTRPA1-transfected cells (25nM for 48h) (B). HGF expression rates in each sample are normalized by densitometry studies using b-actin expression as internal standard. (D) RT-PCR experiments showing expression of different NFAT isoforms in PrCSC originated from 3 patients and epithelial PCa cell lines (LNCaP, DU145, PC-3). (E) Involvement of NFATc3 signaling in modulation of HGF expression measured by semi-quantitative RT-PCR experiments in the presence or absence of a NFAT peptide selective inhibitor (VIVIT, 5 μ M) and TRPA1 activator (AITC, 30 μ M) after 72h of treatment. (F) NFATc3 cellular localization was determined by immunofluorescence studies using NFATc3 antibody (green) on PrCSC treated or not with TRPA1 activator (AITC, 30 μ M), TRPA1 inhibitor (HC-030031, 50 μ M), and ET-1 (100 nM) for 30min. Nuclei are stained by DAPI (blue). (G) Time course of nuclear translocation of NFATc3 after TRPA1 activation. Confocal images of NFAT-GFP fluorescence in live PrCSC cells transiently transfected with NFATc3-GFP during AITC (30 μ M) application (t=125 sec) showing NFAT translocation to the nucleus over time. Fluorescence intensity of this translocation was measured as a function of time (H) The kinetics of the AITC-induced calcium response along with the NFATc3 translocations are shown on the same figure. All experiments are performed at least 3 times in two or three independent cell cultures and representative figures are shown.

the HGF gene promoter showed three binding sites for NFAT protein. We further studied the possible intervention of the NFAT pathway in TRPA1-induced HGF gene expression. We first studied the expression of different NFAT transcription factors mRNA in PrCSCs and different epithelial prostate cancer cell lines (Figure 4D). In these studies, the most abundant NFAT transcription factor was the NFATc3, one of the NFAT proteins that could be able to bind the promoter regions of the genes coding for HGF. Thus, by an NFATc3 immunofluorescent labeling, we observed that application of AITC (30 μ M, 30 min) or ET-1 (100 nM, 30 min) was able to induce NFATc3 translocation to the nucleus and that this translocation was prevented when the channel was inhibited by HC-030031 (50 μ M) (Figure 4E). These results were confirmed by confocal microscopy coupled with Ca²⁺ imaging realized on PrCSCs lipofected with NFATc3-

GFP, allowing us to follow NFATc3 nuclear translocation kinetics. As shown in Figure 4F, immediately after AITC application, NFATc3 nuclear translocation begins simultaneously with the increase in [Ca²⁺]_i induced by AITC, and reaches a maximum in fluorescence intensity after 800 sec, with a subsequent slow decrease. These observations suggest that the activation of the channel and the subsequent increase in intracellular calcium induces the nuclear translocation of NFATc3. Finally, when PrCSCs were treated with a specific NFAT peptide inhibitor, VIVIT (5 μ M, 48h), to prevent NFAT nuclear translocation, RT-PCR studies showed that HGF expression induced by the activation of the TRPA1 channel were inhibited, confirming the role of NFAT in growth factors expression induced by the activation of the TRPA1 channel. Our present results therefore indicate that activation of TRPA1 channel promotes the

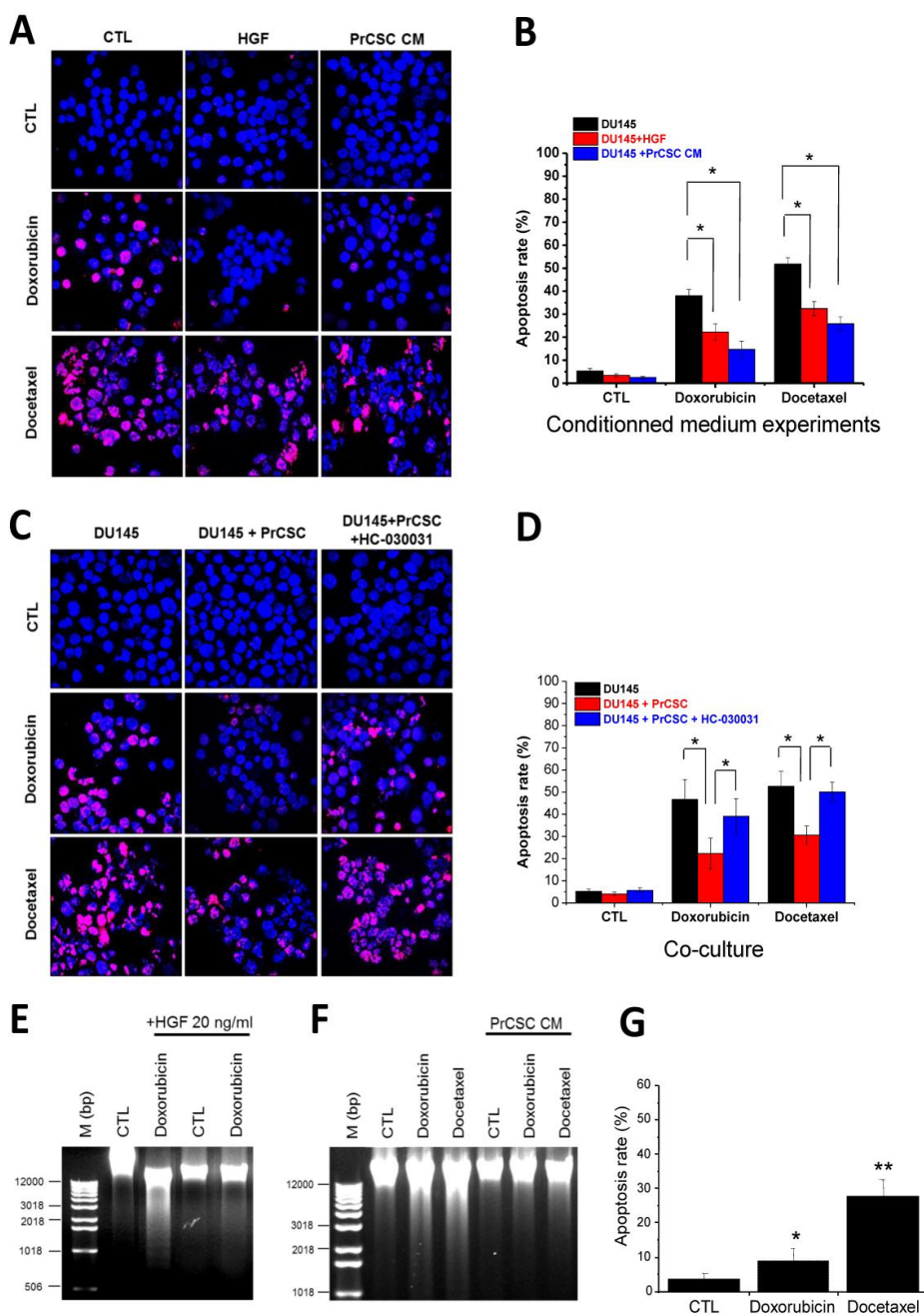


Figure 5: Involvement of TRPA1 channel in chemoresistance of DU145 cells via paracrine interactions

(A) TUNEL assay realized on DU145 cells treated with doxorubicin (100nM) or docetaxel (10 nM) for 72h. Cells were pre-treated or not with HGF (20ng/ml) or with stromal cells conditioned media 24h before treatment with chemotherapeutic agents. All nuclei are labeled in blue with DAPI and apoptotic nuclei are labeled in pink (blue + red); Apoptosis was studied qualitatively by DNA ladder assay (E) and quantified by apoptotic nuclear counting after Hoechst staining as described in material and methods (B) (n = 6). (C) TUNEL assay realized on DU145 cells treated with doxorubicin (100 nM) or docetaxel (10 nM) for 72h in co-culture with PrCSC separated by an insert with pores of 0.4 μ m diameter. Both cell types were pre-treated or not with HC-030031 (50 μ M) for 24h before treatment with chemotherapeutic agents. Apoptosis rate was determined by DNA ladder assay (F) and Hoechst apoptotic nuclear counting (D) (n=6). *, p<0.001 relative to doxorubicin- or docetaxel-treated DU145 conditions.

expression of growth factors (HGF) through the calcineurine/NFAT pathway following a Ca^{2+} entry in PrCSCs.

TRPA1 channel is involved in the chemoresistance in tumor microenvironment

Recent data suggest that tumor microenvironment communications *via* secreted factors are involved in chemotherapy resistance and sensitivity of cancer cells [24],[25]. We therefore wondered whether TRPA1 could participate to the resistance of prostate cancer cells to the chemotherapeutic agents-induced apoptosis. We first investigated the apoptosis of tumor cells induced by chemotherapeutic agents commonly used in the treatment of prostate cancer in the presence or absence of HGF (20 ng/ml) or in the presence of PrCSCs CM. As HGF receptor cMET is expressed at high levels in androgen-independent PCa cells (reference ?), we studied mainly DU145 cells and certain experiments were confirmed in PC-3 cells. By the techniques of Hoechst staining and TUNEL assays, we observed that doxorubicin and docetaxel induced respectively about $46 \pm 3.2\%$ and $52.5 \pm 2.9\%$ increase in apoptosis of DU145 control cells (Figure 5A and 5B) whereas for PrCSCs, these rates were about $5 \pm 2.5\%$ and $27.5 \pm 4.2\%$ over the control under doxorubicin and docetaxel respectively (Figure 5G). When the DU145 cells were pre-treated with HGF (20 ng/ml, 24h), the doxorubicin- and docetaxel-induced apoptosis was decreased to $19 \pm 2.9\%$ and $31 \pm 2.25\%$ respectively. In the same manner, when the DU145 cells were incubated with PrCSCs CM, the doxorubicin- and docetaxel-induced apoptosis was decreased to $12 \pm 3.2\%$ and $25 \pm 2.2\%$ compared to the control (Figure 5A and 5B). The DNA laddering experiments qualitatively confirmed the resistance to apoptosis of prostate cancer cells DU145 induced by either HGF or PrCSCs CM (Figure 5E and 5F). To better depict the role of TRPA1 in resistance to apoptosis, we used co-culture systems of PrCSCs and DU145 cells separated from each other by an insert with $0.4 \mu\text{m}$ diameter pores where only secreted factors and exosomes can pass from one cell compartment to another (Figure 5C, 5D and 5F). In these experiments, epithelial-stromal cells were first pretreated or not with HC-030031 ($50 \mu\text{M}$, 24h) and then they were challenged or not by chemotherapeutic agents. We observed that the presence of stromal cells decreased the DU145 cells apoptosis induced by doxorubicin (100 nM , 72h) by more than $46 \pm 3.4\%$ and the apoptosis induced by docetaxel (100 nM , 72h) by more than $45 \pm 4.3\%$, compared to DU145 cells cultured alone (Figures 5D and F). Moreover, in an interesting way, blocking paracrine interactions by TRPA1 inhibition (HC-030031, $50 \mu\text{M}$) restored completely apoptosis induced by both therapeutics agents highlighting the importance of TRPA1 in tumor cells resistance against chemotherapy. Finally, we also investigated the resistance to apoptosis with the use of spheroids model formed by

the co-culture of PrCSC and DU145 cells or DU145 cells alone and PrCSC alone (Figure 6A). Spheroids pre-treated or not with HC-030031 ($50 \mu\text{M}$, 24h) were treated with doxorubicin (100 nM) for 5 days and then analyzed by TUNEL assays (Figures 6B and C). We observed that compared to adherent cells on Petri dishes, the rate of doxorubicin-induced apoptosis was reduced in DU145 cells forming spheroids (32% *vs* 46%). This apoptosis resistance was enhanced when the spheroids were composed of epithelial cells (DU145) and stromal cells (PrCSC) ($13 \pm 2.5\%$). When the DU145/PrCSC spheroids were treated by doxorubicin, the apoptosis rate reached $24 \pm 4\%$ corresponding to an increase of 95% compared to the same spheroids in the absence of the channel inhibitor (Figure 6D). In the same conditions, the channel inhibitor HC-030031 ($50 \mu\text{M}$) did not modify the doxorubicin-induced apoptosis of DU145 spheroids. These data suggest that the TRPA1 ion channel, by modulating secretion of growth factors such as HGF, promotes resistance to apoptosis induced by chemotherapeutic agents in tumor cells. And by blocking the channel with HC-030031 it is possible to re-sensitize tumor cells to the apoptotic effects induced by chemotherapeutic agents (Figure 7).

DISCUSSION

In the present study, we show for the first time the importance of TRPA1 ion channel in epithelial-stromal interactions in the context of prostate cancer tumor microenvironment. The data presented suggest the potential clinical use of the TRPA1 channel as a target to overcome the resistance to apoptosis of tumor cells under chemotherapeutics agents. Indeed, we have shown that TRPA1 channel is specifically expressed in the human prostate CAF of the reactive stroma and its activation induces the secretion of HGF, a factor known to promote carcinogenesis by modulating prostate cancer cell proliferation, cell migration/invasion, apoptosis resistance and tumor angiogenesis. The expression of the TRPA1 channel in PCa CAFs is of importance because of its role in secretion and of its polymodal activation by the endogenous and exogenous substances. Indeed, according to the published data, the TRPA1 channel can constitute a thermal and chemical sensor activated by pungent irritants as well as volatile environmental toxins and endogenously produced substances such as hydrogen peroxide and cannabinoids [26-33], 4-Hydroxynonenal (4-HNE), cyclopentenone prostaglandins (PGJ2) [31], Methylglyoxal, formed from triose phosphates during secondary glucose metabolism in hyperglycemic condition [34]. Interestingly, recently, TRPA1 was also recently shown to be activated by formaldehyde [35], a molecule generated by cancer cells and which could constitute another paracrine factor promoting epithelial-stromal interactions *via* the activation of TRPA1 channel.

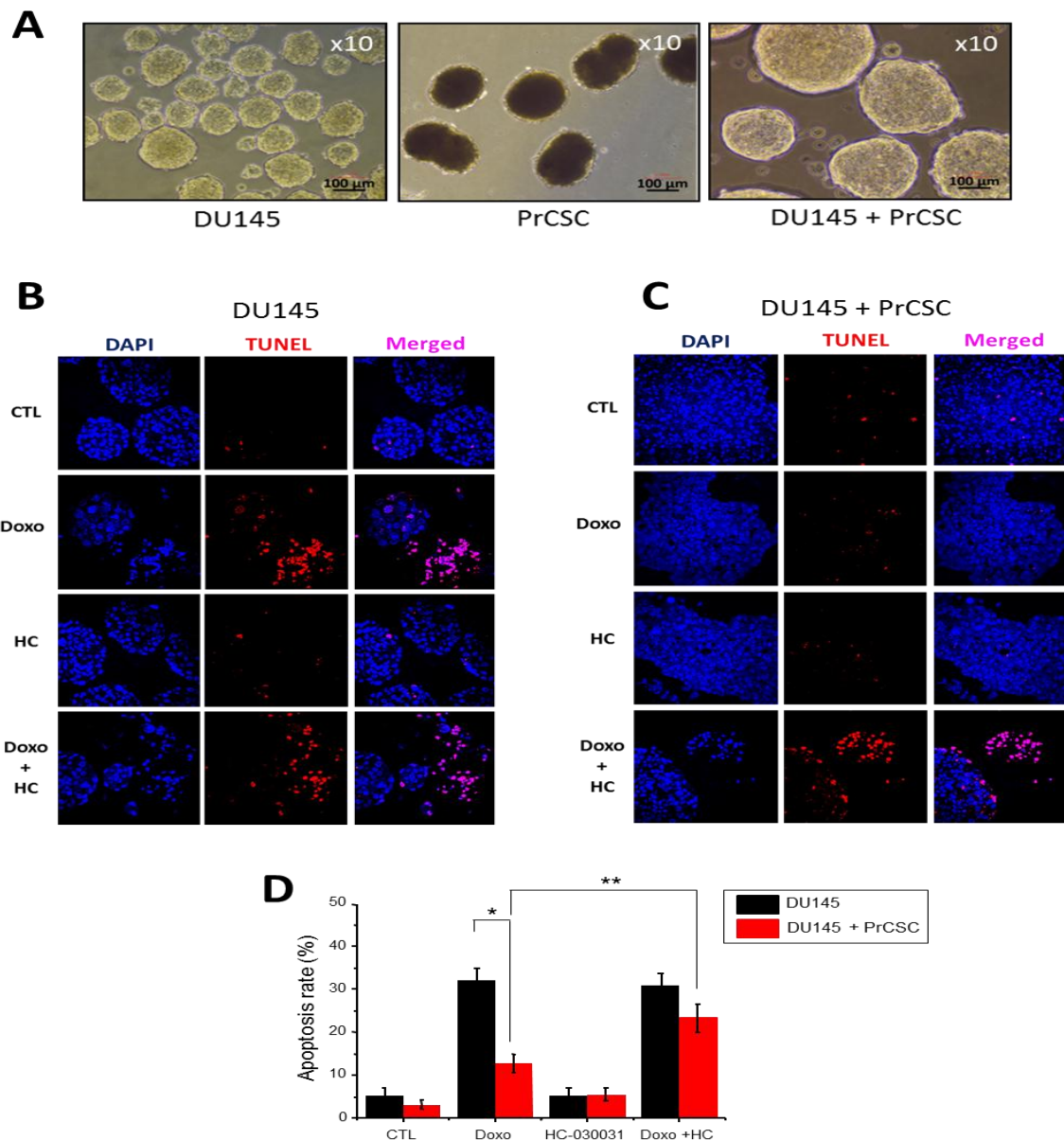


Figure 6: Involvement of TRPA1 channel in chemoresistance of DU145 cells in a spheroid model

In order to determine impact of direct interactions between cancer epithelial cells (DU145) and PrCSC, spheroids were generated from DU145 alone (3×10^6 cells/sample), PrCSC alone (3×10^6 cells/sample) and DU145 with PrCSC (2×10^6 DU145 cells/ 1×10^6 PrCSC). (A) Spheroids pictures were taken from light microscopy 3 days after their formation. These spheroids were treated in the absence or presence of doxorubicin (100 nM) with or without TRPA1 inhibitor (HC-030031, 50 μ M) for 5 days. Spheroid apoptosis was assessed with TUNEL assay from spheroid sections in confocal microscopy for DU145 cells alone (B) and DU145 with PrCSC (C). All nuclei are labeled in blue with DAPI and apoptotic nuclei are labeled in red. (D) Apoptosis rate of cells in spheroids was quantified by counting apoptotic nuclei. *, $p < 0.001$ and *, $p < 0.05$ vs relative CTL as shown on the figure.

TRPA1 was also recently shown to be regulated by the activation of phospholipase C-coupled receptors by agonists including bradykinin, an important inflammatory mediator [36-38]. ET-1, known to be produced by PCa cells, is involved in several aspects of prostate cancer progression, including proliferation, escape from apoptosis, invasion, and bone metastasis formation, processes that are common to many malignancies. Moreover, patients with metastatic prostate cancer have elevated levels of plasma ET-1 compared with patients with organ-confined cancer as well as healthy individuals [39]. The present data demonstrate that the TRPA1 channel mediates the effects of ET-1 on PCa CAF by generating a calcium influx leading to growth factors secretion. In this

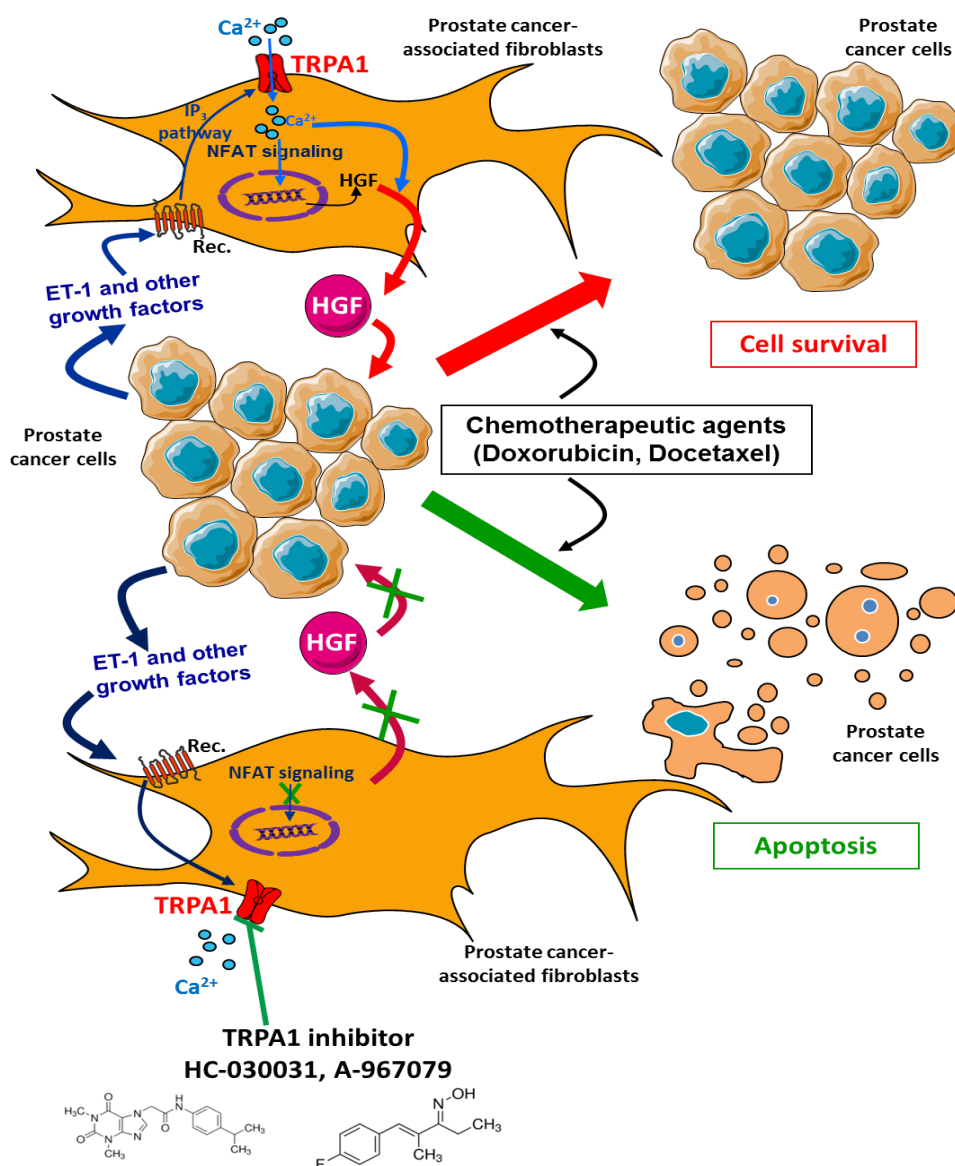
context, recent data showed that TRPA1 is involved in ET-1-induced spontaneous pain-like behavior in mice and that, low doses of ET-1 potentiates nociception induced by cinnamaldehyde, a TRPA1 agonist [40]. The involvement of TRPA1 channel in ET-1 transduction pathway could be explained by the activation of the channel by an increase in intracellular Ca^{2+} originating from the depletion of the internal stores. Indeed, TRPA1 contains an intracellular EF-hand motif known to bind Ca^{2+} and to induce the channel activity [41]. It is thus possible that the Ca^{2+} released from reticular stores induces directly the activation of the channel by binding to the calcium bowl located in the c-terminal domain of the TRPA1 channel [42]. Taken together, these data suggest that

the antagonists of the ET-1 receptors and of the TRPA1 channel could constitute valuable tool to disrupt the epithelial stromal interactions in tumor microenvironment.

Cancer-associated fibroblasts (CAF) are important components of the tumor stroma. The crosstalk between cancer cells and CAF is dependent on multiple invasive and growth-promoting paracrine factors. In this context, we have shown that TRPA1 participates actively to this crosstalk and that its activation was mediated by PCa and endothelial cells-derived agonists such as ET-1 enabling the stromal cells for both expression and secretion of growth factors. This cross-talk by secretion has already been described in other diseases model like the human nasal airway [43] or the intestinal secretin tumor cell line, STC-1 [44] where activation of TRPA1 channel induced respectively the secretion of MUC5B or the release of cholecystokinin (CCK). Among the factors secreted by PrCSC, our study also highlighted the importance of HGF in TRPA1-mediated effects. HGF is a key factor in PCa that acts through the c-Met receptor as a multifunctional cytokine able to stimulate proliferation, cell motility, morphogenesis of epithelial cells [45] and tumor angiogenesis [46, 47] through c-Met receptor. In the late stage of PCa, c-Met is overexpressed [48] and associated to an

important secretion of HGF by the reactive stroma. It has been shown that the c-Met receptor activation promotes tumor progression and metastasis. Indeed, serum levels of HGF [49, 50] appeared very elevated in patients with metastatic disease compared with patients with localized disease. In the same way, *via* the tumor microenvironment, HGF/c-Met signaling axis also appears to be one of the common mechanisms for resistance to the targeted therapies. Preclinical studies report abnormal c-Met signaling in many cancers, with data supporting the idea of targeting this pathway for cancer treatment. Thus, several inhibitors and strategies that target the c-Met pathway are now under clinical trials with encouraging results [51, 52]. However, the downside of this strategy is that the c-Met pathway is used by both cancer and normal cells. Indeed, the HGF/c-Met axis is essential in different organs including bones where osteoblast activity can be affected and lead to dramatic side effects for the patients in response to the treatments using c-Met and other tyrosine kinase inhibitors [53]. This suggests that other pathways indirectly affecting the HGF/c-Met axis could therefore provide more suitable targets in the cancer treatments. As TRPA1 calcium channel is involved in

Figure 7: Schematic view of the TRPA1 ion channel involvement in epithelial-stromal interactions and in the resistance of the PCa cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Via* the stimulation of growth factors secretion (HGF), TRPA1 ion channel participates to resistance to apoptosis induced by doxorubicin and docetaxel in epithelial DU145 PCa cells. The inhibition of the channel in tumor microenvironment promotes PCa cell death induced by chemotherapeutic agents.



the secretion of the HGF by Prostate cancer CAF, it could constitute an alternative at least in prostate cancer treatments.

In the co-cultures studies described in the present work, the effects of HGF and CAF CM on the apoptosis resistance of prostate cancer cells depended strongly on the type of chemotherapeutics agents used (data not shown). In these studies, resistance to apoptosis was more pronounced when using the CM from CAF. These results can be explained by the fact that other growth factors like VEGF present in the CM can be secreted directly under the dependence of TRPA1 channel activity. Our *in vitro* studies presented here show that resistance to therapy conferred by the tumor microenvironment decreased strongly when the stromal TRPA1 ion channel was inhibited by HC-030031. Indeed, the inhibition of the channel could interfere in the epithelial-stromal dialog and thus resensitize tumor cells to the apoptosis induced by chemotherapeutics agents. Therefore, on one hand, targeting the TRPA1 channel expressed in prostate cancer-derived stromal cells to disrupt epithelial-stromal interactions could be used in combined therapies to increase the efficiency of actual chemotherapeutic agents (e.g. docetaxel and doxorubicin). In the other hand, in combined therapies involving the TRPA1 channel inhibitor, it would be possible to use very low non-toxic concentrations of chemotherapeutic agents but with an increased efficiency and an improved patients' quality of life. Indeed, chemotherapy-induced peripheral neuropathies (CIPN) are a dose-limiting adverse effects of neurotoxic anticancer drugs like taxanes (paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel) with symptoms including pain, numbness, deregulation of thermal and mechanical sensitivity, paresthesia and dysesthesia which in turn can induce depression and anxiety in patients. These symptoms can last for several years after the end of chemotherapy cycles and current therapeutic strategies (opioids such as morphine and methadone) to decrease CIPN are still insufficient. Interestingly, recent studies in mice have shown that TRPA1 blockade with HC-030031 or α -lipoic acid could prevent the chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy [54, 55]. In this context, two pharmacological TRPA1 antagonists, GRC 17536 (Glenmark) and HX100 (Hydra Biosciences) have been developed for diabetic neuropathic pain treatments. These TRPA1 inhibitors have shown great efficacy in animal models of neuropathic and inflammatory pain which supports the potential use of TRPA1 blockade in therapeutic pain management. Currently, these antagonists are respectively in phase 2a and phase 1 of clinical trials. These agents could be used in the future for combined therapies in the treatments of prostate cancer. In conclusion, TRPA1 ion channel expressed in the PCa reactive stroma is an attractive candidate for drug development in cancer therapies. The channel could constitute a new therapeutic target for human PCa and metastasis allowing at the same time to potentiate the effects of

the chemotherapeutics agents by interfering in the epithelial-stromal interactions. The channel's inhibitors could be used in combined therapies in the treatments of prostate cancers in order to decrease the side effects often induced by these agents used at high concentrations.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and antibodies

All chemicals, agonists and growth factors were from Sigma-Aldrich. Allylisothiocyanate (AITC), HC-030031, doxorubicin and docetaxel were dissolved in DMSO whereas ET-1 and Bradykinin were dissolved in 1% acid acetic and Hepatocyte Growth Factor (HGF) was dissolved in PBS with 0.1% BSA and conserved at -20°C and then diluted to the desired concentration on the day of the experiments. Antibodies were from commercial sources as follows: Rabbit anti-hTRPA1 (Alomone Labs), mouse anti- α -actin and mouse anti-Vimentin (Dako, France), Rabbit anti-NFATc3 (Abcam), Rabbit anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Cell lines

LNCaP, PC-3 and DU145 prostate cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured as previously described [56].

Tissue specimens and primary cell cultures

Human PCa biopsies were obtained from consenting patients following local ethical considerations. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number 'CP 01/33', issued by the 'Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille'. A portion of prostate tissue suspected of carcinoma was incised, and one half of the sliced tissue was submitted for immediate microscopic examination on cryostat sections. After establishment of the diagnosis of adenocarcinoma, the remaining half of the tissue was used for primary culture. The tissue was cut into multiple minute cubes, placed on a plastic surface, and grown in Phenol-red-free RPMI 1640 containing charcoal-stripped Fetal Calf Serum (FCS) (CS-RPMI) (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). As soon as outgrowths formed around the tissue fragments, cells were trypsinized and cultured for calcium imaging, immunofluorescence, RT-PCR and western blot and calcium imaging experiments.

Co-cultures

PrCSC and DU145 cells were seeded in 24-well plates at 70% of confluence separated by an insert with pores of 0.4 μ m diameter in order to study paracrine crosstalk. Cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, pretreated or not with

Gene	Primers 5'-forward-3'	Primers 5'-reverse-3'	RT-PCR product size (bp)	Accession number
TRPA1	AGTGCCAATGTGGAGCAA	AGGAACCATGATTTACACG	994	NM_007332
ET-1	GGTTCAGTTTGAACGGGAGGTT	GAAGGTCTGTCACCAATGTGCT	670	NM_001955
ET _A R	GATCACAATGACTTTGGCGTA	CTCAAGCTGCCATTCTCTCT	328	NM_001957
ET _B R	TTGGTGGCTGTTTCAGTTTCT	TGCTCACCAATACAGAGCA	351	NM_000115
HGF	TACTGCAGACCAATGTGCTA	GAATTTGTGCCGGTGTGGTG	541	NM_000601
c-MET	GGAGCCAAAGTCCTTTCATC	CTTGCTGACATACGCAGCCT	433	NM_001127500
NFATc1	TCTCCCAAGACCATACTACA	TGCTGAAGTCTGAGTCTCCAAT	689	NM_172390
NFATc2	AGCACATCATGTACTGCGAGA	AAGTGAGAGTCCGCTTAGTG	530	NM_012340
NFATc3	AAAGTTTGCCGTGGAGTCGC	TTGGGACCACCTAATGGGCT	420	NM_173165
NFATc4	TTCTCAGAGAAAGGGAGGGA	CTTCTGGTGGGGGTAATCT	555	NM_001136022
β-actin	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	212	NM_001101
GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA	237	NM_002046.5
siRNA	Target sequence			
TRPA1-1	GGUGGGAUGUUAUCCAUA			
TRPA1-2	GAAGGACGCUCUCCACUUA			
TRPA1-3	GGCAUCAUCAUGAAACUA			

Table 1. RT-PCR Oligonucleotides and siRNA target sequences

TRPA1 inhibitor for 24h, then treated with or without doxorubicin (100 nM, 48h) or docetaxel (10 nM, 48h). The cells were then harvested by trypsinization and used for TUNEL assays as described below. paraffin-embedded spheroids were used for TUNEL assays.

Spheroid formation

After trypsinization, DU145 (2x10⁶ cells/dish) and PrCSC (10⁶ cells/dish) were either cultured alone or co-cultured into low-adhesion surface 60 mm Petri dishes (Nunclon Sphera, Thermo Scientific, France) in order to promote cell aggregation and spheroid formation. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS at 37°C and 5% CO₂ where cell aggregation was promoted by a gentle rotary shaking at 60 rpm on Orbi-Shaker™ CO2 (Benchmark Scientific, Thermo Scientific, France) during the whole experiments. Spheroids were formed after an overnight incubation. Forty-eight hours after spheroids formation, cells were treated where necessary with doxorubicin (100 nM, 72h) or HC-030031 (50μM) alone or co-treated with HC-030031 (50μM) and doxorubicin (100 nM) for 72h. In co-incubation experiments, cells were pretreated HC-030031 (50μM) for 24h before being challenged with doxorubicin. Spheroids were then harvested by centrifugation at 300 rpm for 5 min and transferred in 1.5 ml tube coated with PBS-gelatin. Then, spheroids were fixed with 4% paraformaldehyde (PAF) for 24h. After 3 washes with PBS, pellets were embedded in 2% low melting point agarose gel at 37°C then, embedded in paraffin. Thin sections (6μm thick) of

RT-PCR analysis of mRNA expression

Total RNA isolation and RT-PCR experiments were performed as described earlier[57]. The PCR primers and the target sequences for siRNA in this study were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Eurogentec (Angers, France) and are detailed in Table 1. For semiquantitative PCR, the cDNA of different markers was amplified along with either β-actin or GAPDH cDNA as internal control.). The image density of the PCR products was compared with the density of β-actin in order to determine the mRNA expression ratio of the markers in each sample studied. Then, the ratios were compared to control sample by setting the ratio value for control cells to 1.

Cell transfections

For siRNA experiments, equal numbers of cells from the same culture were seeded, transfected overnight either with 25 nM of control siRNA (targeting Luciferase mRNA) (Eurogentec, Angers, France), or with 2 different siRNA raised against TRPA1 mRNA (siTRPA1-1, siTRPA1-2) The Hiperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) was used to transfect the cells according to the manufacturer's instructions. The medium was changed 24 h after transfections and cells were incubated for a further 24h before performing experiments. The target sequences for TRPA1 siRNA are given in Table 1. The efficiency of the siRNA was validated by RT-PCR and by Western Blot studies conducted on stromal cells (Figure 1C and 1D).

Prostate tissue and cells staining studies

The protein expression studies of the ion channels in PCa cells and tissues was determined either by immunofluorescence or by immunohistochemistry staining performed on 2% paraformaldehyde (PFA)-fixed cells and 3,7% formalin-fixed paraffin embedded tissues (FFPE) as previously described [58]. In immunohistochemistry stainings, the tissues slides were counterstained with hematoxylin to visualize the nuclei and mounted. In immunofluorescence studies, the nuclei were stained in blue by DAPI. The stained tissues and cells were then analysed either by confocal microscopy (Zeiss LSM 700; acquisition parameters: objective 40x/1.3 thickness of confocal slide, 1 μ m) or under phase contrast microscopy.

Western Blot Assay

Primary cultured stromal cells and PCa epithelial cells (LNCaP, DU145 and PC-3) cells were cultured at 80% confluence and total proteins were extracted. 10 to 40 μ g of each sample were analysed by SDS-PAGE on either 6% or 10% acrylamide gel and processed for western-blotting using TRPA1 (1:500e) and β -actin (1/1000e) antibodies as described previously [58] and revealed by the ECL chemiluminescence kit (Millipore, France). For the comparison of the protein expression levels in different samples, a normalization were performed by using the image density analysis of the protein bands the β -actin protein expression as an internal standard. Then, the ratios were compared to control sample by setting the ratio value for control cells to 1.

Fluorescence Imaging

Calcium imaging experiments were performed as previously described [58] using Fura-2/AM as a calcium dye. To represent the variation in $[Ca^{2+}]_i$, the fluorescence intensity ratio represented by F340/F380 was used as an indicator of changes in cytosolic Ca^{2+} concentration. Each experiment was performed on 35–45 cells in duplicate and repeated at least four times on different cell cultures and a representative figure is presented. For the quantifications of the amplitude of the calcium entries, the measures are done at the pic levels in different experimental conditions and compared between them.

FM1-43 fluorescence was used as an indicator of membrane traffic [59][60]. Experiences were performed as previously described [22]. Briefly, experiences are performed with the cells bathed continuously in FM1-43 solution (5 μ M). In this way, the dye (non-fluorescent in aqueous solution) is incorporated into the plasma membrane until equilibrium has been reached. The dye then becomes fluorescent in the lipid membrane environment. Fluorescence was excited at 480 nm and measured at 510 nm.

NFATC3 translocation studies

The translocation of the endogenous NFATC3 was studied by immunofluorescence as described. Cells were trypsinized and cultured on glass coverslips for 48h. The cells were then challenged by different agents for 1h and then fixed on ice in 2% PFA. The localization of NFATC3 was then studied using a NFATC3-specific antibody by immunofluorescence by examinations under confocal microscopy as previously described.

The translocation of NFATC3 was also examined by GFP imaging. Stromal cells were transfected by 2 μ g NFATC3-GFP expression vector for 24h. Transfection medium was then replaced by fresh medium and cells were further incubated for 24h. Approximately 48 h after infection, culture medium was changed to Ringer's solution, consisting of (in mM) 135 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, and 1.8 CaCl₂, pH 7.4). The culture chamber was mounted on an inverted microscope (IX70; Olympus) equipped with a confocal laser scanning imaging system (MRC-600; Bio-Rad Laboratories). This system utilizes an argon ion laser which supplies excitation wavelength of 488 nm with a fluorescence emission at 512 nm corresponding to the excitation/emission characteristics of the GFP protein. Cells were viewed with an Olympus 60x/1.4 NA water immersion objective and studied at room temperature. Cells were scanned at 1.6x zoom using constant laser power and gain. Each confocal fluorescence image represents an individual optical section. Axial (z) resolution for the confocal pinhole setting used in this experiment was calibrated previously as 1.0 μ m [61]. The GFP fluorescence was continuously monitored and the nuclear localization changes were studied after the application of the TRPA1 activator in the presence or absence of the inhibitor of the channel, HC-030031.

Preparation of PrSC conditioned medium

Stromal cells (5x10⁵ cells per condition) were cultured in CS-RPMI supplemented with either 0,5 or 10% FCS, for 24-72h according to experiments. Culture media were collected, centrifuged and then used for ELISA assays or incubated with DU145 to study the impact of stromal cells secreted factors on DU145 cells.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for HGF

PrCSC (5x10⁴ cells) were incubated in CS-RPMI supplemented with 0.5 or 10%FCS, with or without TRPA1 inhibitor or activator for 24 and 48h, in 12-well plates at 80% of confluence. The supernatants of the cell cultures were then withdrawn, centrifuged and a HGF immunoassay kit (Abcam, Paris, France) was used for HGF detection according to the manufacturer's instructions.

Apoptosis Assays

Three techniques were used to study the apoptosis in epithelial cells: TUNEL staining, DNA laddering, Hoechst 33342 dye staining. TUNEL staining was conducted using the *In situ* Cell Death Detection kit, TMR red, following manufacturer's recommendations [45] on spheroids sections or on DU145 cells trypsinized and attached to glass slides by Cytospin and fixed in 70 % methanol at -20°C for 20 min. All the nuclei were counter-stained with DAPI dye (50µg/ml) for 10 min at room temperature in the dark in order to establish an apoptotic cell nuclei counting (red) on the total population (blue). Then, coverslips were mounted with mowiol and examined by fluorescence microscopy by counting the apoptotic and non-apoptotic cell nuclei in 10 randomly chosen fields.

For DNA fragmentation analysis, treated and control DU145 cells grown in 60 mm diameter tissue culture dishes were harvested in cold PBS, by gently scraping the cells off the plate, followed by brief centrifugation. The cell pellet was re-suspended in 500 µl lysis buffer (0.5% Triton X-100, 5 mM Tris, pH 8.0, 20 mM EDTA, 20mM EGTA), and the lysate was treated with 400 µg/ml proteinase overnight at 37°C and then with DNase-free RNase at 37°C for 1h. A phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) extraction was then performed. Approximately 10 µg DNA of samples were analyzed on 1% agarose gel containing Ethidium bromide (0,5µg/ml). The fragmented DNA was then visualized under UV transillumination.

For Hoechst staining of cell nuclei, treated and untreated cells were harvested by trypsinization for 2 min, combined with the floating cell population, pelleted by centrifugation at 1000 rpm for 5 min, washed with 1 ml PBS, and attached to glass slides by Cytospin then fixed in 70% methanol at -20°C for 15 min. The cells were then stained for nuclei with Hoechst 33342 dye (4 µg/mL) (blue fluorescent) for 15 min at room temperature in the dark, mounted then with mowiol and examined by fluorescence microscopy and the apoptotic and non-apoptotic cell nuclei were counted in 10 randomly chosen fields.

Statistical analysis

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

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr LR Sadofsky (Cardiovascular and Respiratory Studies, The University of Hull, Castle Hill Hospital, Cottingham, Hull HU16 5JQ, UK) for the hTRPA1-pCDNA3 expression vector construction, E Richard for the technical assistance in images analysis by confocal microscopy and A Desmons (INSERM U1192, Université de Lille) for the technical assistance in immunohistochemistry studies. This work was supported by grants from Région Nord Pas-de-Calais, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. S. Derouiche was supported by the Région Nord Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work.

REFERENCES

1. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA and Eisenberger MA. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351(15):1502-1512.
2. Eisenberger MA, Blumenstein BA, Crawford ED, Miller G, McLeod DG, Loehrer PJ, Wilding G, Sears K, Culkin DJ, Thompson IM, Jr., Bueschen AJ and Lowe BA. Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 1998; 339(15):1036-1042.
3. Petrylak DP. Chemotherapy for androgen-independent prostate cancer. *Semin Urol Oncol.* 2002; 20(3 Suppl 1):31-35.
4. Yagoda A and Petrylak D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer.* 1993; 71(3 Suppl):1098-1109.
5. Liotta LA and Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001; 411(6835):375-379.
6. Wernert N. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch.* 1997; 430(6):433-443.
7. Wernert N, Locherbach C, Wellmann A, Behrens P and Hugel A. Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. *Anticancer Res.* 2001; 21(4A):2259-2264.
8. Bhowmick NA, Neilson EG and Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004; 432(7015):332-337.
9. Bhowmick NA and Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15(1):97-101.
10. Hu M and Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18(1):27-34.
11. West RB and van de Rijn M. Experimental approaches to the study of cancer-stroma interactions: recent

- findings suggest a pivotal role for stroma in carcinogenesis. *Lab Invest.* 2007; 87(10):967-970.
12. Grossfeld GD, Hayward SW, Tlsty TD and Cunha GR. The role of stroma in prostatic carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer.* 1998; 5:253-270.
 13. Tuxhorn JA, Ayala GE and Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 2001; 166(6):2472-2483.
 14. Wiseman BS and Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science.* 2002; 296(5570):1046-1049.
 15. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA and Simons JW. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med.* 1995; 1(9):944-949.
 16. Varkaris A, Corn PG, Gaur S, Dayyani F, Logothetis CJ and Gallick GE. The role of HGF/c-Met signaling in prostate cancer progression and c-Met inhibitors in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011; 20(12):1677-1684.
 17. Yu G, Jing Y, Kou X, Ye F, Gao L, Fan Q, Yang Y, Zhao Q, Li R, Wu M and Wei L. Hepatic stellate cells secreted hepatocyte growth factor contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2013; 8(9):e73312.
 18. Woo JK, Kang JH, Kim B, Park BH, Shin KJ, Song SW, Kim JJ, Kim HM, Lee SJ and Oh SH. Humanized anti-hepatocyte growth factor (HGF) antibody suppresses innate irinotecan (CPT-11) resistance induced by fibroblast-derived HGF. *Oncotarget.* 2015; 6(27):24047-24060.
 19. Katz D. *The Release of Neural Transmitter Substances.* Liverpool University Press. 1969.
 20. Burgoyne RD. Mechanisms of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells. *J Physiol Pharmacol.* 1995; 46(3):273-283.
 21. Neher E and Zucker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron.* 1993; 10(1):21-30.
 22. Gackiere F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoi-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N and Mariot P. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(15):10162-10173.
 23. Zarain-Herzberg A, Fragoso-Medina J and Estrada-Aviles R. Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life.* 2011; 63(10):847-855.
 24. Tredan O, Galmarini CM, Patel K and Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(19):1441-1454.
 25. Castells M, Thibault B, Delord JP and Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(8):9545-9571.
 26. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID and Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.* 2004; 427(6971):260-265.
 27. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE and Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(34):12248-12252.
 28. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI and Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell.* 2006; 124(6):1269-1282.
 29. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM and Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(33):13525-13530.
 30. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D and Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(33):13519-13524.
 31. Andersson DA, Gentry C, Moss S and Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 2008; 28(10):2485-2494.
 32. Akopian AN, Ruparel NB, Patwardhan A and Hargreaves KM. Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J Neurosci.* 2008; 28(5):1064-1075.
 33. Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglashan DW, Jr., Ghatta S, Carr MJ and McAlexander MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol.* 2008; 73(2):274-281.
 34. Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L and Premkumar LS. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One.* 2012; 7(5):e38005.
 35. Tong Z, Luo W, Wang Y, Yang F, Han Y, Li H, Luo H, Duan B, Xu T, Maoying Q, Tan H, Wang J, Zhao H, Liu F and Wan Y. Tumor tissue-derived formaldehyde and acidic microenvironment synergistically induce bone cancer pain. *PLoS One.* 2010; 5(4):e10234.
 36. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ and Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 2004; 41(6):849-857.
 37. Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M and Noguchi K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain.* 2008; 131(Pt 5):1241-1251.
 38. Yu S and Ouyang A. TRPA1 in bradykinin-induced mechanical hypersensitivity of vagal C fibers in guinea pig esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296(2):G255-265.
 39. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T and Marumo F. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest.* 1991; 87(5):1867-1871.
 40. Liang J, Bi H and Ji W. Involvement of TRPA1 in ET-1-induced pain-like behavior in mice. *Neuroreport.* 2010; 21(3):201-205.

41. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O and Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci.* 2007; 10(3):277-279.
42. Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H and Wetzel CH. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem.* 2007; 282(18):13180-13189.
43. Alenmyr L, Herrmann A, Hogestatt ED, Greiff L and Zygmunt PM. TRPV1 and TRPA1 stimulation induces MUC5B secretion in the human nasal airway in vivo. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2011; 31(6):435-444.
44. Purhonen AK, Louhivuori LM, Kiehne K, Kerman KE and Herzig KH. TRPA1 channel activation induces cholecystokinin release via extracellular calcium. *FEBS Lett.* 2008; 582(2):229-232.
45. Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA and Merlino G. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(2):701-706.
46. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A and Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992; 119(3):629-641.
47. Shojaei F, Lee JH, Simmons BH, Wong A, Esparza CO, Plumlee PA, Feng J, Stewart AE, Hu-Lowe DD and Christensen JG. HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors. *Cancer Res.* 2010; 70(24):10090-10100.
48. Pisters LL, Troncoso P, Zhou HE, Li W, von Eschenbach AC and Chung LW. c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J Urol.* 1995; 154(1):293-298.
49. Gupta A, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Lotan Y, Zlotta AR and Shariat SF. Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(22):7385-7390.
50. Yasuda K, Nagakawa O, Akashi T, Fujiuchi Y, Koizumi K, Komiya A, Saiki I and Fuse H. Serum active hepatocyte growth factor (AHGF) in benign prostatic disease and prostate cancer. *Prostate.* 2009; 69(4):346-351.
51. Jun HT, Sun J, Rex K, Radinsky R, Kendall R, Coxon A and Burgess TL. AMG 102, a fully human anti-hepatocyte growth factor/scatter factor neutralizing antibody, enhances the efficacy of temozolomide or docetaxel in U-87 MG cells and xenografts. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(22 Pt 1):6735-6742.
52. Smith DC, Smith MR, Sweeney C, Elfiky AA, Logothetis C, Corn PG, Vogelzang NJ, Small EJ, Harzstark AL, Gordon MS, Vaishampayan UN, Haas NB, Spira AI, Lara PN, Jr., Lin CC, Srinivas S, et al. Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial. *J Clin Oncol.* 2013; 31(4):412-419.
53. Sharma N and Adjei AA. In the clinic: ongoing clinical trials evaluating c-MET-inhibiting drugs. *Ther Adv Med Oncol.* 2011; 3(1 Suppl):S37-50.
54. Chen Y, Yang C and Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience.* 2011; 193:440-451.
55. Trevisan G, Materazzi S, Fusi C, Altomare A, Aldini G, Lodovici M, Patacchini R, Geppetti P and Nassini R. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res.* 2013; 73(10):3120-3131.
56. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N and Mariot P. A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium.* 2006; 39(4):357-366.
57. Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H and Denef C. Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology.* 1999; 140(10):4874-4885.
58. Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackiere F, Bidaux G, Urbain R, Gosset P, Delcourt P, Fleurisse L, Slomianny C, Dewailly E, Mauroy B, Bonnal JL, Skryma R and Prevarskaya N. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene.* 2009; 28(15):1792-1806.
59. Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK and Betz WJ. Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods.* 2004; 33(4):287-294.
60. Cochilla AJ, Angleson JK and Betz WJ. Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22:1-10.
61. Lacampagne A, Lederer WJ, Schneider MF and Klein MG. Repriming and activation alter the frequency of stereotyped discrete Ca²⁺ release events in frog skeletal muscle. *J Physiol.* 1996; 497 (Pt 3):581-588.

Article 2

TRPA1 channel constitutes a SOC channel in human prostate cancer stromal cells

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Lucile Noyer, Christian Slomianny, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Emilie Desruelles, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki.

Manuscrit en cours de soumission

L'entrée capacitive de Ca^{2+} ou SOCE (Store-Operated Calcium Entry) est considérée comme la principale entrée de Ca^{2+} dans les cellules non excitables impliquant dans de nombreux processus physiologiques (Putney, 2011). Dans plusieurs modèles cellulaires, ce mécanisme est assuré par STIM1 (Williams *et al.*, 2001), une protéine Ca^{2+} -senseur présente à la membrane du RE qui, suivant la vidange des stocks calciques intracellulaires, dimérise puis transloque dans une région où le RE est proche de la membrane plasmique afin d'activer 2 types de canaux SOC (Store Operated Channel) : Orai1 (Soboloff *et al.*, 2006) et les canaux TRP (Vanden Abeele *et al.*, 2004; Worley *et al.*, 2007). Il a été montré que les canaux SOC et le SOCE participaient au développement de plusieurs cancers comme le cancer de la prostate (Vanden Abeele *et al.*, 2003; Vanden Abeele *et al.*, 2003; Flourakis *et al.*, 2010; Raphael *et al.*, 2014) afin d'induire plusieurs processus clés comme la prolifération, l'apoptose, la migration, l'invasion ou encore la sécrétion de facteurs de croissance. Dans nos précédents travaux, nous avons montré que le canal TRPA1 était spécifiquement exprimé dans les CAFs prostatiques et que ce canal pouvait être activé par des agonistes comme l'ET-1. En effet, la fixation d'ET-1 sur son récepteur permettait la vidange des stocks calciques réticulaires et l'activation consécutive du canal assurant une entrée importante de Ca^{2+} dans la cellule participant à la sécrétion d'HGF. Ainsi, le but de cette étude était de déterminer le mécanisme d'activation du canal TRPA1 dans les CAFs prostatiques en étudiant son rôle dans le SOCE de ces cellules.

Par des études d'imagerie calcique et l'utilisation d'inhibiteurs (HC-030031) et de siARN dirigés contre le canal TRPA1, nous montrons que suivant la vidange des stocks calciques réticulaires induite par la thapsigargine, un inhibiteur de la pompe SERCA, l'inhibition et la répression du canal TRPA1 diminuent significativement le SOCE dans les CAFs montrant bien l'implication du canal dans ce mécanisme. Nos résultats montrent également que le SOCE induit dans ces cellules n'est pas dépendant de l'association entre la protéine STIM1

avec la protéine Orai1. En effet, la protéine STIM1 considérée comme la protéine la plus importante dans l'induction du SOCE de nombreuses cellules n'était pas exprimé dans les CAFs issus des prélèvements de 3 patients atteints de CaP sur 5 et son absence n'impactait pas sur le mécanisme. De plus, la répression de STIM1 et d'Orai1 par siARN avaient tendance à augmenter l'amplitude du SOCE suggérant une modulation négative de l'activité du canal TRPA1 par ces protéines. Par la suite, nous montrons que lorsque le canal TRPA1 était transfecté dans les cellules de la lignée HEK-293 et LNCaP qui n'expriment pas le canal, ce dernier constituait une part importante des canaux intervenant dans le SOCE de ces cellules montrant bien que le canal TRPA1 constitue un canal SOC. Enfin, nous montrons que c'est le Ca^{2+} intracellulaire provenant de la vidange des stocks calciques réticulaires qui est responsable de l'activation du canal TRPA1 induisant le SOCE en se fixant sur le domaine EF-hand du canal présent dans les domaines de répétition ankyrine de son extrémité Nter.

Ces travaux sont importants car ils montrent pour la première fois le rôle du canal TRPA1 dans le SOCE des CAFs prostatiques indépendamment des protéines STIM1 et Orai1, et que ce canal peut directement être activé par le Ca^{2+} intracellulaire afin d'induire l'entrée capacitive de Ca^{2+} caractérisant le canal TRPA1 comme un nouveau canal SOC.

Contributions : J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce manuscrit sous la supervision du professeur Morad Roudbaraki. Pour certaines parties, dans le cadre des préparations des outils (des plasmides d'expressions), j'ai eu recours à l'aide précieuse des techniciens du laboratoire que je remercie vivement.

TRPA1 channel constitutes a SOCE channel in human prostate cancer stromal cells

Eric Vancauwenberghe¹, Sandra Derouiche¹, Loïc Lemonnier¹, Pierre Gosset², Lucile Noyer¹, Christian Slomianny¹, Philippe Delcourt¹, Laurent Allart¹, Emilie Desruelles¹, Brigitte Mauroy^{1,3}, Jean-Louis Bonnal^{1,3}, Natalia Prevarskaya¹ and Morad Roudbaraki^{1*}.

Affiliations

1. Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France
2.Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille
3Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert, Lille

Short title : TRPA1 constitutes a SOC channel

Key words: Prostate cancer, Cancer associated fibroblasts, CAF, tumor microenvironment, Calcium signaling, Calcium channels, SOCE, Store-operated channels, TRPA1, Orai1, STIM1

*To whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003
SN3, Université Lille I Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Fax: (33) 3 20 43 40 66
Phone: (33) 3 20 33 64 23
e-mail: morad.roudbaraki@univ-lille1.fr

ABSTRACT

Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE), an important Ca²⁺ influx following intracellular Ca²⁺ store depletion is the most important mechanism for Ca²⁺ influx in non-excitabile mammalian cells. In many cellular models, this mechanism is ensured by STIM1, a protein Ca²⁺ sensor present at the ER membrane which following Ca²⁺ store depletion, translocate to an ER/ plasma membrane close region in order to activate two types of SOC channels: Orai1 and TRP channels. It has been shown that SOC channels and SOCE participate to the growth, migration, apoptosis or secretion in cancer cells including prostate cancer cells. We have recently shown that the Ca²⁺-permeable channel TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) was expressed in human prostate cancer (PCa) stromal cells (PrCSC, CAF) and its activation induced expression and secretion of Hepatocyte Growth Factor (HGF). In the present work, by using primary cultured PrCSC (CAF) derived from human PCa patients, we investigated for the first time the role of TRPA1 in the SOCE of prostate cancer stromal cells. Our data show that TRPA1 channel is the major channel involved in the SOCE of PCa CAFs regardless Orai1 and STIM1 association and that this channel can be directly activated by intracellular Ca²⁺ released from the intracellular stores. The data presented

here support the hypothesis that TRPA1 constitutes a SOC channel modulated negatively by STIM1.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men worldwide after lung cancer. Tumor cells proliferation and survival being dependant of androgens, the treatments consist to prevent the action of androgens by androgen deprivation therapy. Although these treatments are effective at the beginning, thereafter, tumor progress toward an androgen-independent state with more aggressive tumor cells forming metastases, suggesting the involvement of other factors than androgens. In recent years, the literature has focused on the tumor microenvironment and the role it could play in prostate carcinogenesis. Following epithelial changes in carcinogenesis, the surrounding stroma is modified by cancer cell-derived factors. These modifications drive the emergence of the characteristic reactive stroma with a sharp decrease in the rate of smooth muscle cells and an increase in the number of activated fibroblasts called cancer-associated fibroblast (CAF) [1, 2]. These cells, in return, secrete extracellular matrix proteins and soluble factors (cytokines, growth factors) promoting the initiation

and/or progression of certain carcinomas [3-6], including breast and prostate [1, 7, 8] despite the absence of androgens. Thus, there is a clear need to better understand this epithelia-stromal cross-talk and to find new molecular targets involving in these interactions in order to improve current prostate cancer therapies. It is well established that in most cell types, increase in cell calcium (Ca^{2+}) concentrations is associated to a cell growth and/or secretory responses [9-11].

The Transient Receptor Potential (TRP) channels TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), and TRPA (ankyrin) are involved in diverse functions that include transduction of sensory information, cell growth/death, and neurotransmitter/hormone release [12]. In a recent work, we showed that Transient receptor potential (TRP) ankyrin 1 (TRPA1), a non-selective Ca^{2+} permeable channel that belongs to the TRP superfamily, was exclusively expressed in human prostate cancer stromal cells (PrCSC) but not in epithelial cells. Expression and activity of the channel were directly modulated by factors secreted by epithelial tumor cells inducing an increase in free calcium concentrations following Ca^{2+} store depletion and HGF secretion promoting apoptosis resistance of tumor cells to chemotherapeutics agents like doxorubicin (Vancauwenberghe *et al.*, for review). Indeed, in addition to be activated by reactive electrophilic food ingredients and irritants like allyl isothiocyanate (AITC), but also by non-reactive sensory compounds like methylsalicylate and icilin [13-20], it has been shown that TRPA1 could be activated following IP_3 -dependent release of Ca^{2+} from intracellular stores [13], suggesting an involvement of TRPA1 in the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), a putative Ca^{2+} binding EF-hand domain being identified in the N-terminal region of the channel where the Ca^{2+} has been shown to directly modulated activity of TRPA1 channel [21, 22].

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) also called capacitative calcium entry (CCE) is the most important mechanism for Ca^{2+} influx in non-excitable mammalian cells, controlled by the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores [23]. This ubiquitous Ca^{2+} influx pathway is activated by intracellular Ca^{2+} store depletion involving different molecules, one of the most important being STIM1 (Stromal interaction molecule 1), a Ca^{2+} -binding protein expressed in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) [24]. Its N-terminal is facing the ER lumen and contains an EF-hand, which binds Ca^{2+} with a low affinity. Thus, depletion of intracellular Ca^{2+} stores is detected by STIM1 which oligomerizes and re-localizes at sites of close proximity to the plasma membrane and the ER membrane allowing its association with two types of Ca^{2+} influx SOC

channels: Orai1 [25] and TRP channels [26, 27] ensuring SOCE. In this context, we previously showed that TRPC1, TRPV6 and Orai1 are the main actors in SOCE in human PCa cells LNCaP [28-31]. However, the involvement of the TRPA1 channel in SOCE of prostate CAFs is not studied so far.

In the present study we have investigated the role of TRPA1 channel in the regulation of SOCE in primary cultured stromal cells derived from prostate cancer patients. Our results indicate that TRPA1 can be activated directly by the calcium depleted from the intracellular stores and constitute a major component of the SOCE in prostate CAFs regardless STIM1 and Orai1 association. Taken together, our data suggest that TRPA1 constitute a SOC channel in prostate CAFs and that according cellular systems, STIM1 is not essential for the SOCE.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and antibodies

All chemicals, agonists and inhibitors were from Sigma-Aldrich. Allyl isothiocyanate (AITC), HC-030031 and SKF-96365 were dissolved in DMSO and conserved at -20°C and then diluted to the desired concentration on the day of the experiments. Antibodies were from commercial sources as follows: Rabbit anti-hTRPA1 (Alomone Labs), rabbit anti-STIM1 (Alomone Labs), mouse anti-Orai1 (ProSciences) and mouse anti- β -actin (Sigma) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Cell lines

LNCaP, PC-3 and DU145 prostate cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured as previously described [32].

Tissue specimens and primary cell cultures

Human PCa biopsies were obtained from consenting patients following local ethical considerations. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number 'CP 01/33', issued by the 'Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille'. A portion of prostate tissue suspected of carcinoma was incised, and one half of the sliced tissue was submitted for immediate microscopic examination on cryostat sections. After establishment of the diagnosis of adenocarcinoma, the remaining half of the tissue was used for primary culture. The tissue was cut into multiple minute cubes, placed on a plastic surface, and grown in Phenol-red-free RPMI 1640 containing charcoal-stripped Fetal Calf Serum (FCS) (CS-RPMI) (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). As soon as outgrowths formed around the tissue fragments, cells were trypsinized and cultured for calcium imaging, RT-PCR and western blot experiments.

Cell transfections

For siRNA experiments, equal numbers of cells from the same culture were seeded, transfected overnight either with 25 nM of control siRNA (targeting Luciferase mRNA) (Eurogentec, Angers, France), or with different siRNA raised against TRPA1, Orai1 and STIM1 mRNA (siTRPA1, siOrai1, siSTIM1). The Hiperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) was used to transfect the cells according to the manufacturer's instructions. The medium was changed 24 h after transfections and cells were incubated for a further 24h before performing experiments. The target sequences for siRNA used in this study are: siTRPA1: 5'-GGUGGGAUGUUAUCCAUUA-3'; siOrai1:5'-UGAGCAACGUGCACAAUCU (dTdT)-3'; STIM1: 5'-GGCUCUGGAUACAGUGCUC-3'. The efficiency of the siRNA was validated by RT-PCR and by Western Blot studies. Alexa Fluor Red Fluorescent Control siRNA was used to optimize the transfection conditions. The efficiency of the siRNA was validated by RT-PCR and by Western Blot studies conducted on primary cultured CAF (data not shown).

Western Blot Assay

Primary cultured stromal cells and PCa epithelial cells (LNCaP, DU145 and PC-3) cells were cultured at 80% confluence and total proteins were extracted. 10 to 40 µg of each sample were analysed by SDS-PAGE on either 6% or 10% acrylamide gel and processed for western-blotting using TRPA1 (1:500^e) and β-actin (1/1000^e) antibodies as described previously [34] and revealed by the ECL chemiluminescence kit (Millipore, France).

Calcium imaging experiments

Calcium imaging experiments were performed as previously described [34] using Fura-2/AM as a calcium dye. To represent the variation in $[Ca^{2+}]_i$, the fluorescence intensity ratio represented by F340/F380 was used as an indicator of changes in cytosolic Ca^{2+} concentration. Each experiment was performed on 35–45 cells in duplicate and repeated at least four times on different cell cultures and a representative figure is presented. For the quantifications of the amplitude of the calcium entries, the measures are done at the pic levels in different experimental conditions and compared between them.

Statistical analysis

Plots were produced using Origin 8.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean ± S.E. Statistical analysis was performed using unpaired *t* tests or ANOVA tests followed by either Dunnett (for multiple control

versus test comparisons) or Student-Newman-Keuls post-tests (for multiple comparisons). Student's *t*-test was used for statistical comparison of the differences and $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

TRPA1 channel is functional in prostate CAFs and participates actively to the SOCE In our previous studies, we have shown that TRPA1 ion channel was expressed in human prostate cancer-associated fibroblasts (CAF) whereas its expression was absent in tumoral epithelial cells. In these studies, the channel was involved in HGF secretion conferring apoptosis resistance to epithelial prostate cancer cells against chemotherapeutics agents like as doxorubicin and docetaxel (Vancauwenberghe *et al.*, 2016, in review). To determine the channel functionality in PrCSC (Prostate Cancer Stromal cells) derived from different primary cultured stromal cells from prostate cancer tissues, we used the Ca^{2+} imaging technique by using the ratiometric dye Fura-2, in the presence of a well-known TRPA1 channel activator, allyl isothiocyanate (AITC), a synthetic compound derived from mustard-oil. We observed that AITC induces a rapid increase in cytosolic free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) in PrCSC in a dose-dependent manner and that in most cases, a sustained plateau was reached for a concentration of 30 µM. In order to assess the specificity of TRPA1 activation by AITC, we used HC-030031 (50 µM), a selective inhibitor of the channel. After application of HC-030031 on the cells, the amplitude of the AITC-induced calcium response was decreased by approximately $78 \pm 6.3\%$ (Figure 1A), confirming the functionality of the TRPA1 channel in these cells. These results were confirmed by using specific siRNA directed against a part of hTRPA1 coding sequence with a repression efficacy more than 80% (Figure S1). Indeed, forty eight hours after transfection of cells with siTRPA1 (25 nM) AITC-induced calcium entry was reduced by $68 \pm 5.3\%$ when measured the pic amplitude of the calcium entries (Figure 1B), confirming the involvement of TRPA1 in the AITC-induced calcium response in PrCSC.

This channel being functional, it is important to know how its activity can be regulated in prostate CAFs. In this context, published data have shown that TRPA1 channel could be activated secondarily to the activation of G protein-coupled receptors (GPCRs) and more particularly following phospholipase C (PLC) activation and IP3-dependent release of calcium from intracellular stores [13, 35]. Thus, it is possible that TRPA1 is involved in the SOCE. Therefore, we performed Ca^{2+} imaging experiments by using thapsigargin (TG, 1µM), an inhibitor of SERCA pump as a store-depleting agent in order to induce the SOCE in presence or in absence of HC-030031 (50µM).

In order to distinguish Ca^{2+} store depletion from Ca^{2+} capacitive entry (CCE), Ca^{2+} imaging experiments were initiated in a medium HBSS without Ca^{2+} . Interestingly, the application of HC-030031 did not affect the amplitude of Ca^{2+} store depletion but the amplitude of CCE was decreased by $75 \pm 14.5\%$ (Figure 1C) showing an important role of the TRPA1 channel in the SOCE generated in prostate CAFs. Similarly, TRPA1 repression with siTRPA1 affected the SOCE in a significant way, the amplitude of the Ca^{2+} response being decreased by $64 \pm 13\%$ (Figure 1D). Thus, TRPA1 channel participates actively to the SOCE induced by TG in prostate CAFs. SOCE being known to be mediated mainly by the membrane ion channel Orai1 in association with the protein transducer STIM1 in many cellular models, we have investigated their involvement in the SOCE of prostate CAFs

alongside TRPA1 channel.

Orai1/STIM1 association is not determining for the SOCE in prostate CAFs

Protein expression of TRPA1, Orai1 and STIM1 was studied by western blot experiments in PrCSC originated from 5 different patients with PCa and in PCa epithelial cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3) (Figure 2A). As our previous studies, TRPA1 was only expressed in PrCSC and not in PCa epithelial cell lines. Concerning Orai1 and STIM1, Orai1 was expressed in the two cells compartments, epithelial and stromal cells, while among the 5 patients studied, our results show that STIM1 was only expressed in the PrCSC originated from 2 patients (patients 2 and 3) and in PCa epithelial cell lines. STIM1 being known as the main actor of SOCE induction by activating SOC channels, we have studied, by Ca^{2+} imaging experiments, SOCE induced by TG in PrCSC originated from a patient expressing STIM1

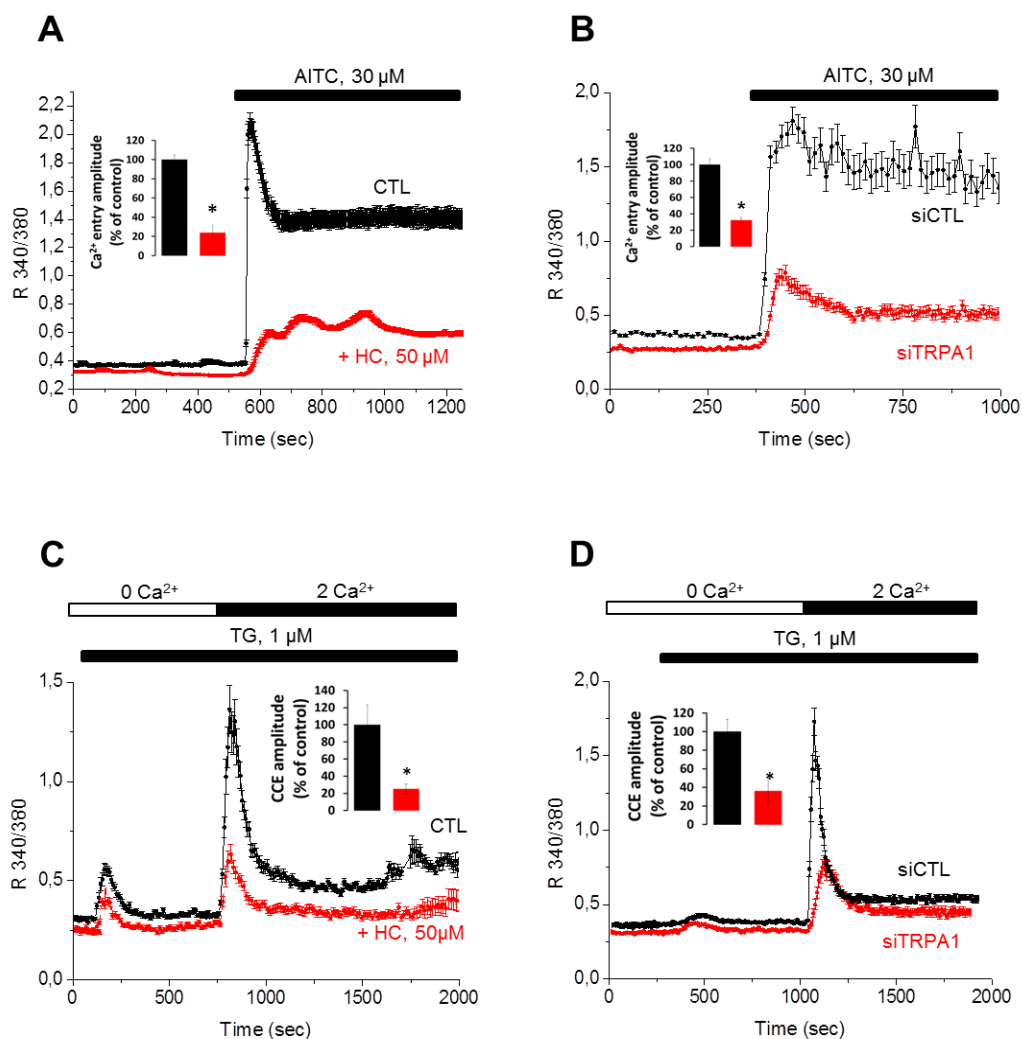


Figure 1: Functionality of TRPA1 ion channel and involvement in the SOCE of prostate CAFs
 The TRPA1 functionality was studied by calcium imaging experiments using AITC (30 μM), a known TRPA1 channel activator in the absence or presence of a TRPA1 channel inhibitor (HC-030031, 50μM) (A), in non-transfected PrCSC and in siCTL and siTRPA1-transfected cells (B). Calcium imaging experiments studying store operated Ca^{2+} entry (SOCE) induced by 1 μM thapsigargin (TG) in PrCSC in the presence or absence of TRPA1 inhibitor (HC-030031, 50μM) in non-transfected PrCSC (C) and in siCTL and siTRPA1-transfected cells 48h after lipofection (D). All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown. *- p<0.05

(patient 2) compared to a patient who didn't expressed STIM1 (patient 3) (Figure 2B). Surprisingly, our results show that when STIM1 was expressed in prostate CAFs, amplitude of the CCE induced by TG was decreased by 58% suggesting that STIM1 modulated negatively the CCE in these cells. In order to assess involvement of Orai1 and STIM1 in SOCE of prostate CAFs where STIM1 was expressed (patient 2), we have realized Ca^{2+} imaging experiments on PrCSC transfected for 48h with siRNAs directed against

wt-hOrai1 (siOrai1, 25 nM) and wt-hSTIM1 (siSTIM1, 25nM) coding sequences, their repression efficacy being previously characterized (Figure S1). After TG treatment, the repression of Orai1 and STIM1 didn't affect the amplitude of the Ca^{2+} store depletion (Figures 2C and D) but surprisingly, increased the amplitude of CCE respectively by $27 \pm 13.6\%$ with siOrai1 (Figure 2C) and by $33 \pm 1.5\%$ with siSTIM1 (Figure 2D). These results indicate that Orai1 and STIM1 modulate negatively the amplitude of CCE without

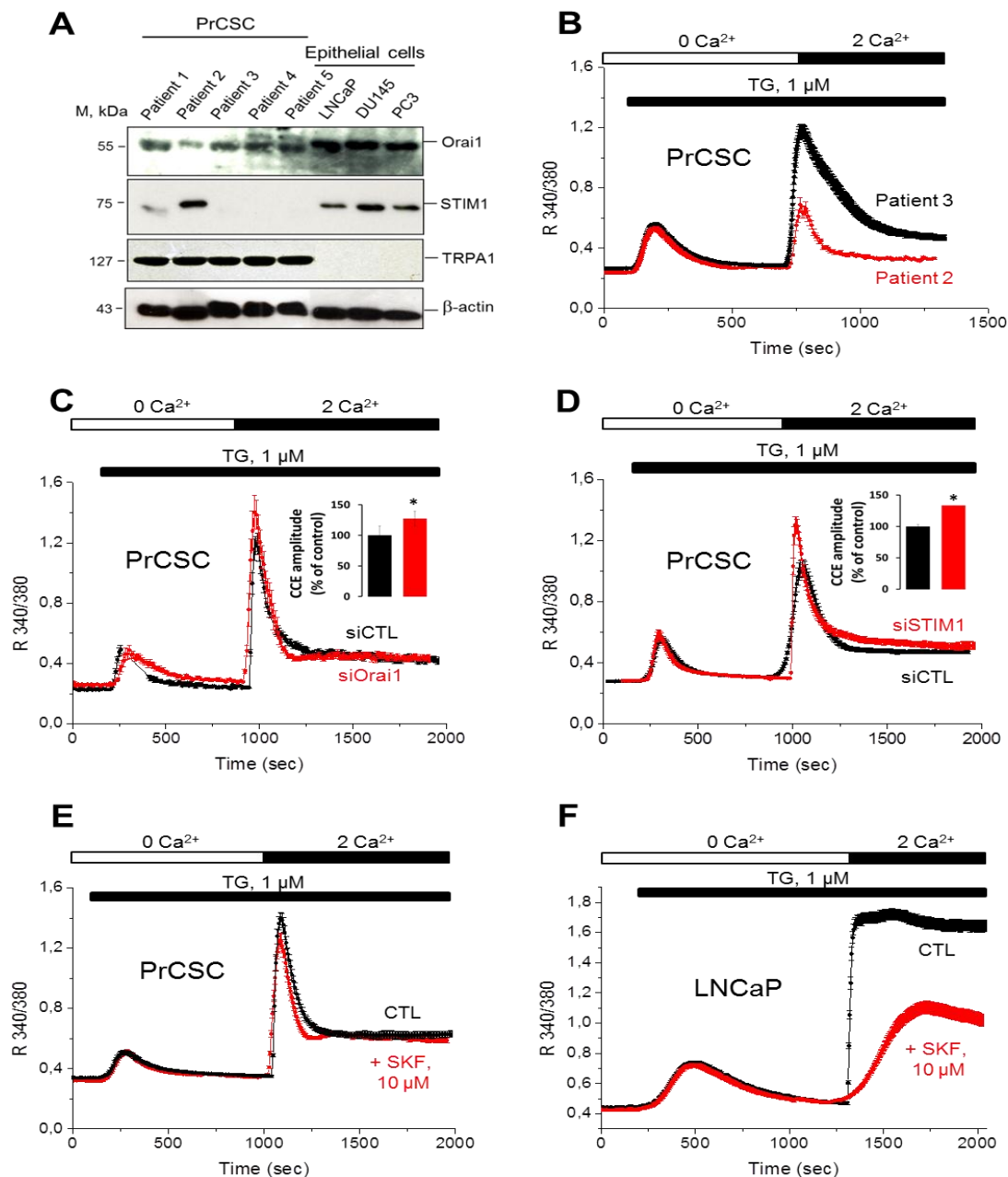


Figure 2 : SOCE is enabled regardless Orai1/STIM1 complex in PrCSC

(A) Protein expression of TRPA1, Orai1 and STIM1 were studied by western blot experiments in PrCSC originated from 5 different patients and prostate cancer epithelial cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3). (B) Calcium imaging experiments studying SOCE induced by 1 μ M TG in PrCSC originated from a patient (patient 2) expressing STIM1 and from a patient who didn't express STIM1 (patient 3). Calcium imaging experiments studying SOCE induced by 1 μ M TG in siCTL, siOrai1-transfected cells (C) and in siSTIM1-transfected cells (D) 48h after lipofection, the PrCSC used for these experiments originated from the patient 2 expressing STIM1. In order to confirm these results, other Ca^{2+} imaging experiments were performed in the presence or absence of non-specific inhibitor of SOCE (SKF-96365, 10 μ M) in PrCSC (E) and LNCaP cells (F). All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown. * - $p < 0.05$

participate directly to the SOCE in prostate CAFs contrary to other cellular models. Indeed, the application of SKF-96365 (10 μ M), a non-specific inhibitor of SOCE, known to inhibit Orai1 and STIM1, didn't affect the CCE induced by TG in PrCSC (Figure 2E) contrary to epithelial prostate cancer cells like LNCaP cells whose SOCE is mainly due to the association between Orai1 and STIM1. Indeed, in these cells, the CCE was decreased by 50% after treatment with SKF-96365 (10 μ M) (Figure 2F) showing that ion channels constituting SOCE are different according to the cellular model. These data are interesting because regardless of STIM1 expression, SOCE induced by TG was observed by Ca²⁺ imaging in all the PrCSC tested and confirm that SOCE in prostate CAFs is not by Orai1/STIM1 association but following TRPA1 activation in these cells.

TRPA1 ion channel reorganize SOCE when it is expressed in other cellular models

Thereafter, we have studied the impact of TRPA1 channel on the SOCE of other cells which doesn't express the channel as LNCaP cells or HEK 293 cells where SOCE is mainly regulated by Orai1 and STIM1 proteins [27, 36, 37]. For this purpose,

by calcium imaging experiments, the effects of TRPA1 on the SOCE induced by TG were studied in LNCaP and HEK 293 cells transiently transfected with human wt-TRPA1 expression vector (LNCaP-TRPA1 and HEK-TRPA1). For these experiments, LNCaP and HEK 293 cells transfected with GFP (LNCaP-GFP and HEK-GFP) were used as control for comparisons. The channel functionality was assessed by using AITC (30 μ M) which induced a rapid increase in ([Ca²⁺]_i) then a sustained plateau in LNCaP-TRPA1 and a transitory response in HEK-TRPA1 cells contrary to the control (Figure 3A and 4A).

Interestingly, our results show that the expression of TRPA1 channel in LNCaP cells increased the amplitude of the SOCE by 25% (Figure 3B) and that when the channel was inhibited by HC-030031 (50 μ M), the amplitude of the SOCE was decreased by 35% (Figure 3D), TRPA1 inhibitor didn't affecting the SOCE when the channel was absent in LNCaP (Figure 3C). Similar results were observed for HEK-TRPA1 cells where inhibition of TRPA1 channel with HC-030031 (50 μ M) decreased the amplitude of SOCE by 50% (Figure 4C). Thus, the fact that TRPA1 channel is involved

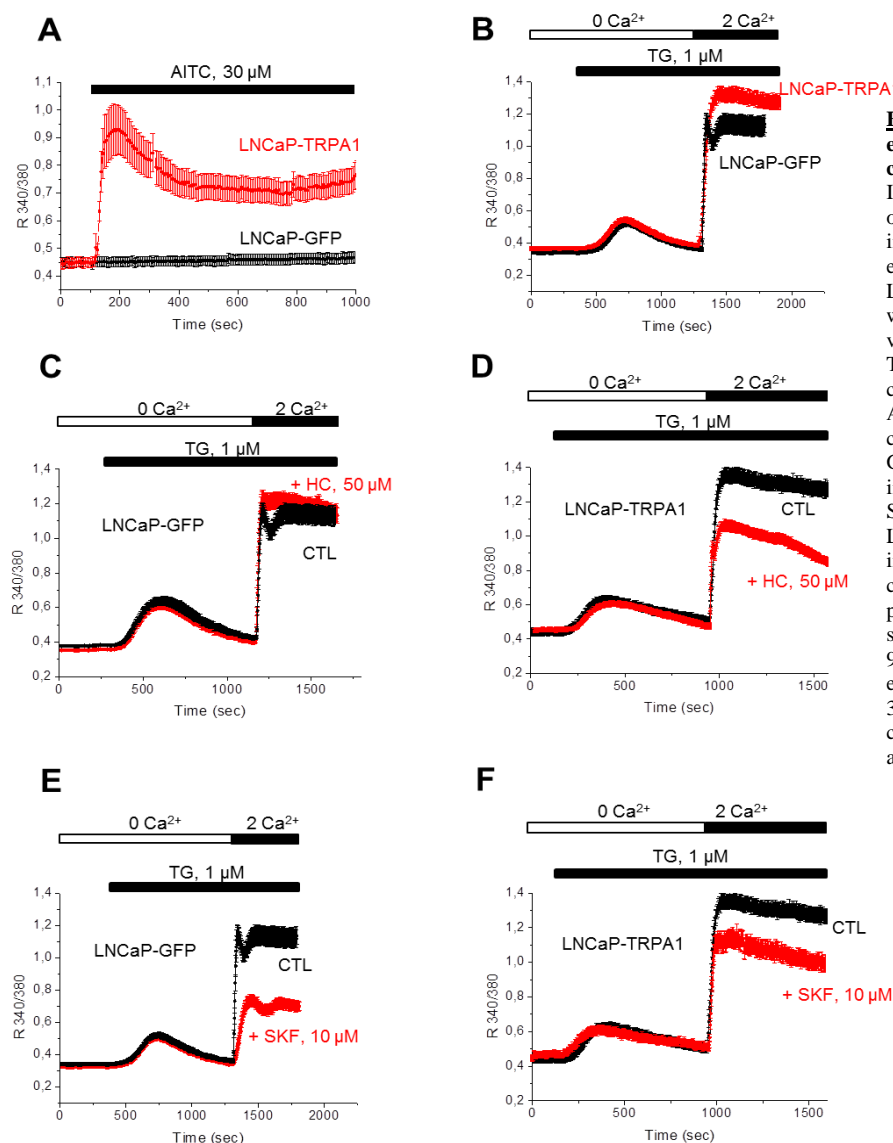


Figure 3: Involvement of TRPA1 expression in the SOCE of LNCaP cells

In order to better understand the role of TRPA1 ion channel in SOCE induced by TG, calcium imaging experiments, were performed on LNCaP cells transiently transfected with human wt-TRPA1 expression vector (LNCaP-TRPA1) whose TRPA1 functionality was assessed by calcium imaging experiments using AITC (30 μ M) (A) and on LNCaP cells transfected with GFP (LNCaP-GFP) used as control. Calcium imaging experiments studying SOCE induced by 1 μ M TG in LNCaP-GFP and LNCaP-TRPA1 (B) in presence or absence of TRPA1 channel inhibitor (C, D) and in presence or absence of a non-specific inhibitor of SOCE (SKF-96365, 10 μ M) (E, F). All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown.

in a part of the SOCE when it is expressed in LNCaP and HEK-293 cells suggest that TRPA1 constitutes an active SOC channel like Orai1, TRPC1 or TRPV6 previously characterized as ion channels participating directly to the CCE [25-31]. Finally, Orai1/STIM1 association having an important role in the SOCE of LNCaP and HEK-293 cells, we have investigated their function in presence or in absence of TRPA1 channel by using SKF-96365 (10 μ M) on LNCaP-GFP, LNCaP-TRPA1 and HEK-TRPA1 cells treated with TG (1 μ M). As shown in **Figure 3E**, the amplitude of CCE was decreased by 52% when the cells were treated with SKF in LNCaP-GFP cells while it was only decreased by 30% when TRPA1 channel was expressed in LNCaP-TRPA1 cells (**Figure 3F**) confirming that TRPA1 is added to other channels expressed by LNCaP cells in order to generate SOCE. Interestingly, SKF-96365 didn't affect SOCE when TRPA1 channel was expressed in HEK-293 cells (**Figure 4B**) and inhibition of TRPA1 channel with HC-030031 (50 μ M) in combination with SKF-96365 suppressed totally the SOCE induced by TG in these cells (**Figure 4D**) confirming that when the channel is expressed, it can be added to other SOC channels in order to

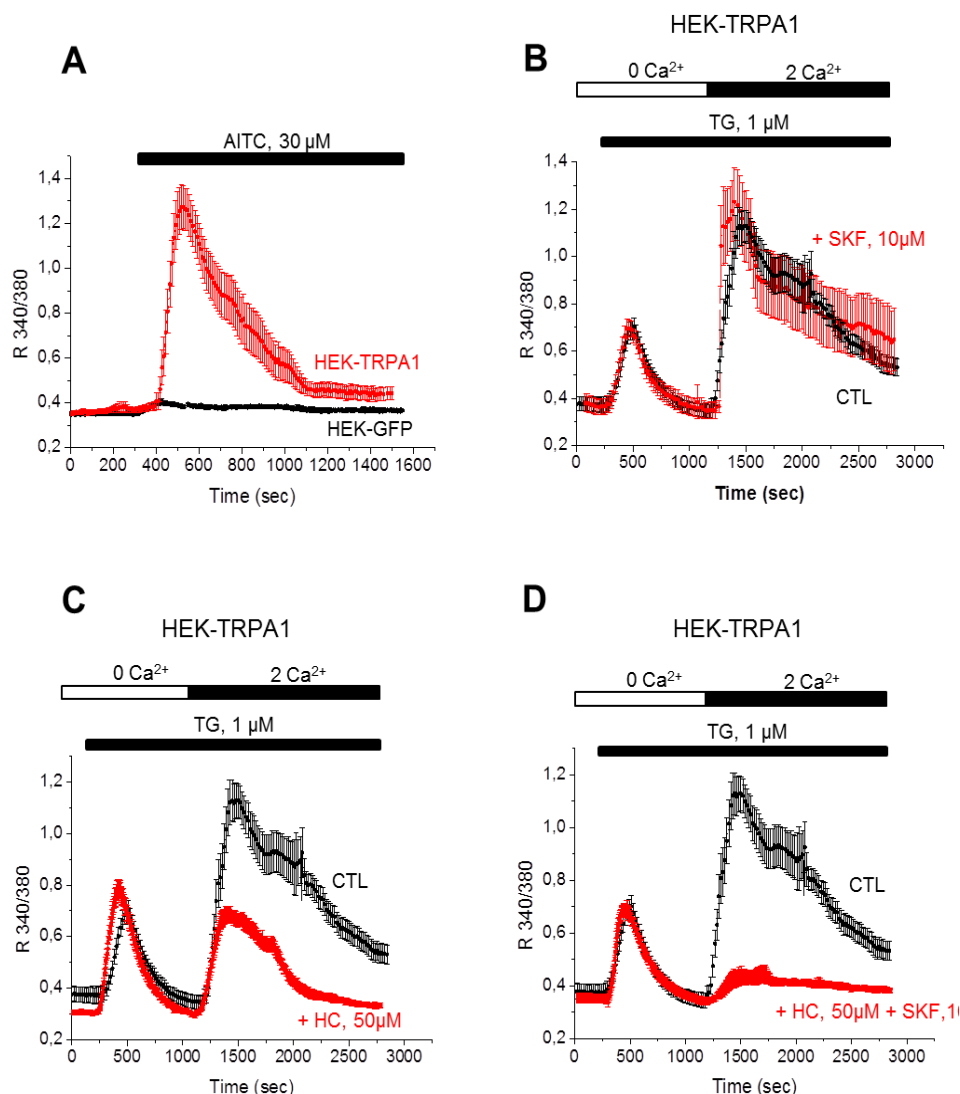
generate SOCE and therefore, this channel can constitute a supplementary SOC channel with a role more or less important dependent of the cellular model where it is expressed.

TRPA1 channel is directly activated by the Ca²⁺ released from intracellular stores in prostate CAFs

We have shown previously that TRPA1 channel participated actively to SOCE in prostate CAFs following depletion of Ca²⁺ stores induced by TG and surprisingly, that the SOCE was independent of STIM1 expression in these cells, STIM1 modulating negatively the CCE in PrCSC. Indeed, many studies have shown that TRPA1 contain a putative Ca²⁺-binding EF-hand domain in its N terminus and that intracellular Ca²⁺ is able to directly activate the channel [13, 22] to enable Ca²⁺ entry. In this context, we have realized Ca²⁺ imaging experiments by using BAPTA-AM (5 μ M), an intracellular calcium chelator in order to see involvement of intracellular Ca²⁺ depleted from intracellular stores on CCE in PrCSC. Our results show that contrary to LNCaP cells where intracellular Ca²⁺ chelation didn't affect the amplitude of CCE induced by TG (**Figure 5A**), the amplitude of the SOCE was decreased by 37%

Figure 4: Involvement of TRPA1 expression in the SOCE of HEK 293 cells

In order to better understand the role of TRPA1 ion channel in SOCE induced by TG, calcium imaging experiments, were performed on HEK-293 cells transiently transfected with human wt-TRPA1 expression vector (HEK-TRPA1) whose TRPA1 functionality was assess by calcium imaging experiments using AITC (30 μ M) (**A**) in presence or absence of a non-specific inhibitor of SOCE (SKF-96365, 10 μ M) (**B**) and in presence or absence of TRPA1 channel inhibitor, HC-030031 (50 μ M) (**C**) or both inhibitors used in combination (**D**). All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown.



following Ca^{2+} chelation in PrCSC (Figure 5B). Thus, intracellular Ca^{2+} released from the cytosolic stores participates directly to SOCE in prostate CAFs. To assess if this direct modulation of SOCE by Ca^{2+} was linked to TRPA1 channel activation, PrCSC were transfected with a mutant of hTRPA1 for its putative Ca^{2+} binding loop (L474A) decreasing significantly sensitivity of the channel to increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ without affected channel functionality as shown in figure 5C where AITC (30 μM) induced a response in transfected cells. Finally, the transfection of TRPA1-L474A in PrCSC decreased the amplitude of SOCE by 50% in PrCSC (Figure 5D) confirming that TRPA1 is a SOC channel directly activated by the binding of intracellular Ca^{2+} depleted from internal store on its EF-hand

domain in prostate CAFs.

DISCUSSION

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), an important Ca^{2+} influx following intracellular Ca^{2+} store depletion is the most important mechanism for Ca^{2+} influx in non-excitabile mammalian cells [23] involved in multiple physiological and pathological processes like cancer [29, 30, 38], including malignant transformation, cell division [39-41], apoptosis [28, 42], growth factor secretion [43], cell migration [44] and angiogenesis [45]. The SOCE is known to mainly involve STIM1, a protein Ca^{2+} sensor with a single-pass transmembrane domain residing in RE, which following Ca^{2+} store depletion, translocate to regions where the ER is in close proximity to PM

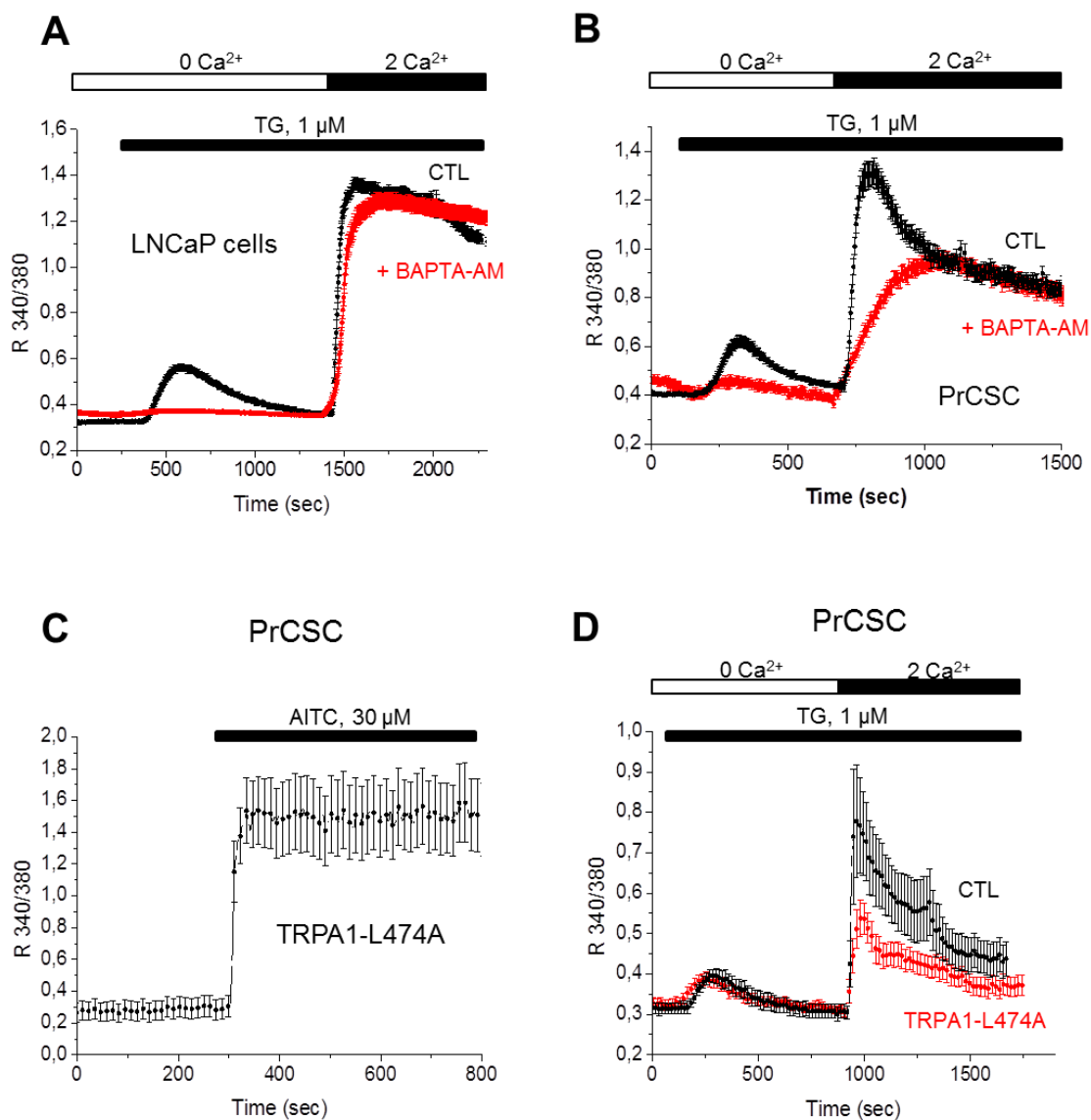


Figure 5: SOCE mediated by TRPA1 channel is directly activated by intracellular Ca^{2+} in PrCSC The involvement of intracellular Ca^{2+} on the SOCE induced by TG (1 μM) was assess by Ca^{2+} imaging experiments using intracellular chelator, BAPTA-AM (5 μM) performed on LNCaP cells (A) and PrCSC (B). TRPA1 being able to bind intracellular Ca^{2+} through an EF-hand domain present on its N terminus, PrCSC were transiently transfected with a mutant of hTRPA1 for its putative EF-hand domain (TRPA1-L474A) whose functionality was assess by Ca^{2+} imaging experiments using AITC (30 μM) compared to non-transfected cells (C). Ca^{2+} imaging experiments studying SOCE induced by 1 μM TG in non-transfected and TRPA1-L474A-transfected cells (D). All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown.

in order to activate two types of SOC channels by direct interaction : Orai1 [25] and TRP channels [26, 27]. However, the exact contribution of these two types of channels to SOCE changing from cell to cell.

In the present work, we studied for the first time, the impact of TRPA1 channel in the SOCE of human PCa CAFs. By Ca^{2+} imaging studies, we showed that TRPA1 channel was functional and that its inhibition by specific inhibitors (HC-030031) and repression by specific siRNA significantly decreased the SOCE induced by artificially Ca^{2+} store depletion with TG, a SERCA inhibitor, the amplitude of CCE being respectively decreased by $75 \pm 14.5\%$ and by $64 \pm 13\%$ (Figures 1C and 1D). These results are consistent with our previous work where we have shown that TRPA1 channel was activated through transduction pathway generated by Endothelin 1, following Ca^{2+} store depletion induced by IP_3 binding on its receptor (Vancauwenberghe *et al.*, under review). Interestingly, we have observed with other Ca^{2+} imaging studies that the remaining Ca^{2+} response after inhibition of the channel reflected the Ca^{2+} switch induced by addition of the Ca^{2+} in HBSS medium during the experiments. Thus, our results show a major role for TRPA1 channel in the SOCE of prostate CAFs.

Association between STIM1 and Orai1 being the most important event to induce SOCE in many cellular models [46-50], we investigated the role of these proteins in SOCE of prostate CAFs by studying, their expression in PrCSC originated from 5 patients with PCa and in PCa epithelial cell lines (LNCaP, DU145 and PC3). Surprisingly, on the 5 patients studied, our data show that STIM1 was only expressed in the PrCSC of 2 patients (Figure 2A), the SOCE amplitude induced by TG, being significantly decreased when STIM1 was expressed (Figure 2B). Moreover, Orai1 and STIM1 repression by siRNA (Figures 2C and D) increased the amplitude of the CCE in PrCSC expressing the protein suggesting in a one hand that Orai1 and STIM1 regulate negatively the SOCE and TRPA1 channel activity in PCa CAFs and on the other hand that Orai1/STIM1 association is dispensable to induce SOCE in these cells. Indeed, use of SKF-96365 (10 μ M), a non-specific inhibitor of SOCE mediated by STIM1/Orai1 association didn't affect the SOCE induced by TG in PCa CAFs (Figure 2E). It is known that depending of the cellular model, TRP channels can constitute the major components of the SOCE independently of Orai1 expression as TRPC1 in the gland salivary cells [51, 52], but in these cases, it is always due to the association with STIM1. In this context, a study has shown that STIM2, another member of STIM family, also located at the RE membrane and proposed to regulate basal cytosol and store Ca^{2+} concentrations [53, 54], in some cell types, was the

predominant STIM isoform in cortical neurons and played a key role in SOCE induction of these cells [55]. Interestingly, STIM1 and Orai1 expression were weak in cortical neurons, their repression didn't affecting the SOCE supporting our results. Moreover, it has been shown that Orai2 and Orai3 could also assemble functional SOCE channels [56, 57] being modulated by STIM1 and STIM2 showing that SOC channels and mechanism of SOCE induction differs according to the cellular model. Concerning the negative regulatory of the SOCE by STIM1 and Orai1 in PCa CAFs, it has been shown that STIM1 *via* its STIM1-Orai1 activating region (SOAR) or CRAC activation domain (CAD) and Orai1 were able to bind L-type VGCC (voltage-gated calcium channel) causing inhibition and internalization of these channels in both neurons [58] and muscle cells [59]. In addition, Albarrán *et al.* [60] have shown that TRPA1 channel could associate with Orai1 and STIM1 and negatively regulate the SOCE by modulating the association of STIM1 with Orai1 in human megakaryoblastic cell lines MEG01. Thus, it is possible that TRPA1 channel, main actor of SOCE in the PCa CAFs is inhibited by Orai1 and STIM1 in the cells expressing STIM1 by the same mechanism inhibiting L-type VGCC.

Thereafter, we have shown that TRPA1 overexpression in LNCaP, a PCa epithelial cell line and in HEK-293 cells where TRPA1 expression was absent, induced a reorganization of the channels participating to SOCE. Indeed, when the channel was expressed in these cells, TRPA1 channel constituted a part of the SOCE normally induced by Orai1/STIM1 association in these cells (Figures 3 and 4). With these results added to the major involvement of TRPA1 in the SOCE of PCa CAFs and its ability to interact with STIM1 well-known, our data show that TRPA1 channel can be considered as a SOC channel.

Transient receptor potential (TRP) ankyrin repeat 1 (TRPA1) is a Ca^{2+} -permeable ion channel predominantly expressed in sensory neurons that senses acute and inflammatory pain signals and that constitute a thermal and chemical sensor activated by pungent irritants as well as volatile environmental toxins and endogenously produced substances such as hydrogen peroxide and cannabinoids [13-20], 4-Hydroxynonenal (4-HNE), cyclopentenone prostaglandins (PGJ2) [18], Methylglyoxal, formed from triose phosphates during secondary glucose metabolism in hyperglycemic condition [61]. TRPA1 was also recently shown to be regulated *via* the activation of phospholipase C-coupled receptors like Bradykinin receptor, or PAR2 (Protease-Activated Receptor 2) [35] secondarily to the ER Ca^{2+} store depletion induced by binding of IP_3 on its receptor. In this context, many studies have shown that TRPA1 channel could be directly activated by the Ca^{2+} released from intracellular stores by binding to a

putative Ca²⁺- binding EF hand region identified within the ankyrin repeat of the N-terminal domain [21, 22]. Indeed, Doerner *et al.* [21] have developed TRPA1 channels mutants for the EF-hand domain and have shown that mutation L474A eliminated calcium sensitivity of the channel. Thus, in our present work, by using TRPA1-L474A mutant and by intracellular Ca²⁺ chelation, we show that absence of binding of intracellular free Ca²⁺ on TRPA1 channel decreased significantly the SOCE induced by TG in PCa CAFs showing the important role of Ca²⁺ in SOCE-mediated by TRPA1 activation (Figure 5). It was the same when the SOCE was induced by store depletion following PLCβ/IP3 pathway induced by ET-1. To conclude, this work characterize for the first time, TRPA1 channel as a SOC channel in prostate CAFs inducing SOCE following direct binding of the Ca²⁺ on the EF-hand domain of the channel regardless STIM1 and Orail association and show that channels constituting SOC depend of cellular model.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr LR Sadofsky (Cardiovascular and Respiratory Studies, The University of Hull, Castle Hill Hospital, Cottingham, Hull HU16 5JQ, UK) for the hTRPA1-pCDNA3 expression vector construction, E Richard for the technical assistance in images analysis by confocal microscopy and A Desmons (INSERM U1192, Université de Lille) for the technical assistance in immunohistochemistry studies. This work was supported by grants from Région Nord Pas-de-Calais, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. S. Derouiche was supported by the Région Nord Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work.

REFERENCES

1. Tuxhorn JA, Ayala GE and Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 2001; 166(6):2472-2483.

2. Rowley D and Barron DA. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2012.
3. Bhowmick NA, Neilson EG and Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004; 432(7015):332-337.
4. Bhowmick NA and Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15(1):97-101.
5. Hu M and Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18(1):27-34.
6. West RB and van de Rijn M. Experimental approaches to the study of cancer-stroma interactions: recent findings suggest a pivotal role for stroma in carcinogenesis. *Lab Invest.* 2007; 87(10):967-970.
7. Grossfeld GD, Hayward SW, Tlsty TD and Cunha GR. The role of stroma in prostatic carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer.* 1998; 5:253-270.
8. Wiseman BS and Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science.* 2002; 296(5570):1046-1049.
9. Katz D. *The Release of Neural Transmitter Substances.* Liverpool University Press. 1969.
10. Burgoyne RD. Mechanisms of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells. *J Physiol Pharmacol.* 1995; 46(3):273-283.
11. Neher E and Zucker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron.* 1993; 10(1):21-30.
12. Nilius B, Owsianik G, Voets T and Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):165-217.
13. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID and Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.* 2004; 427(6971):260-265.
14. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE and Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(34):12248-12252.
15. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI and Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell.* 2006; 124(6):1269-1282.
16. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM and Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(33):13525-13530.
17. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D and Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(33):13519-13524.
18. Andersson DA, Gentry C, Moss S and Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 2008; 28(10):2485-2494.
19. Akopian AN, Ruparel NB, Patwardhan A and Hargreaves KM. Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J Neurosci.* 2008; 28(5):1064-1075.
20. Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglashan DW, Jr., Ghatta S, Carr MJ and McAlexander MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via

- direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol.* 2008; 73(2):274-281.
21. Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H and Wetzel CH. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem.* 2007; 282(18):13180-13189.
 22. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O and Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci.* 2007; 10(3):277-279.
 23. Putney JW, Jr., Broad LM, Braun FJ, Lievreumont JP and Bird GS. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 12):2223-2229.
 24. Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ and Dziadek MA. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J.* 2001; 357(Pt 3):673-685.
 25. Soboloff J, Spassova MA, Dziadek MA and Gill DL. Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763(11):1161-1168.
 26. Worley PF, Zeng W, Huang GN, Yuan JP, Kim JY, Lee MG and Muallem S. TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium.* 2007; 42(2):205-211.
 27. Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebault S, Lepage G, Parys JB, Shuba Y, Skryma R and Prevarskaya N. Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(29):30326-30337.
 28. Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphael M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, Shuba Y, Skryma R and Prevarskaya N. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* 2010; 1:e75.
 29. Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R and Prevarskaya N. Store-operated Ca²⁺ current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca²⁺ transporter type 1. *J Biol Chem.* 2003; 278(17):15381-15389.
 30. Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverberghe K, Mariot P, Skryma R and Prevarskaya N. Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium.* 2003; 33(5-6):357-373.
 31. Raphael M, Lehen'kyi V, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchik S, Vanden Abeele F, Farsetti L, Germain E, Bokhobza A, Mihalache A, Gosset P, Romanin C, Clezard P, Skryma R and Prevarskaya N. TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(37):E3870-3879.
 32. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N and Mariot P. A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium.* 2006; 39(4):357-366.
 33. Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H and Deneef C. Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology.* 1999; 140(10):4874-4885.
 34. Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackiere F, Bidaux G, Urbain R, Gosset P, Delcourt P, Fleurisse L, Slomianny C, Dewailly E, Mauroy B, Bonnal JL, Skryma R and Prevarskaya N. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene.* 2009; 28(15):1792-1806.
 35. Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M and Noguchi K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain.* 2008; 131(Pt 5):1241-1251.
 36. El Boustany C, Katsogiannou M, Delcourt P, Dewailly E, Prevarskaya N, Borowiec AS and Capiod T. Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells. *Cell Calcium.* 2010; 47(4):350-359.
 37. Derouiche S, Warnier M, Mariot P, Gosset P, Mauroy B, Bonnal JL, Slomianny C, Delcourt P, Prevarskaya N and Roudbaraki M. Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling. *Springerplus.* 2013; 2(1):54.
 38. Xie J, Pan H, Yao J, Zhou Y and Han W. SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives. *Int J Cancer.* 2016; 138(9):2067-2077.
 39. Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G, Slomianny C, Borowiec AS, Bidaux G, Benahmed M, Shuba Y and Prevarskaya N. Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell.* 2014; 26(1):19-32.
 40. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R and Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene.* 2007; 26(52):7380-7385.
 41. Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Slomianny C, Beck B, Mariot P, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Capiod T, Skryma R and Prevarskaya N. Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res.* 2006; 66(4):2038-2047.
 42. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, Roudbaraki M, Mauroy B, Wuytack F and Prevarskaya N. Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell.* 2002; 1(2):169-179.
 43. Chen YF, Chiu WT, Chen YT, Lin PY, Huang HJ, Chou CY, Chang HC, Tang MJ and Shen MR. Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(37):15225-15230.
 44. Yang S, Zhang JJ and Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell.* 2009; 15(2):124-134.
 45. Li J, Cubbon RM, Wilson LA, Amer MS, McKeown L, Hou B, Majeed Y, Tumova S, Seymour VA, Taylor H, Stacey M, O'Regan D, Foster R, Porter KE, Kearney MT and Beech DJ. Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation. *Circ Res.* 2011; 108(10):1190-1198.
 46. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R and Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science.* 2006; 312(5777):1220-1223.
 47. Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O and Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature.* 2006; 443(7108):226-229.

48. Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG and Rao A. Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem.* 2007; 282(22):16232-16243.
49. Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R and Kinet JP. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol.* 2006; 8(7):771-773.
50. Peel SE, Liu B and Hall IP. ORAI and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 38(6):744-749.
51. Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech D, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L and Ambudkar IS. Attenuation of store-operated Ca²⁺ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(44):17542-17547.
52. Liu X, Wang W, Singh BB, Lockwich T, Jadlowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu MX and Ambudkar IS. Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem.* 2000; 275(5):3403-3411.
53. Brandman O, Liou J, Park WS and Meyer T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell.* 2007; 131(7):1327-1339.
54. Parvez S, Beck A, Peinelt C, Soboloff J, Lis A, Monteilh-Zoller M, Gill DL, Fleig A and Penner R. STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *FASEB J.* 2008; 22(3):752-761.
55. Berna-Erro A, Braun A, Kraft R, Kleinschnitz C, Schuhmann MK, Stegner D, Wulsch T, Eilers J, Meuth SG, Stoll G and Nieswandt B. STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal.* 2009; 2(93):ra67.
56. Lis A, Peinelt C, Beck A, Parvez S, Monteilh-Zoller M, Fleig A and Penner R. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol.* 2007; 17(9):794-800.
57. Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS and Putney JW, Jr. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem.* 2006; 281(34):24979-24990.
58. Park CY, Shcheglovitov A and Dolmetsch R. The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science.* 2010; 330(6000):101-105.
59. Wang Y, Deng X, Mancarella S, Hendron E, Eguchi S, Soboloff J, Tang XD and Gill DL. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science.* 2010; 330(6000):105-109.
60. Albarran L, Lopez JJ, Dionisio N, Smani T, Salido GM and Rosado JA. Transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) modulates store-operated Ca(2+) entry by regulation of STIM1-Orai1 association. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(12):3025-3034.
61. Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L and Premkumar LS. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One.* 2012; 7(5):e38005.

Article 3

The involvement of ion channels in HGF/c-Met-mediated epithelial stromal interactions and prostate cancer cells migration

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Pascal Mariot, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Lucile Noyer, Marine Warnier, Alexandre Bokhobza, Christian Slomianny, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Emilie Desruelles, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki

Manuscrit en cours de soumission

Dans les études précédemment décrites, nous avons mis en évidence le rôle du canal TRPA1 exprimé par les CAFs prostatiques, dans la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF suivant une entrée importante de Ca^{2+} dans la cellule. Nous avons également montré que l'HGF ou le milieu conditionné des CAFs induisait la chimiorésistance au niveau des cellules tumorales.

Dans les stades avancées de CaP, le récepteur à l'HGF, le récepteur c-Met, est surexprimé (Pisters *et al.*, 1995). Par ailleurs, il a été démontré que le taux d'HGF sanguin est augmenté chez les patients atteints de cancers prostatiques en phase d'androgéno-réfractaire et présentant des métastases. Comme nous venons de voir, les CAF, l'un des composants du stroma réactif, peuvent constituer une source de la libération d'HGF. Les voies de signalisation induites par l'HGF *via* l'activation de son récepteur c-Met sont connues pour favoriser la progression tumorale et les métastases dans de nombreux cancers dont celui de la prostate. En effet, des taux élevés d'HGF dans le sang sont systématiquement observés chez les patients atteints de CaP ayant métastasé contrairement à des patients qui présentant un cancer localisé (Gupta *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2009). De plus, les voies de signalisation mises en place par l'axe HGF/c-Met constitue un des mécanismes communs de résistance des cellules tumorales contre les thérapies ciblées (Yu *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2015). Ceci suggère la nécessité d'étudier les différentes voies de signalisations de l'axe HGF/c-Met induites au niveau des cellules cancéreuses prostatiques. Ceci permettrait de mettre en évidence de nouvelles cibles également au niveau des cellules épithéliales cancéreuses permettant de bloquer l'impact de l'axe HGF/c-Met. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les canaux ioniques sont connus pour être impliqués dans la plupart des processus impliqués dans la cancérogenèse dans de nombreux tissus. Cependant, très peu d'études se sont intéressées au lien existant entre les voies de transduction mises en place par l'HGF et les canaux ioniques.

Dans ce contexte, nous avons étudié pour la première fois, l'impact de l'HGF sécrété par les CAFs prostatiques sur les cellules épithéliales tumorales prostatiques et l'implication des canaux ioniques dans les effets induits par ce facteur de croissance.

Par des expériences de test de blessure et en utilisant la technique de la chambre de Boyden, nous avons montré que le milieu conditionné (MC) des CAFs prostatiques issus des cultures primaires et l'HGF favorisaient la transition épithélio-mésenchymateuse (l'EMT) et la migration des cellules épithéliales tumorales. De manière intéressante, cette EMT induite par l'HGF et le MC des CAFs s'accompagnait d'un remodelage de l'expression des canaux calciques (Orai1) et des canaux potassiques calcium-activés (IK_{Ca} et SK3 et BKCa). Cette surexpression des canaux ioniques était accompagnée d'une amplification de l'entrée calcique (SOCE) et une augmentation de la migration cellulaire. En effet, les canaux potassiques sont bien connus pour moduler la signalisation calcique en modulant le potentiel de membrane, leur ouverture augmentant la force électro-motrice de Ca²⁺ afin de favoriser l'entrée calcique *via* des canaux calciques voltages-indépendants dans la cellule et ceci, afin de promouvoir les effets biologiques comme la migration et la prolifération cellulaire (Lallet-Daher *et al.*, 2009; Flourakis *et al.*, 2010). Parmi les canaux ioniques dont l'expression est modulée par l'HGF, nous avons examiné l'intervention du canal potassique calcium-activé SK3 et le canal perméable au calcium Orai1 dans la modulation du SOCE et la migration cellulaire induites par l'HGF au niveau des cellules cancéreuses prostatiques DU145. Ces canaux ioniques (SK3 et Orai1) sont connus dans d'autres cellules cancéreuses pour former un complexe moléculaire et fonctionnel et favoriser la migration cellulaire. Dans nos études, l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de ces canaux ioniques (SK3, apamine ; Orai1, SKF96365 et BTP-2) ou la technologie des ARN interférents (siSK3, siOrai1), nous avons montré que le canal potassique SK3 et le canal perméable au calcium Orai1 intervenaient dans la modulation du SOCE et la migration induits par l'HGF ou le sécrétome des CAFs. Enfin, par des études d'immunohistochimie, nous avons caractérisé pour la première fois l'expression du canal potassique SK3 dans les cancers prostatiques au niveau des cellules épithéliales cancéreuses alors que son expression est absente au niveau des CAF de ces cancers.

Ainsi, nos travaux montrent bien l'importance de cibler les canaux ioniques dans le cadre du cancer ciblant à la fois (1) le canal TRPA1 des CAFs afin d'empêcher la sécrétion de facteurs de croissance comme nous l'avons précédemment montré, et (2) ceux des cellules épithéliales tumorales dont l'EMT induite par l'HGF entraîne un remodelage de l'expression avec pour conséquences une amplification de la signalisation calcique et de la migration cellulaire potentiellement favorables à la formation de métastases.

Contributions : Hormis les expériences d'immunohistochimie réalisées en collaboration avec l'équipe du professeur Pierre Gosset (Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille), j'ai effectué toutes les expériences décrites dans ce papier sous la supervision du professeur Morad Roudbaraki. Pour certaines parties, dans le cadre des préparations des outils (des plasmides d'expressions, certaines expériences de western blot), j'ai eu recours à l'aide précieuse des techniciens du laboratoire que je remercie vivement.

The involvement of ion channels in HGF/c-Met-mediated epithelial stromal interactions and prostate cancer cells migration

Eric Vancauwenberghe¹, Sandra Derouiche¹, Pascal Mariot¹, Loïc Lemonnier¹, Pierre Gosset², Lucile Noyer¹, Marine Warnier¹, Alexandre Bokhobza¹, Christian Slomianny¹, Etienne Dewailly¹, Philippe Delcourt¹, Laurent Allart¹, Emilie Desruelles¹, Brigitte Mauroy^{1,3}, Jean-Louis Bonnal^{1,3}, Natalia Prevarskaya¹ and Morad Roudbaraki^{1,‡}.

Affiliations:

1. Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

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

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

Running title: TRPA1 and prostate cancer tumor microenvironment

Running title: HGF-induced prostate cancer cells migration involves ion channels

[‡]To whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003

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

Fax: (33) 3 20 43 40 66

Phone: (33) 3 20 33 64 23

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

ABSTRACT

Tumor microenvironment is known to impact the different process involved in carcinogenesis. Carcinomas are composed of two interdependent components: the neoplastic epithelial cells and the supporting tumour stroma including cancer associated fibroblasts (CAF). Stromal-epithelial cell interaction is important in the maintenance and growth of benign and malignant prostatic epithelial cells. The cancer stroma plays decisive roles on epithelial cells for their growth, migration/invasion and their resistance to apoptosis via secretion of growth factors including Hepatocyte Growth Factor (HGF). The HGF/c-Met axis is amplified in prostate cancer and is associated to cancer metastasis. We and others have previously shown that ion channels are involved in growth and migration of prostate cancer cells. However, the implication of ion channels in the effects of HGF on epithelial cells is still unknown. Here, for the first time, we investigated the impact of the microenvironment factor CAF-derived factor HGF on human PCa epithelial cells and involvement of ion channels in the effects of the growth factor. We showed that conditioned media from primary cultured PCa CAF and HGF promoted PCa cells migration by inducing an epithelial mesenchymal transition (EMT). The HGF-induced EMT was accompanied by a remodelling of calcium and potassium

channels expression. The HGF-induced calcium and potassium channels amplified calcium signalling in these cells and were involved in their migration induced by the growth factor. Taken together, our data suggest that ion channels could constitute potential targets in tumor microenvironment to bloc the effects of HGF on prostate cancer cell migration and metastasis

Keywords

Prostate cancer, Hepatocyte Growth Factor, HGF, EMT; ion channels, SK3, Orai1, IKCa1, Snai1

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the major causes of cancer-related death in men in western countries. Chemotherapies coupled with androgen-deprivation therapy (ADT) to prevent androgens from binding to the androgen receptor (AR) have been the norm for prostate cancer treatment over recent decades. Despite an early success in suppressing prostate tumor growth, in some cases the emergence of hormone-refractory cancer cells leads to tumor growth in a hormone-refractory manner and associated with an increased risk of metastasis. There is thus an urgent need to

investigate the mechanisms of metastasis in order to design new therapeutic targets.

Carcinomas are composed of two interdependent components: the neoplastic epithelial cells and the supporting tumour stroma. The latter plays decisive roles in pivotal processes such as tumor cell proliferation, invasion and tumor vascularization [1-3] *via* the secretion of growth factors and cytokines. The stromal cells secrete cytokines and growth factors including the angiogenesis promoting factor vascular endothelial growth factor (VEGF), the fibroblast growth factor (FGF) and hepatocyte growth factor (HGF). These stromal secreted factors such as HGF targeting the prostate cancer cells might contribute to the cancer cells proliferation, migration and metastasis and to the resistances chemotherapeutic agents. HGF is shown to be abundantly expressed and secreted in the tumor microenvironment and is known to promote proliferation and epithelial cell motility. In addition, high circulating HGF levels are associated with lower survival and development of distant metastasis, and increases in circulating HGF are correlated with tumor size, nodal status, and histological evidence of venous invasion [4, 5].

These data suggest that HGF plays a critical role during cancer migration and metastasis.

These effects on cancer cells are mediated *via* the c-Met receptor which is also overexpressed in prostate cancer and further increased in expression in bone metastasis and is associated with the development of castrate-resistant PCa disease. Because of its importance as a target, c-Met inhibitors have reached clinical trial for advanced castrate-resistant prostate cancer [6]. Binding of HGF to c-Met leads to receptor dimerization and autophosphorylation resulting in the activation of multiple cellular pathways that support cancer progression. Thus, inhibiting c-Met in cancer cells and/or the secretion of HGF in combination with other approaches in the tumor microenvironment could significantly improve the success of therapies. Indeed, a growing number of studies have demonstrated the importance of deciphering the relationship between epithelial tumor cells and their microenvironment in order to improve available chemotherapeutics treatments. In this regard, the study of the impact of HGF on prostate cancer cells and the identification of the mechanisms and actors involved in its effects might provide new targets in the PCa chemotherapies and/or PCa treatments in general. An important aspect of tumor cell evolution is their metastasis, which is the major cause of death from PCa. Invasion of surrounding tissue and vasculature by cancer cells is an initial step in tumor metastasis. Accumulating data show that HGF induces cancer cells migration and metastasis (for review, see [7]). Recent data show that one of the mechanisms involved in the induction of cells

migration is Epithelial–mesenchymal transition (EMT). EMT is a process by which epithelial cells undergo phenotypic transition to mesenchymal cells [8] process, epithelial cells downregulate the expression of cell adhesion molecules including E-cadherin, dissolve cell–cell junctions, lose their apical–basal polarity, deposit ECM proteins, and acquire migratory and invasive behavior. EMT occurs during normal embryonic development in response to physiologic signals [9], whereas in the adult, EMT is induced in pathological states such as cancer and organ fibrosis. In cancer, tumor cells become more invasive after undergoing EMT and access the blood vessel through intravasation, resulting in distant metastasis [10, 11], the major cause of death from cancer. Indeed, loss of E-cadherin expression, which is considered a hallmark of EMT [12], was found to be an independent prognostic factor in cancer patients [13, 14].

Engagement of HGF with c-Met leads to activation of numerous signaling cascades, especially those related to invasion and properties of epithelial to mesenchymal transition (EMT) activation (for review, see [7]). However, the impact of EMT on ion channels' expression and functionality is poorly studied in general and particularly in prostate cancer cells.

Ion channels are integral membrane proteins that form a pore to allow the passage of specific ions by passive diffusion. A rise in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) due to Ca^{2+} influx through the membrane Ca^{2+} channels is known to be involved in exocytosis [15-17], cell proliferation, cell migration and invasion (for review, see [18]). Cell migration is a central component of the metastatic cascade requiring a concerted action of ion channels and transporters (migration-associated transportome), cytoskeletal elements and signalling cascades. Ion transport proteins contribute to tumour cell migration and invasion among other elements by inducing local volume changes and/or by modulating Ca^{2+} and H^+ signalling (for review, see [19]). Targeting cell migration therapeutically bears great clinical potential, because it is a prerequisite for metastasis. Ion transport proteins appear to be attractive candidate target proteins for this purpose because they are easily accessible as membrane proteins and often overexpressed or activated in cancer. In cancers, the alterations in Ca^{2+} homeostasis due to the modulation of ion channels expression and activity can be essential in the carcinogenesis and/or its progression by modulating processes including cell growth, differentiation, migration or secretion. In this context, accumulating data show that cell proliferation, apoptosis and migration are paralleled by an altered function and/or expression of ion channels involved in the signalling of fundamental cellular mechanisms [20, 21]. A

ubiquitous Ca^{2+} influx pathway that is activated by intracellular Ca^{2+} store depletion is store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), which is activated through a complex interplay between a Ca^{2+} channel at the cell membrane, Orai1, and a Ca^{2+} sensor located in the endoplasmic reticulum, STIM1 [22]. Recently, a number of known molecular players in cellular Ca^{2+} homeostasis, including Orai1, STIM1 and transient receptor potential (TRP) channels have been implicated in tumor cell migration and the metastatic cell phenotype (for review *see* [21]). In this context, we previously showed that TRPC1, TRPV6 and Orai1 are the main actors in SOCE in human PCa cells LNCaP [23-25]. In addition, in non-excitabile cells, potassium channels facilitate the agonist-induced calcium entry via plasma membrane non-voltage-dependent calcium channels by hyperpolarizing the membrane potential and by increasing the electromotive force for the calcium. Potassium channels are shown to be essential for cell proliferation and migration and appear to play a role in carcinogenesis [26, 27]. Among the known K^+ channels, EAG1, a member of the ether-a-go-go (EAG) subfamily, has been studied in greatest detail, as it has been found to have an oncogenic potential in several human cancers [27-29]. However, Ca^{2+} -dependent potassium channels (K_{Ca}) are also involved in cancer-related mechanisms and are attracting increasing attention [30, 31]. Intermediate- and short conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels IK_{Ca1} (also called IK1, SK4, hSK4, hKCa4 and KCa3.1) and SK3 (are of particular interest, as their expression has been shown to increase in activated T lymphocytes [30], pancreatic cancer cells [32], prostate cancer [33] and undergo modulation during the cell cycle in breast cancer cells [34]. Interestingly, our previous works showed that calcium-activated potassium channels (IKCa1) and calcium channels (TRPV6) form molecular and functional complexes to promote calcium entry and prostate cancer cells proliferation [33]. Similar data were also obtained for SK3 potassium channels and Orai1 calcium channels where the complex was involved in cancer cells migration [35, 36].

Growth factors released by CAF in the tumor microenvironment such as HGF could impact PCa metastasis by inducing a modulation of the ion channels expression and/or functionality to promote cell migration. However, data on the relation between the effects of HGF on human prostate cancer cell migration and ion channels are lacking.

Here, for the first time, we investigated the impact of the microenvironment factor HGF on human PCa epithelial cells. We showed that HGF promoted PCa cells migration by inducing an epithelial mesenchymal transition (EMT). The HGF-induced EMT was accompanied by a remodelling of calcium and potassium channels

expression. The HGF-induced calcium and potassium channels amplified calcium signalling in these cells and were involved in their migration induced by the growth factor. Taken together, our data suggest that ion channels could constitute potential targets in tumor microenvironment to block the effects of HGF on prostate cancer cell migration and metastasis

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and antibodies

All chemicals, agonists and growth factors were from Sigma-Aldrich. Hepatocyte Growth Factor (HGF) was dissolved in PBS with 0.1% BSA and conserved at -20°C and then diluted to the desired concentration on the day of the experiments. Antibodies were from commercial sources as follows: mouse anti-E-cadherin (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Snai1 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-N-Cadherin (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Zeb1 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti- α -actin (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-vimentin (Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti-Orai1 (ProSci Inc.), Rabbit anti-STIM1 (ProSci Inc.), Rabbit anti-TRPC1 (Alomone Labs), Rabbit anti-TRPV6 (Santa Cruz Biotechnology) and Rabbit anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Cell lines

DU145, LNCaP and PC-3 prostate cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured as previously described (Gackière et al., 2006)[37].

Tissue specimens and primary cancer associated fibroblasts (CAF) cultures

Human PCa biopsies were obtained from consenting patients following local ethical considerations. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number 'CP 01/33', issued by the 'Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille'. A portion of prostate tissue suspected of carcinoma was incised, and one half of the sliced tissue was submitted for immediate microscopic examination on cryostat sections. After establishment of the diagnosis of adenocarcinoma, the remaining half of the tissue was used for primary culture. The tissue was cut into multiple minute cubes, placed on a plastic surface, and grown in Phenol-red-free RPMI 1640 containing charcoal-stripped Fetal Calf Serum (FCS) (CS-RPMI) (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). As soon as outgrowths formed

around the tissue fragments, cells were trypsinized and cultured for preparation of the conditioned media for ELISA assays and DU145 incubation assays and for their characterization (α -actin and vimentin expressions) by RT-PCR and by immunofluorescence.

Prostate tissue and cells staining studies

The protein expression studies of the ion channels in PCa cells and tissues was determined either by immunofluorescence or by immunohistochemistry staining performed on 2% paraformaldehyde (PFA)-fixed cells and 3,7% formalin-fixed paraffin embedded tissues (FFPE) as previously described[33]. In immunohistochemistry stainings, the tissues slides were counterstained with hematoxylin to visualize the nuclei and mounted. In immunofluorescence studies, the nuclei were stained in blue by DAPI. The stained tissues and cells were then analysed either by confocal microscopy (Zeiss LSM 700; acquisition parameters: objective 40x/1.3 thickness of confocal slide, 1 μ m) or under phase contrast microscopy.

Cell migration assays

Cell migration assays were performed in duplicate in modified Boyden chambers. These assays consisted in counting cells migrating through a porous membrane with 8 μ m pores (BD Biosciences, Oxford Science Park, Oxford, UK). After trypsinization, DU145 cells in suspension (5×10^4) were loaded into the upper chamber in RPMI/FCS medium (RPMI and 10% FCS medium). The lower chamber contained also RPMI/FCS medium. The upper and lower chambers contained the same concentrations of inhibitors when tested but HGF was added only in the upper chamber when necessary. After 16 h to 24 h at 37°C in a 5% CO₂ incubator, cells that had attached but not migrated were scraped from the upper surface, the membranes were fixed in 70% methanol at -20°C and the migrated cells were stained for nuclei with Hoechst 33342 dye (1 μ g/mL) (blue fluorescent) and evaluated by counting cell nuclei in 10 randomly chosen fields under fluorescence microscopy. The results are presented as a percentage of control (CTL), where cells were incubated in RPMI/FCS culture medium alone. Alternatively, the Wound Healing Assay was also used to study PCa cell migration. The cells were seeded in a 12-well plate (15×10^4). After the DU145 cells formed a confluent monolayer, scratches were performed using a 100 μ l tip. The wells were washed with PBS followed by the addition of CAF conditioned medium or HGF at different concentrations in the presence or absence of inhibitors. The closure of scratch was analyzed under the microscope and images were captured 1 and 15 or 24 h after incubations.

For cell migration assays in co-cultures, prostate cancer primary cultured CAF (lower chamber) and DU145 cells (upper chamber) were seeded in 24-well plates separated by an insert with pores of 8 μ m diameter in order to study the impact of CAF cells on the migration of DU145 cells. For this, first, CAF were seeded at 70% of confluence in lower chamber and incubated for 24 hours. Then, the DU145 cells (50000/well) were added in upper chamber. Cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, pretreated or not with inhibitors for 24h then processed as described above.

RT-PCR analysis of mRNA expression

Total RNA isolation and RT-PCR experiments were performed as described earlier [38]. The PCR primers used in the present study were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Eurogentec (Angers, France) and are follows: HGF: 5'-TACTGCAGACCAATGTGCTA-3' and 5'-GAATTTGTGCCGGTGTGGTG-3' (541 bp); c-met: 5'-GGAGCCAAAGTCCTTTTCATC-3' and 5'-CTTGCTGACATACGCAGCCT-3' (433 bp); KCNN3/SK3/K_{Ca}2.3: 5'-GTGCTCTTGGITTTTAGTATCTCG-3' and 5'-CAACCTGCACCCATTATTCC-3'; (483 bp); Orail: 5'-CTTCTTCGACCTCGTCCTCCT-3' and 5'-CGTAAGGCCAAAGCATGGAA-3' (406 bp); β -actin : 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' and 5'-GTTGAAGGTCTCAAACATGATC-3' (212 bp) used in this study were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The amplified PCR products were of 406 and 212 bp respectively. For semiquantitative PCR, the cDNA of different markers was amplified along with either β -actin cDNA as internal control. The image density of the PCR products was compared with the density of β -actin in order to determine the mRNA expression ratio of the markers in each sample studied. Then, the ratios were compared to control sample by setting the ratio value for control cells to 1.

Cell transfections

For siRNA experiments, equal numbers of cells from the same culture were seeded, transfected overnight either with 25 nM of control siRNA (targeting Luciferase mRNA) (Eurogentec, Angers, France), or with siRNA raised against SK3 potassium channel or Orail calcium channel mRNA. The Hiperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) was used to transfect the cells according to the manufacturer's instructions. The medium was changed 24 h after transfections and cells were incubated for a further 24h before performing experiments. The target sequences for siRNA used in this study are: siSK3:

5'-CCAUUCCUGGCGAGUACAA(dTdT)-3';
siOrai1:5'-UGAGCAACGUGCACAUCU
(dTdT)-3'. The efficiency of the siRNA was
validated by RT-PCR and by Western Blot studies.
Alexa Fluor Red Fluorescent Control siRNA was
used to optimize the transfection conditions.

Western Blot Assay

PCa epithelial cells (LNCaP, DU145 and PC-3)
cells were cultured at 80% confluence and total
proteins were extracted. 10 to 40 μ g of each
sample were analysed by SDS-PAGE on either 6%
or 10% acrylamide gel and processed for western-
blotting using different markers or β -actin
(1/1000e) antibodies as described previously[33]
and revealed by the ECL chemiluminescence kit
(Millipore, France). For the comparison of the
protein expression levels in different samples,
normalizations were performed by using the image
density analysis of the protein bands the β -actin
protein expression as an internal standard. Then,
the ratios were compared to control sample by
setting the ratio value for control cells to 1.

Calcium imaging experiments

The Calcium imaging experiments were performed
as previously described[33] using Fura-2/AM as a
calcium dye. To represent the variation in $[Ca^{2+}]_i$,
the fluorescence intensity ratio represented by
F340/F380 was used as an indicator of changes in
cytosolic Ca^{2+} concentration. Each experiment was
performed on 35–45 cells in duplicate and
repeated at least four times on different cell
cultures and a representative figure is presented.
For the quantifications of the amplitude of the
calcium entries, the measures are done at the pic
levels in different experimental conditions and
compared between them.

Preparation of PrSC conditioned medium

Prostate cancer Stromal cells (CAF) (5×10^5 cells
per condition) were cultured in RPMI 1646
supplemented with 10% FCS, for 24–72h
according to experiments. Culture media were
collected, centrifuged and then used for ELISA
assays or incubated with DU145 to study the
impact of stromal cells secreted factors on DU145
cells.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PrCSC (5×10^4 cells) were incubated in CS-RPMI
supplemented with 0.5 or 10% FCS, with or
without TRPA1 inhibitor or activator for 24 and
48h, in 12-well plates at 80% of confluence. The
supernatants of the cell cultures were then
withdrawn, centrifuged and a HGF immunoassay
kit (Abcam, Paris, France) was used for HGF
detection according to the manufacturer's
instructions.

Statistical analysis

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

RESULTS

HGF in conditioned media from CAF induces PCa cells scattering

We first carried out *in vitro* studies using primary
cultured stromal cells from prostate cancer tissues
(Cancer-Associated Fibroblasts, CAF). For each
primary cultured cell population, we first
characterized the CAF originated from patients for
the expression of fibromuscular cells markers by
immunofluorescence studies using antibodies
raised against α -actin and vimentin. We observed
in our cultures three types of cells in a different
proportion depending on primary cell culture
origin: fibroblasts expressing vimentin, smooth
muscle cells expressing both markers and smooth
muscle cells expressing only α -actin protein.
Depending on patient the culture originated from,
the myofibroblasts ranged from 50 to 95% of the
total cell populations. We further performed
ELISA assays for growth factors HGF and VEGF
detection in conditioned media from CAF issued
from 5 different patients. As shown in [Figure 1A](#),
and [1B](#), different rates of HGF and VEGF
secretions were observed for the cells originated
from different PCa patients. We further examined
by RT-PCR the expression of HGF and its receptor
c-Met in CAF and in different PCa epithelial cells
DU145, PC-3 (androgen-insensitive cells) and
LNCaP (androgen-sensitive cells). As shown in
[Figure 1C](#), HGF is expressed only in CAF cells
and the c-Met receptor in androgen-insensitive
cells DU145 and PC-3. HGF is known to induce
cell scattering in different cell systems expressing
c-Met receptor including PCa cells [39]. As shown
in the schematic presentation in [Figure 1D](#), when
the conditioned media from different CAF were
incubated with PCa epithelial cells DU145, a cell
scattering was observed with an elongated
morphology of DU145 cells. The DU145 cell
scattering observed after exposition to the
conditioned media from patient 4 is shown in
[Figure 1E](#). However, the rate of cell scattering
depended to the CAF cells conditioned media,
probably in relation to the rate of HGF released by
the cells of each patient. Interestingly, when

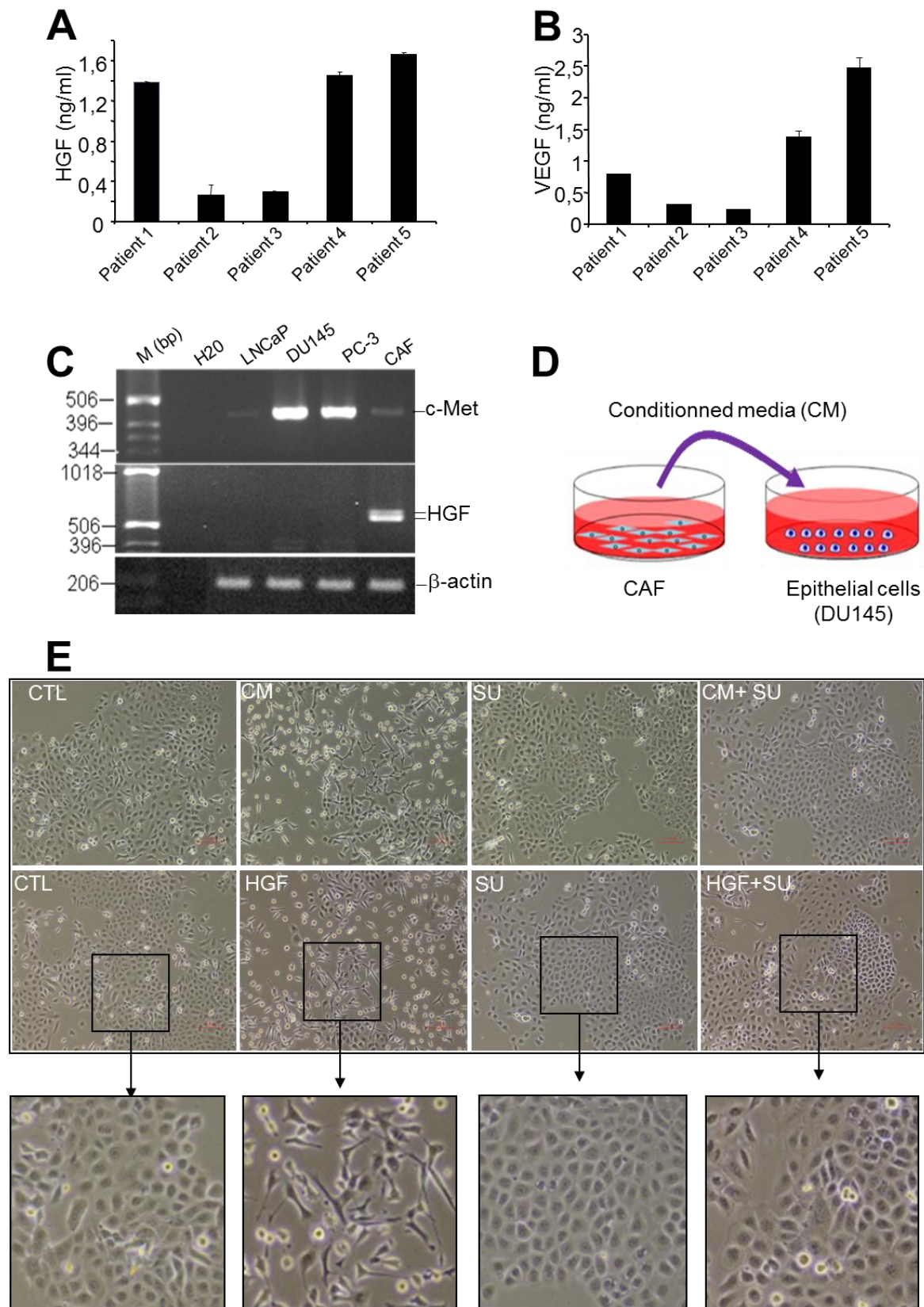


Figure 1: HGF in conditioned media from CAF induces PCa cells scattering

ELISA assays were performed for HGF (A) and VEGF (B) secretions in conditioned media (CM) from 5 primary-cultured CAF from five PCa patients. CAF (5×10^4 cells/sample) were incubated for 24h in 10% FBS. Then, ELISA assays for HGF and VEGF secretions were realized on 24h cells conditioned media.

(C) Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed to study the expression of HGF and its receptor c-Met mRNA using specific primers in prostate cancer epithelial cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3) and in a primary-cultured CAF cells.

(E) The morphological modifications DU145 cells incubated with PCa CAF CM and HGF were studied. (E) As described in D, the CAF cells were incubated for 48h in RPMI1640+10% FBS. Then the conditioned medium was diluted two times and added to DU145 cells and incubated for a further 24-48h. The cells were then analyzed under the microscope and images were captured 24 and 48 h after incubations. The images after 48h of incubations are presented here.

DU145 cells were co-exposed to patient 4 conditioned media and SU11274, an inhibitor of c-Met receptor, the CM-induced cell scattering was completely inhibited, suggesting that the CM-induced cell scattering was due to the HGF/c-Met pathway. To confirm these observations, DU145 cells were exposed to different concentrations of HGF (0,1 to 50 ng/ml) for 48h and then examined under contrast microscopy. In these experiments, we observed a dose-dependent induction of cell scattering by HGF, as shown in [Figure 1F](#) for a concentration of 20 ng/ml. Taken together, these experiments show clearly that the HGF in the CM from CAF induces cell scattering in PCa epithelial cells.

HGF and CAF CM induces an epithelial to mesenchymal transition (EMT) in DU145 cells

One of the mechanisms involved in HGF-induced cell scattering is Epithelial to mesenchymal transition (EMT). EMT is a fundamental cell differentiation/dedifferentiation process which is associated with dramatic morphological changes. Formerly polarized and immobile epithelial cells which form cell junctions and cobblestone-like cell sheets undergo a transition into highly motile, elongated, mesenchymal cells lacking cell-to-cell adhesions. This transition is accompanied by a decrease of E-Cadherin protein and an increase in mesenchymal cell markers like N-Cadherin protein and Snail, Zeb and Twist transcription factors. To study whether HGF induced an EMT in DU145 cells, the expression of E-Cadherin and Snail transcription factor was studied in DU145 cells under HGF treatments for 24h.

As shown in [Figure 2A](#), HGF (20 ng/ml) induced a down-regulation of E-Cadherin and an increase in Snail1 expression, the effects suppressed by the c-Met inhibitor SU11274 (5 μ M). In the same manner, when DU145 cells were incubated with CAF CM, a down-regulation of E-Cadherin protein and an up-regulation of Snail were observed. These effects of conditioned media were suppressed by the c-Met inhibitor SU11274 (5 μ M), suggesting that the observed effects on DU145 cells under CAF CM are due to the activation of c-Met by HGF present in the CAF CM ([Figure 2A](#)).

The remodeling the E-cadherin and Snail was also studied by immunofluorescence by using the specific antibodies in DU145 cells incubated either in the presence of HGF (20 ng/ml) or CAF CM for

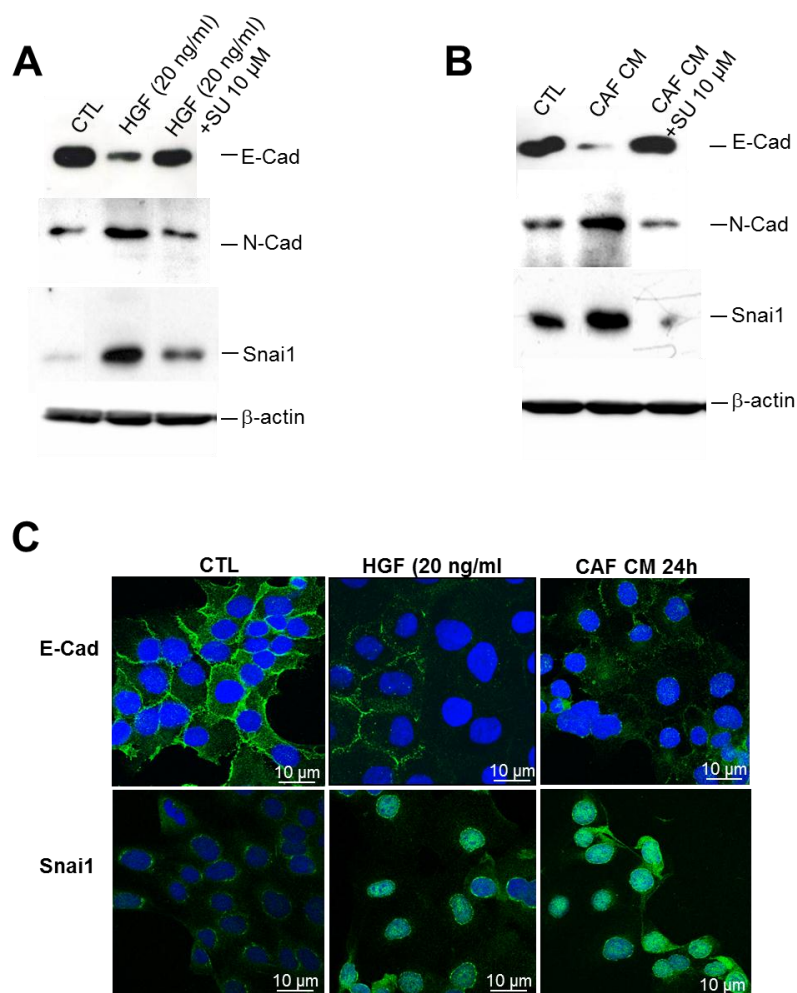


Figure 2: HGF and CAF CM induces an epithelial to mesenchymal transition (EMT) in DU145 cells

Western blotting and immunofluorescence techniques were used to study whether HGF or CAF conditioned media induced an EMT in DU145 cells, the expression of E-Cadherin and Snail transcription factor was studied in DU145 cells under HGF (20 ng/ml) or CAF conditioned media treatments for 24h. (A) Following the 24 h treatments, total proteins were extracted and 20 μ g proteins were analysed on 6 to 15% acrylamide gel (SDS-PAGE), then transferred to PVDF membranes. Immunoblots were then performed as described in *Methods* for the detection of E-Cadherin and Snail proteins.

(B) The remodeling the E-cadherin and Snail was also studied by immunofluorescence by using the specific antibodies in DU145 cells incubated either in the presence of HGF (20 ng/ml) or CAF CM for 24h.

24h. As shown in [Figure 2C](#), HGF and CAF CM induced a down-regulation of E-cadherin and an up-regulation of Snail1. Interestingly, we observe that in Snail1 to the DU145 cells nuclei, a process promoting the action of Snail on addition to the up-regulation of Snail1, HGF and CAF CM induced also a translocation of the E-cadherin promoter to down-regulate the expression of this protein.

CAF conditioned media and HGF induce the cell migration of androgen-independent prostate cancer cells DU145

In the present work, we showed that HGF and CAF CM via HGF induce EMT in human PCa cells. As EMT is known to promote cell migration and invasion that leads to tumour cell dissemination, we next studied the impact of HGF and CAF CM on the migration capacities of DU145 cells. After trypsinization, the cells were incubated grown to confluency. The cells were then wounded using a sterile tip and incubated in the corresponding media for an additional 18h

before microscopic examinations of the wound healing of the cells. As shown in Figure 3A, these *in vitro* scratch tests of DU145 cells showed an increase in cell wound closure in response to HGF, suggesting the induction of cell migration by HGF in the androgen-independent PCa cell line DU145. The HGF-induced wound closure was inhibited by the c-Met inhibitor SU11275, suggesting the involvement of c-Met receptor in HGF-induced wound healing in DU145 cells. In the same manner, an increase in wound healing was observed when DU145 cells were incubated with CAF CM (Figure 3B). The inhibition of the wound

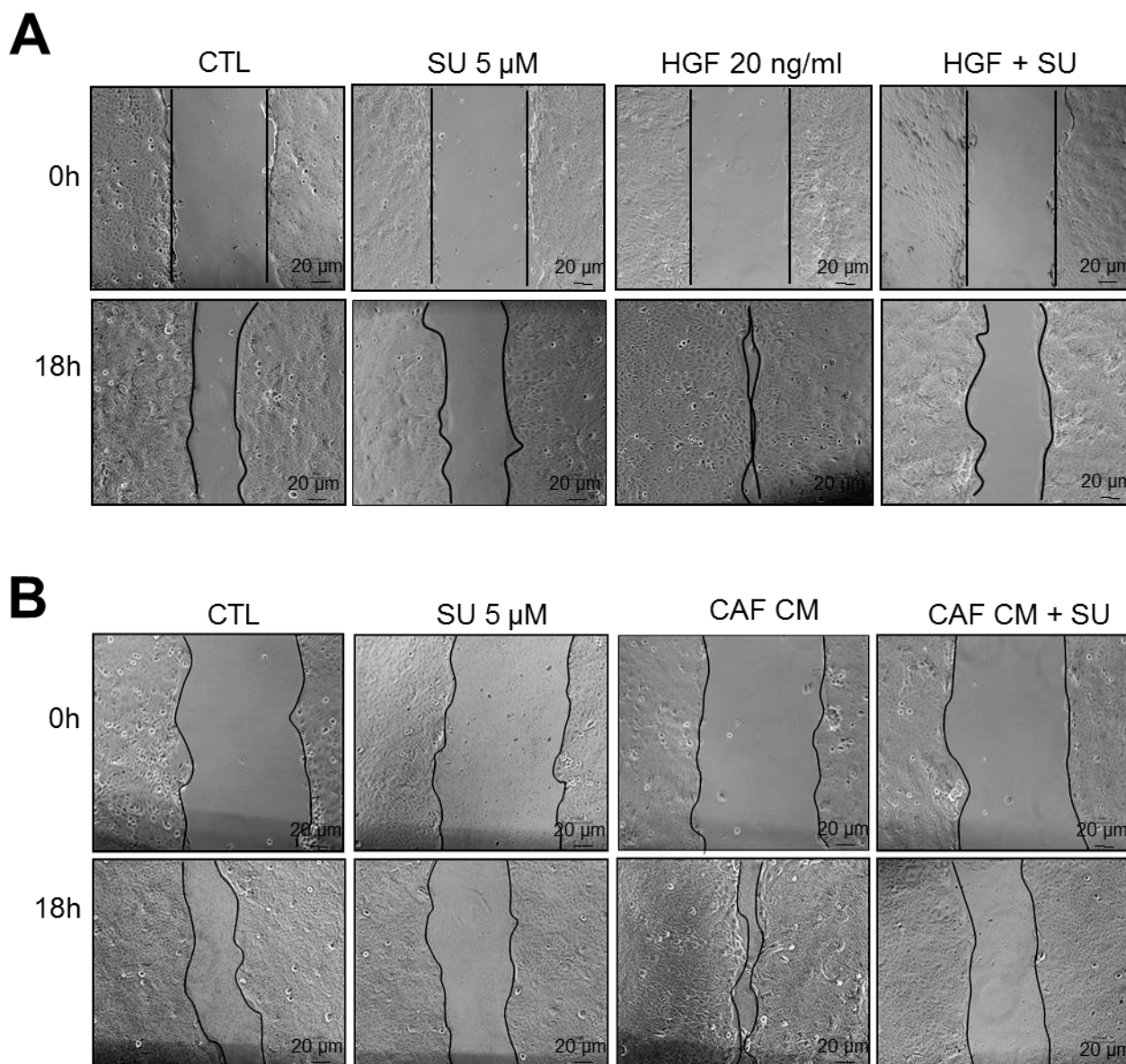


Figure 3: CAF conditioned media and HGF induce the cell migration of androgen-independent prostate cancer cells DU145. Cell migration was studied via the *in vitro* wound-healing assay. The DU145 cells grown to confluent monolayers were incubated wounded using a sterile tip and incubated in presence or absence (CTL) of either HGF (A) or CAF CM in the presence or absence of c-Met inhibitor SU11267 (SU) for an additional 18 h before the microscopic examinations of the wound-healing of the cells. Wound-healing was examined 0 and 18 hours after scratching, in at least 3 different previously identified fields per scratch to compare their migratory ability between different conditions (CTL, HGF, CAF CM, in the presence or absence of SU). Images are representative of three independent experiments and representative figures for each condition are presented here.

healing by CAF CM by the c-Met inhibitor SU11275 suggests that the CAF CM-induced cell migration involves the activation of c-Met receptor probably by HGF contained in the CM (Figure 3B). As HGF appears to be the main actor in the induction of EMT and cell migration in PCa cells DU145, in the following works, we used HGF to determine the molecular remodelling induced in EMT to promote cell migration.

HGF induces a remodelling of ion channels and calcium signalling in PCa cells

Several studies have shown that an increase in intracellular calcium originating from an extracellular source greatly promotes the migration of cancer cells (Saidak et al. [2009]; Yang et al. [2009]). Yang et al. ([2009]) clearly showed that store-operated calcium entry channels (Orai1 and STIM1) are essential for breast tumor cell migration *in vitro* and tumor metastasis in mice. In this context, HGF could induce the activation and/or over-expression of ion channels proteins involved in calcium entry and thus promotes the consequent PCa cell migration.

First, we examined the direct effects of HGF on the free cytosolic calcium

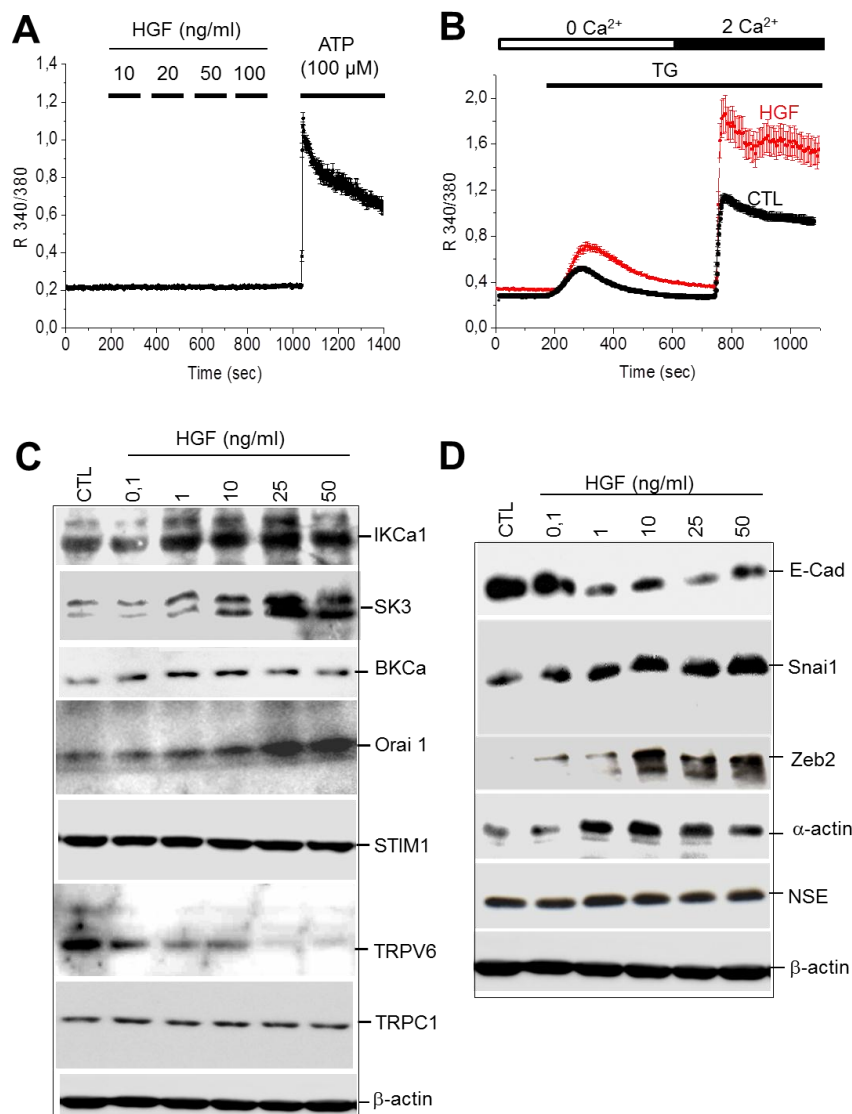
concentration ($[Ca^{2+}]_i$). When different concentrations of HGF were applied to DU145 cells, no significant modification of the basal calcium was observed (Figure 4A). To determine if HGF can induce a delayed calcium response, DU145 cells were exposed to a range of the growth factor's concentrations (1 to 50 nM) and the intracellular calcium concentrations were continuously monitored for 2 to 3 hours. In these experiments, we observed no calcium response to the applications of HGF. These data confirm the absence of a direct effect of HGF on the activity of the ion channels in human prostate cancer cells.

We further examined the modification of the calcium signalling and remodelling of the expression of the ion channels in PCa cells after a pre-treatment with HGF. To verify the possible modification of the calcium signalling in HGF-treated cells, a test, as described in the following section, was used to compare the rate of calcium entry in control and in HGF-treated cells. We previously showed that the application of the store-depleting SERCA inhibitor thapsigargin (TG) induces a calcium mobilization from intracellular stores and a calcium entry due to

Figure 4: Effects of HGF on calcium signalling and the ion channels proteins expression in DU145 cells.

Cells were grown on glass coverslips and cultured in complete medium alone (CTL) or with HGF (20 ng/ml). First, the direct effects of HGF at different concentrations on $[Ca^{2+}]_i$ were studied by calcium imaging (A). Then, the CTL and HGF-treated cells were processed by calcium imaging to estimate the amplitude of SOCE (B). For Ca^{2+} recording, cells were treated with 1 μ M thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) as indicated. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50–80 cells as mean \pm S.E. are presented. A quantification of the SOCE for experiment (B) is presented in inset (mean \pm S.E., n=260 cells), *P < 0.01. The TG application and extracellular Ca^{2+} increases from 0 (0 Ca^{2+}) to 2 mM (2 Ca^{2+}) are marked by horizontal bars. The graphs represent the mean peak amplitudes of calcium mobilization and SOCE \pm S.E. of at least three independent experiments and are expressed as the percentage above control value.

Following the 24 h treatments of DU145 cells by HGF at different concentrations (0,1-50 ng/ml), total proteins were extracted and 20 μ g proteins were analysed on 6 to 15% acrylamide gel (SDS-PAGE), then transferred to PVDF membranes. Immuno-blots were then performed as described in *Methods* for the detection of different calcium and potassium channels proteins (C). In the same protein extracts, the expression of EMT markers were studied (D). Expression of β -actin protein was used for the loading control of the samples. Experiments were performed at least twice in two independent cell cultures and representative figures are presented. The fold variation of the proteins in different samples normalized to β -actin expression is shown under the panel.



SOCE in human PCa cells [33]. The two phases of free intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) changes were separated using a Ca^{2+} add-back protocol. The addition of the store-depleting SERCA inhibitor thapsigargin (TG, 1 μ M) in nominally Ca^{2+} -free solution was followed by rapid, transient increases in $[Ca^{2+}]_i$, as measured by calcium imaging (Figure 4B). These increases are due to the mobilization of Ca^{2+} from internal stores. A subsequent addition of Ca^{2+} to the extracellular bath resulted in a rapid and sustained increase in cytosolic Ca^{2+} due to SOCE. Analyses were also performed on both the rate of the TG-induced calcium mobilization and the amplitude of SOCE in CTL cells *versus* those treated with HGF for 24. Interestingly, in these experiments, we observed that when the cells were cultured in the presence of HGF (20 ng/ml, 24h), the amplitude of the SOCE was significantly higher (40 to 50%) than that developed in cells cultured in control (CTL) medium. These observations suggest that HGF induces a modulation of the expression of the ion channels involved in the SOCE in human PCa cells. The identification of these ion channels could allow a schematization of the mechanism by

which HGF modulates these cancer cells migrations. Our previous studies showed that of several ion channels, it was mainly the calcium channels (Orai1/STIM1, TRPV6, TRPC1) and calcium-activated potassium channels that were involved in the generation of the SOCE in human PCa cells [23-25, 33]. Thus, experiments were designed to explore the impact of a 24 h exposure of the cells to HGF on the expression of these calcium and potassium channels involved in the SOCE.

In these experiments, when the cells were treated with different concentrations of HGF (0,1-50 ng/ml), the expression of Calcium-activated potassium channels (IKCa1, SK3) and calcium channels (Orai1) was up-regulated whereas the expression of TRPV6 was down-regulated and that of TRPC1 and Orai1 partner STIM1 stayed unchanged (Figure 4C). SK3 protein appears as a doublet band representing probably different glycosylated forms of the protein. In the same conditions, under HGF treatments, we also studied the evolution of the expression of proteins modulated in EMT (E-cadherin, Snail1, ZEB2 and a-actin). As shown in Figure 4D, in a dose-dependent manner, HGF induced a

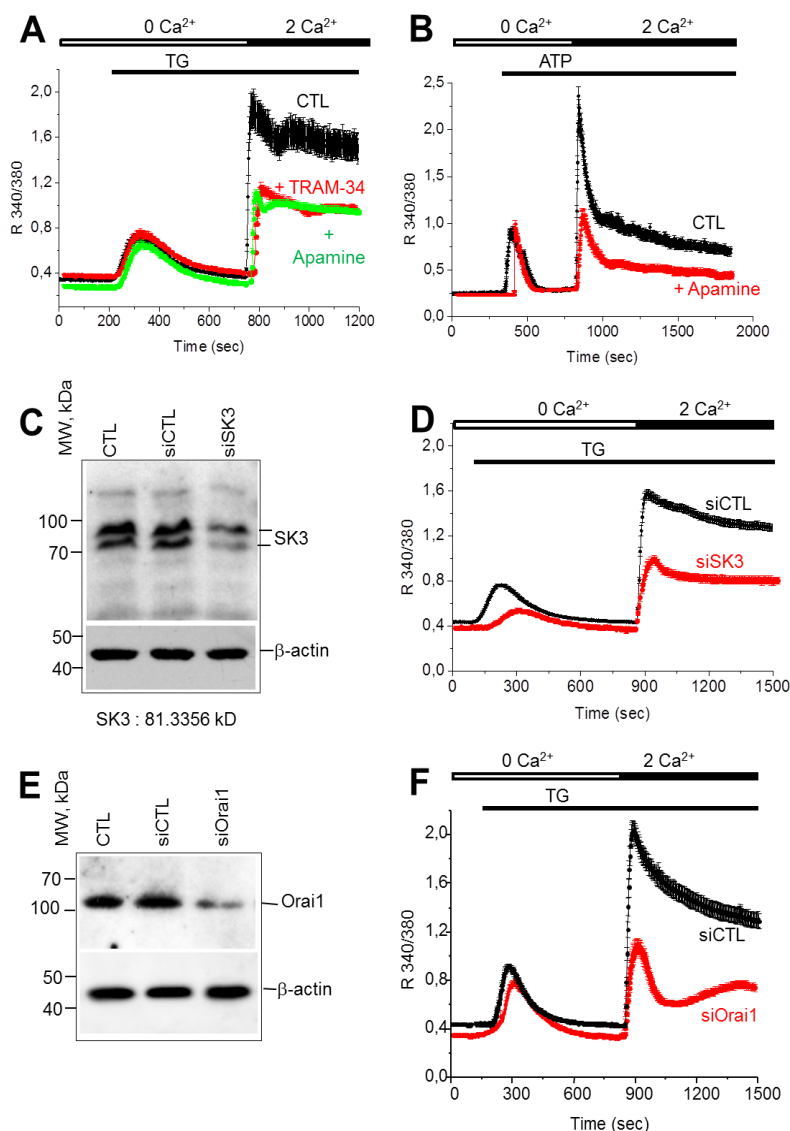


Figure 5: Involvement of ion channels in HGF-induced modification of calcium signalling.

(A) Cells were grown on glass coverslips and cultured in complete medium alone (CTL) or with HGF (20 ng/ml). Calcium imaging technique was used to estimate the amplitude of SOCE as described in Figure 4. To study the involvement of calcium-activated potassium channels in TG-induced SOCE, first inhibitors of IKCa1 (TRAM-34, 10 μ M) and SK3 (apamine, 300 nM) were used. (A) In the same manner as in A, by using the inhibitor Apamine to study the involvement of SK3 channel in SOCE induced by an agoniste (ATP, 100 μ M).

To confirm the involvement of SK3 potassium channel functions in TG-induced SOCE in HGF-treated cells, the siRNA technology was used. For this, the effects of cell transfection with either control siRNA (siCTL) or SK3-targetted siRNA (siSK3) on TG-induced SOCE were studied for in DU145 cells. First, the siSK3 down-regulation efficacy was assessed by Western Blotting (C) on DU145 cells, after siRNA treatments (25nM 48h). SK3 expression rate in each sample is normalized by densitometry using β -Actin expression as intern standard. Then, the involvement of SK3 protein in TG-induced SOCE was studied by calcium imaging experiments as described in figure 4 (D). In the same manner, the siOrai1 down-regulation efficacy was assessed by Western Blotting (E) and then the involvement of Orai1 channels in TG-induced SOCE was studied in siOrai1-transfected cells (E). Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50–80 cells as mean \pm S.E. are presented. A quantification of the SOCE for experiment (B) is presented in inset (mean \pm S.E., n=260 cells), *P < 0.01. The TG and ATP applications and extracellular Ca^{2+} increases from 0 (0 Ca^{2+}) to 2 mM (2 Ca^{2+}) are marked by horizontal bars. The graphs represent the mean peak amplitudes of calcium mobilization and SOCE \pm S.E. of at least three independent experiments and are expressed as the percentage above control value.

down-regulation of E-Cadherin and an up-regulation of Snail, ZEB2 and α -actin proteins whereas the expression of NSE (neuron specific enolase) protein, a marker of neuroendocrine differentiation, stayed unchanged.

Involvement of ion channels in HGF-induced modification of calcium signalling

It has previously been shown that Ca^{2+} influx is essential for the migration of various cell types, including tumor cells [40-43]. In addition, recent data has clearly shown that Orai1 and STIM1, both of which involved in store-operated calcium entry, are essential for tumor cell migration *in vitro* and tumor metastasis in mice [44]. In the other hand, recent data show that SOCE promotes migration of cancer cells following the formation of ion channel complex composed of TRPC1/Orai1 and SK3 channels and SK3 channel activity lead to SOCE amplification [36]. Thus, we hypothesized that the HGF-induced up-regulation of Orai1 and SK3

channels expression might be involved in the SOCE amplification and in cell migration induced by the growth factor. In this context, we studied first the involvement of SK3 and Orai1 proteins in the SOCE after treatments of cells by HGF on calcium signalling in DU145 cells.

First, the cells were treated by HGF (20 ng/ml) for 24h, then the TG-induced SOCE was studied in the presence or absence of the inhibitors of SK3 (Apamine, 300 nM) or IKCa1 (TRAM-34, 10 μ M). As shown in [Figure 5A](#), the amplitude of SOCE was reduced by about 50% by the SK3 inhibitor. In the same manner, the inhibitor of IKCa1 induced the same extent of inhibition suggesting that the IKCa1 and SK3 are the major potassium channels involved in SOCE in HGF-treated DU145 cells. The involvement of SK3 was also studied in the agoniste-induced SOCE in HGF-treated cells. As shown in [Figure 5B](#), the amplitude of the ATP-induced SOCE was reduced by at least 60% by the SK3 inhibitor Apamine (300 nM).

To confirm these results, siRNA technology was used to down-regulate the SK3 and Orai1 proteins. First the efficacy of the siRNA was tested by western blot to down regulate the SK3 ([Figure 5C](#)) and Orai1 ([Figure 5E](#)) proteins. Then, the cells were treated with Orai1 or SK3 targeting siRNA (25 nM, 48h) during the HGF (20 ng/ml, 24h) treatments of the cells. Then, calcium imaging experiments were performed using the protocol described in [Figure 4](#). As shown ([Figure 5D](#) and [5F](#)), the treatment of the cells by siOrai1 or by siSK3 suppressed the TG-induced SOCE by $52\pm6\%$ (total of 186 cells) and $45\pm8\%$ (total of 195 cells) respectively in two independent experiments performed each on at least 80 cells. Taken together, these data suggest that SK3 potassium channels and Orai1 proteins are involved in calcium signalling in HGF-treated DU145 cells.

Expression of SK3 potassium channel in human prostate cancer

We previously described that IKCa1 and Orai1 are expressed in human prostate cancer [33, 45]. In the present study, for the first time we studied the expression of SK3 potassium channel in human prostate cancer. For this, by using a specific antibody raised against human SK3 protein, we performed immunohistochemistry (IHC) analysis on 5 FFPE tissues to study the expression in human prostate cancer. In each tissue, the cancer and non-

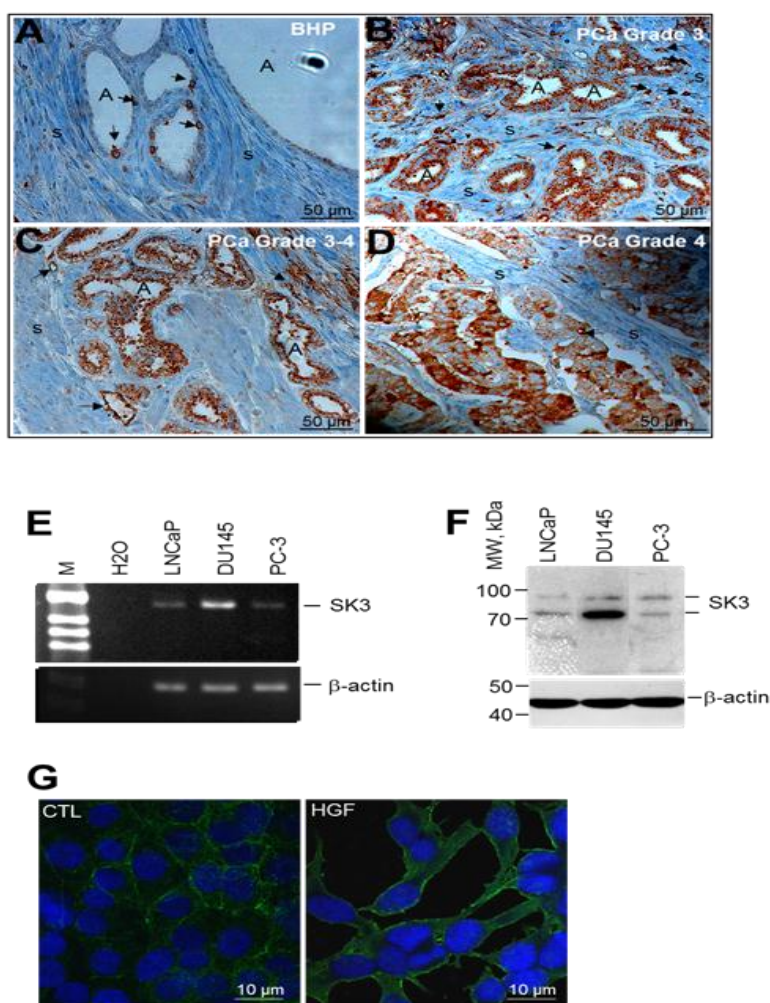


Figure 6: SK3 potassium channel expression in prostate cancer

(A-D) SK3 expression was studied by immunohistochemistry using an antibody raised against SK3 protein on human PCa (B-D) and adjacent non-cancer tissues (A). BHP, Benign Prostate Hyperplasia; A, Acinus; S, Stroma. Semi-quantitative RT-PCR (E) and Western Blotting (F) experiments were performed to study the expression of SK3 mRNA using specific primers in prostate and the protein expression of the potassium channel using anti-SK3 antibody in cancer epithelial cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3). (G) To examine the localization of the SK3 protein in DU145 cells, immunofluorescence studies were performed on PFA-fixed DU145 cells. pre-incubated in medium alone or in the presence of HGF (20 ng/ml).

cancer regions were explored for the expression of SK3 protein.

As shown in [Figure 6A-6D](#), we observed that SK3 protein was expressed preferentially in prostate cancer epithelial cells whereas the expression was absent in epithelial cells of non-cancer (BHP; Benign Hyperplasia of Prostate) regions. The expression of SK3 protein was observed in cancer tissues of different grades (grade 3 and grade 4). These experiments show clearly the expression of SK3 channel in prostate cancer epithelial cells. However, more investigations are needed to determine the possible variation of the SK3 protein with the evolution of prostate cancer. Interestingly, we observed also that the SK3 protein was present in some blood vessels in endothelial cells in non-cancer (BHP) and cancer tissues where the number of blood vessels stained for SK3 increased ([Figure 6A](#)). But, these aspects need further investigations. Arrows in [Figure 6A-6D](#) show the expression of SK3 in blood vessels. Using RT-PCR and western blot techniques, we further compared the expression of SK3 mRNA and protein in human prostate cancer androgen-sensitive (LNCaP) and androgen-insensitive (DU145 and PC3) cells. Our data show that the most important expression of SK3 is observed in DU145 cells at the mRNA ([Figure 6E](#)) and protein ([Figure 6F](#)) levels compared to LNCaP and PC-3 cells. The protein expression of SK3 channel was confirmed by immunofluorescence studies in DU145 cells in control conditions and after a treatment by HGF (20 ng/ml, 24h) ([Figure 6G](#)). In these studies, the SK3 channel protein was located in the plasma membrane level and in intracellular compartments.

Involvement of potassium and calcium channels in HGF-induced cell migration in tumor microenvironment

As described above, Potassium (SK3) and calcium (Orai1) channels are up-regulated in HGF-treated DU145 cells. By using pharmacological and siRNA tools, we studied if these channels are involved in HGF-induced migration of DU145 cells.

Migration assay using transwell chambers showed that HGF (20 ng/ml, 18h) significantly increased the migration of DU145 cells with an increase rate of at least 260±18% ([Figure 7A](#)). The HGF-induced cell migration was almost completely inhibited by SU11267, suggesting the involvement of c-Met receptor in HGF effects. The use of calcium channels inhibitor (including Orai1) SKF96365 (SKF) and SK3 channel inhibitor (Apamine, 300 nM) inhibited significantly the HGF-induced cell migration. Using siRNA technology, we showed that siSK3 induced an inhibition of 41% of HGF-induced cell migration ([Figure 7B](#)). In these experiments, siSK3 had an inhibitory effect on the basal cell migration of

DU145 cells but the difference was not statistically significant.

In order to mimic the tumor microenvironment, we performed the migration assays in co-culture experiments of DU145 and prostate cancer CAF cells as shown in the scheme shown in ([Figure 7C](#)). As shown, in these experiments, first the CAF cells were cultured to 70% confluence in lower chamber and then DU145 cells were added in upper chamber and incubated over night in the presence or absence of ion channels inhibitors (apamine and SKF96365 (SKF)). A control condition was also made where only DU145 (DU145 only) cells were present in upper chamber without CAF cells in lower chamber. These experiments would allow to study the impact of CAF-epithelial interactions in cancer cells migration.

Our data show that the co-culture of CAF and DU145 cells (CAF+DU) increases the migration of the latter cells by 250±45% (compared to DU145 only), showing a stimulatory effect of cells communications via secretions on the potency of the cancer cells migration ([Figure 7D and 7E](#)). In [Figure 7D](#) are presented the DU145 cells migrated through pores of the membrane placed between upper and lower compartments. Interestingly, in CAF+DU condition, the presence of SKF96365 (SKF) (10 µM) inhibited completely the migration of DU145 cells. In these experiments the presence of apamine (300 nM) inhibited the epithelial cells migration in the presence of the CAF cells by 41%. Taken together, these data suggest that CAF-induced cancer cells migration involves calcium (probably orai1) and potassium channels (SK3) in DU145 cells.

DISCUSSION

It is well established that the HGF/c-Met axis is amplified in prostate cancer and is associated to cancer metastasis. Accumulating data show the transduction pathways involved in the effects of HGF on cancer cells including prostate cancer but the relation between the scattering factor HGF transduction pathways and ion channels is missing. Here, for the first time, we investigated the impact of the microenvironment factor CAF-derived factor HGF on human PCa epithelial cells and involvement of ion channels in the effects of the growth factor. Our data described here show that conditioned media from primary cultured PCa CAF and HGF promoted PCa cells migration by inducing an epithelial to mesenchymal transition (EMT). For the first time, we show that the HGF-induced EMT was accompanied by a remodelling of calcium and potassium channels expression. The HGF-induced calcium and potassium channels amplified calcium signalling in these cells and were involved in the cell migration induced by the growth factor.

Invasion and metastasis are major events underlying cancer morbidity and mortality [46]. Because of the widespread metastasis in advanced cancer patients, where a resistance is observed to conventional therapies, the mortality rate remains extremely high and warrants new strategies to intervene in the metastatic cascade. Thus, an enhanced understanding of the molecular events in the pathogenesis of PCa will offer improved diagnosis, prognosis, therapy and prevention measures of the disease that will ultimately help us

to eliminate PCa metastasis.

In the present study, we observed that the conditioned media from primary cultured CAF cells derived from different patients secreted different amounts of VEGF and HGF. In this context, in a study realized on men with metastatic hormone-refractory prostate cancer, [47] showed higher plasma levels of HGF in men with hormone-refractory prostate cancer are associated with a decreased patient survival. These data suggest that the rate of HGF secreted by CAF

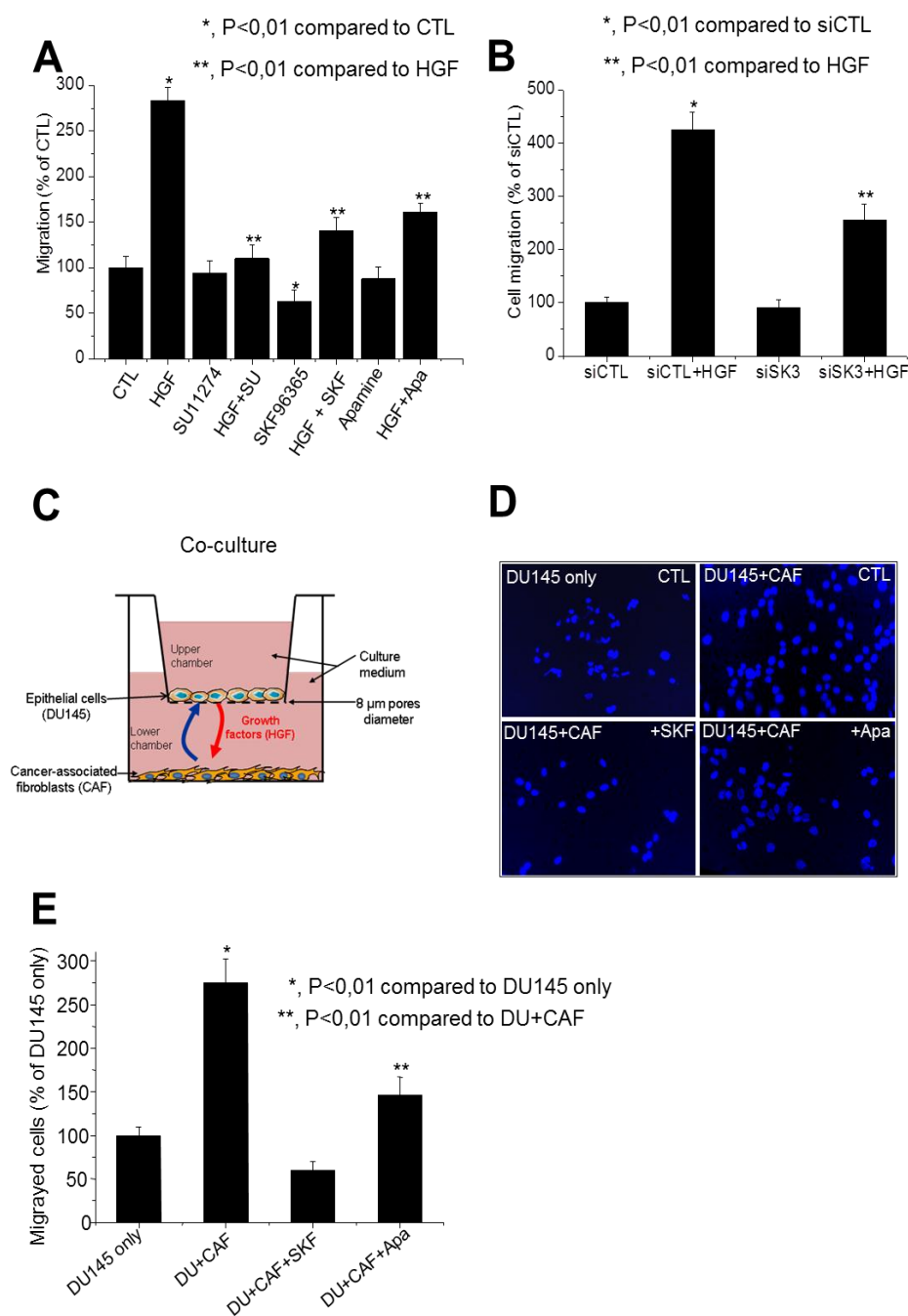


Figure 7: Involvement of potassium and calcium channels in HGF-induced cell migration in tumor microenvironment

By using pharmacological and siRNA tools, we studied if the channels modulated by the HGF are involved in the effects of the growth factor on DU145 cells migration. Cell migration was measured via the Transwell chamber assay. (A) DU145 cells were trypsinized and equal numbers of live cells (5×10^4) were plated into inserts and allowed to migrate for 18h in the presence or absence of HGF and the inhibitors of HGF receptor c-Met (SU11274, 5 μM) or potassium (apamine (Apa), 300 nM) or calcium (SKF96365 (SKF) channels. Cells in the insert (non-migrated cells) were eliminated by scraping and migrated cells were fixed and their nuclei were stained by Hoechst 33342 dye (Blue) and examined under fluorescence microscopy. At least ten different fields per condition were examined and cells were then counted and presented as a percentage of CTL cells. (B) To confirm the involvement of SK3 potassium channel in HGF-induced cell migration similar experiments were performed by using siSK3 to down-regulate the SK3 protein as shown in Figure 5.

Co-culture experiments (DU145+CAF) were used to study the impact of CAF secretions on the migration of DU145 cells as shown in a scheme in (C). In the same experiments, using the inhibitors of the potassium (apamine (Apa), 300 nM) or calcium (SKF96365 (SKF) channels are used to study the involvement of these channels in the migration of DU145 cells in co-culture conditions. In (D), are presented the nuclei of the DU145 migrated cells in different conditions as shown. At least ten different fields of the membrane per condition were examined and cells were then counted and presented as a percentage of CTL (DU145 only). Experiments were performed in duplicate and repeated at least twice. Relative migration (%) ± S.E. (Bar) is shown for the indicated conditions. The statistical analysis are noted on figures.

may predict the possibility of the cancer metastasis. In the same context, we observed different rates of VEGF secreted by the primary cultured CAF from different patients. As VEGF is known as an angiogenic factor, the patients showing a high rate of VEGF might present a high rate of tumor angiogenesis. The patients that the CAF secrete high levels of VEGF and HGF might develop a high level prostate cancer metastasis. Thus, the studies described here are of interest to design new therapeutic options for the treatment of the advanced prostate cancer. A common regulatory point in several signal transduction pathways is intracellular calcium homeostasis. One approach could be to focus on the intracellular signalling pathways underlying the metastatic process. Several data have clearly shown the involvement of calcium entry in cancer and non-cancer cell migration [44, 48-50]. In the present work, we present conclusive evidence for the first time that the pre-treatment of human PCa cells with CAF-conditioned media or HGF induces the EMT and PCa cells migration (Figure 2 and 3). By calcium imaging technique, we show that HGF pre-treatment induces an amplification of Store-Operated Calcium Entry (SOCE) in DU145 cells associated with an up-regulation of ion channels (Figure 4). These channels include Orai1 calcium channel and IKCa1 and SK3 potassium channels. Orai1 and calcium-activated potassium channels (IKCa1, SK3) are proteins known to constitute important actors in SOCE in various cell systems including human PCa cells [23, 33]. Our data show clearly that these channels, (IKCa1, SK3 and Orai1) are involved in the SOCE developed in HGF-treated DU145 cells. Meanwhile, in our studies, we failed to observe any direct effect of HGF on the rate of basal calcium (Figure 4) whereas in other cell systems, HGF is able to induce a calcium increase.

The alterations of the ion channel expression could be mediated by a stimulation of a signal transduction pathways leading to the activation of nuclear transcription factors. Published data suggest several transduction pathways activated by HGF including the MAP kinase pathways and PI3K/Akt pathways. According to the published data, the predominant pathway for HGF in PCa cells is the PI3K/Akt. These pathways induce the nuclear translocation of the nuclear factor (NF)- κ B, transcription factor involved probably in HGF-induced gene expression and subsequent protein synthesis. Interestingly, functional NF- κ B-binding sites in promoter regions of Orai1 have been identified and the expression of the Orai1 calcium channel was reported to be positively modulated by NF- κ B [51]. Subsequently, the store-operated Ca^{2+} entry was similarly increased by overexpression of p65/p50 or p65/p52, and decreased by treatment with the NF- κ B inhibitor, Wogonin. Thus, HGF/c-Met-induced PI3K/Akt

signalling cascade would lead to the activation of the NF- κ B transcription factor and Orai1 gene expression. In the same manner, the promoters for IKCa1 and SK3 potassium channels present several sites for the fixation of NF- κ B transcription factor. The latter transcription factor activated by HGF-induced PI3K/Akt pathway would induce the up-regulation of the potassium (IKCa1 and SK3) and calcium (Orai1) channels. However, the involvement of this pathway in the expression of ion channels needs further investigations.

The HGF-induced up-regulation of the ion channels may facilitate or amplify the transduction pathways involved in receptor-mediated activation of phospholipase C by the factors present in the serum. The activation of these receptors leads to IP_3 -mediated depletion of Ca^{2+} from the ER, which in turn stimulates Ca^{2+} influx through the plasma membrane involving Orai1/STIM1 complex formation [52]. Recent works have elegantly demonstrated that STIM1, Orai1, and SOCE play critical roles in the migration of a number of cell types in cancer and non-cancer cells [48, 49]. These observations support our data where HGF, by up-regulating the ion channels expression increases the SOCE developed by PCa cells in response to factors present in serum.

In a recent study [36], authors demonstrated that SOCE promotes migration of colon cancer cell following the formation of a lipid raft ion channel complex composed of TRPC1/Orai1 and SK3 channels. Formation of this complex is stimulated by the phosphorylation of the reticular protein STIM1 by the growth factor EGF and activation of the Akt pathway. In a previous work, we showed that IKCa1 potassium channel and TRPV6 calcium channel formed a molecular and functional complex in prostate cancer cells to promote cell proliferation [33]. The up-regulation of Orai1 calcium channel and SK3 potassium channel in the present work by HGF might allow the formation of a functional complex Orai1/SK3 to promote DU145 PCa cells migration as shown in Figure 7.

The present studies being performed on PCa cell line DU145, we confirmed the expression of the SK3 channel in human PCa tissues. By Immunohistochemistry studies, we show for the first time that the SK3 channel is expressed in prostate cancer tissues. The expression of SK3 potassium channel was previously shown in breast cancer [35]. Future investigations are necessary to study the relation between the expression of the channel and PCa metastasis.

Taken together, our epithelial-CAF co-culture studies and the use of CAF-conditioned media or HGF growth factor clearly show the interaction of CAF and PCa cells to promote the latter cells migration. These studies suggest the use of ion channels as target to prevent the cell migration and metastasis in PCa patients. In this context, we have

recently shown that a Ca²⁺-permeable channel TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) was expressed in human prostate cancer (PCa) CAF. The CAF TRPA1 channel constitutes a key mediator in epithelial-stromal interactions by modulating VEGF and HGF secretions and induced PCa cells resistance to apoptosis induced by chemotherapeutics agents in co-culture conditions. This CAF channel participates thus to prostate carcinogenesis and therapeutic escape. An alternative therapy derived from our studies would thus be to target the CAF ion channel TRPA1 modulating growth factor (HGF) release and an epithelial channel we evidenced here (SK3, Orai1) to be involved in cell migration. These targetings in combination with chemotherapeutic agents would allow to reduce or to block the release of the growth factors and thus inhibiting or limiting the chemoresistance and metastasis in PCa.

Conclusion: Taken together, our data suggest that ion channels could constitute potential targets in tumor microenvironment to block the effects of HGF on prostate cancer cell migration and metastasis.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Région Nord Pas-de-Calais, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. S. Derouiche was supported by the Région Nord Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We would like to thank E Richard for the technical assistance in images analysis by confocal microscopy and A Desmons (INSERM U1192, Université de Lille) for the technical assistance in immunohistochemistry studies.

REFERENCES

1. Liotta LA and Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001; 411(6835):375-379.
2. Wernert N. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch*. 1997; 430(6):433-443.
3. Wernert N, Locherbach C, Wellmann A, Behrens P and Hugel A. Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. *Anticancer Res*. 2001; 21(4A):2259-2264.

4. Maemura M, Iino Y, Yokoe T, Horiguchi J, Takei H, Koibuchi Y, Horii Y, Takeyoshi I, Ohwada S and Morishita Y. Serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Lett*. 1998; 126(2):215-220.
5. Toi M, Taniguchi T, Ueno T, Asano M, Funata N, Sekiguchi K, Iwanari H and Tominaga T. Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(3):659-664.
6. Varkaris A, Corn PG, Gaur S, Dayyani F, Logothetis CJ and Gallick GE. The role of HGF/c-Met signaling in prostate cancer progression and c-Met inhibitors in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011; 20(12):1677-1684.
7. Spina A, V. D. Pasquale, G. Cerulo, P. Cocchiaro, R.D. Morte, L. Avallone and Pavone LM. HGF/c-MET Axis in Tumor Microenvironment and Metastasis Formation. *Biomedicines* 2015; 3(1):71-88.
8. Thiery JP and Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(2):131-142.
9. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M and Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009; 119(6):1438-1449.
10. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6):442-454.
11. Kalluri R and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119(6):1420-1428.
12. Peinado H, Olmeda D and Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(6):415-428.
13. Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA and Franklin WA. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20(10):2417-2428.
14. Sulzer MA, Leers MP, van Noord JA, Bollen EC and Theunissen PH. Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157(4 Pt 1):1319-1323.
15. Katz D. *The Release of Neural Transmitter Substances*. Liverpool University Press. 1969.
16. Burgoyne RD. Mechanisms of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells. *J Physiol Pharmacol*. 1995; 46(3):273-283.
17. Neher E and Zucker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*. 1993; 10(1):21-30.
18. Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M and Shuba Y. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ*. 2007; 14(7):1295-1304.
19. Schwab A and Stock C. Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014; 369(1638):20130102.
20. Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A and Huber SM. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol*. 2005; 205(3):147-157.
21. Prevarskaya N, Skryma R and Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(8):609-618.

22. Courjaret R and Machaca K. STIM and Orai in cellular proliferation and division. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012; 4:331-341.
23. Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphael M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, Shuba Y, Skryma R and Prevarskaya N. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis*. 2010; 1:e75.
24. Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R and Prevarskaya N. Store-operated Ca²⁺ current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca²⁺ transporter type 1. *J Biol Chem*. 2003; 278(17):15381-15389.
25. Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverberghe K, Mariot P, Skryma R and Prevarskaya N. Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium*. 2003; 33(5-6):357-373.
26. Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membr Biol*. 2005; 205(3):159-173.
27. Pardo LM and van Duijn CM. In search of genes involved in neurodegenerative disorders. *Mutat Res*. 2005; 592(1-2):89-101.
28. Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S and Stuhmer W. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J*. 1999; 18(20):5540-5547.
29. Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knotgen H, Sanchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz Joachim R, Stuhmer W and Pardo LA. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer*. 2006; 5:41.
30. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD and Chandy KG. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem*. 2000; 275(47):37137-37149.
31. Ouadid-Ahidouch H, Le Bourhis X, Roudbaraki M, Toillon RA, Delcourt P and Prevarskaya N. Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K⁺ channel. *Receptors Channels*. 2001; 7(5):345-356.
32. Jager H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T and Grissmer S. Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol*. 2004; 65(3):630-638.
33. Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackiere F, Bidaux G, Urbain R, Gosset P, Delcourt P, Fleurisse L, Slomianny C, Dewailly E, Mauroy B, Bonnal JL, Skryma R and Prevarskaya N. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene*. 2009; 28(15):1792-1806.
34. Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Ahidouch A, Delcourt P and Prevarskaya N. Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 316(1):244-251.
35. Chantome A, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Fromont G, Marionneau-Lambot S, Gueguinou M, Pages JC, Collin C, Oullier T, Girault A, Arbion F, Haelters JP, Jaffres PA, Pinault M, Besson P, Joulin V, et al. Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res*. 2013; 73(15):4852-4861.
36. Gueguinou M, Harnois T, Crottes D, Uguen A, Deliot N, Gambade A, Chantome A, Haelters JP, Jaffres PA, Jourdan ML, Weber G, Soriani O, Bougnoux P, Mignen O, Bourmeyster N, Constantin B, et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. *Oncotarget*. 2016; 7(24):36168-36184.
37. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N and Mariot P. A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium*. 2006; 39(4):357-366.
38. Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H and Denef C. Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology*. 1999; 140(10):4874-4885.
39. Fram ST, Wells CM and Jones GE. HGF-induced DU145 cell scatter assay. *Methods Mol Biol*. 2011; 769:31-40.
40. Komuro H and Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*. 1993; 260(5104):95-97.
41. Marks PW and Maxfield FR. Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol*. 1990; 110(1):43-52.
42. Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Poo MM and Hong K. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature*. 2003; 423(6943):990-995.
43. Yang S and Huang XY. Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem*. 2005; 280(29):27130-27137.
44. Yang S, Zhang JJ and Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*. 2009; 15(2):124-134.
45. Derouiche S, Warnier M, Mariot P, Gosset P, Mauroy B, Bonnal JL, Slomianny C, Delcourt P, Prevarskaya N and Roudbaraki M. Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling. *Springerplus*. 2013; 2(1):54.
46. Molloy T and Van 't Veer LJ. Recent advances in metastasis research. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18(1):35-41.
47. Humphrey PA, Halabi S, Picus J, Sanford B, Vogelzang NJ, Small EJ and Kantoff PW. Prognostic significance of plasma scatter factor/hepatocyte growth factor levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 150005/9480. *Clin Genitourin Cancer*. 2006; 4(4):269-274.
48. Bisailon JM, Motiani RK, Gonzalez-Cobos JC, Potier M, Halligan KE, Alzawahra WF, Barroso M, Singer HA, Jourdeuil D and Trebak M. Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298(5):C993-1005.
49. Li J, Cubbon RM, Wilson LA, Amer MS, McKeown L, Hou B, Majeed Y, Tumova S, Seymour VA, Taylor H, Stacey M, O'Regan D, Foster R, Porter KE, Kearney MT and Beech DJ. Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation. *Circ Res*. 2011; 108(10):1190-1198.
50. Schaff UY, Dixit N, Procyk E, Yamayoshi I, Tse T and Simon SI. Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood*. 2010; 115(3):657-666.

51. Eylestein A, Schmidt S, Gu S, Yang W, Schmid E, Schmidt EM, Alesutan I, Szteyn K, Regel I, Shumilina E and Lang F. Transcription factor NF-kappaB regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions. *J Biol Chem.* 2012; 287(4):2719-2730.
52. Varnai P, Hunyady L and Balla T. STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30(3):118-128.

Article 4

Activation of mutated TRPA1 ion channel by resveratrol in human prostate cancer associated fibroblasts (CAF)

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Lucile Noyer, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Laura R. Sadofsky Pascal Mariot, Marine Warnier, Christian Slomianny, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki.

Manuscrit en révision dans *Molecular Carcinogenesis*

Dans le cadre de la prévention et du traitement des cancers, les facteurs environnementaux provenant des plantes et de l'alimentation ont montré des effets bénéfiques dans les études *in vitro* et *in vivo* menées à ce sujet, et sont envisagés pour être utilisés en combinaison avec les traitements actuels (Casey *et al.*, 2015). Parmi ces facteurs, le resveratrol (RES), polyphénol issu du vin rouge et du raisin, est un puissant antioxydant qui a montré des effets anti-tumoraux en induisant un arrêt de la prolifération ainsi que la mort cellulaire par apoptose et autophagie des cellules épithéliales tumorales prostatiques (Lin *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2006; Benitez *et al.*, 2007; Selvaraj *et al.*, 2016). Cependant, les études menées dans ce cadre ne se sont intéressées qu'au compartiment épithélial sans prendre en considération le microenvironnement tumoral. De plus, il a été montré que le resveratrol était capable d'inhiber le canal TRPA1 exprimé par les souris et les rats (Yu *et al.*, 2013; Nalli *et al.*, 2016). Nous avons donc fait l'hypothèse que ce facteur de l'alimentation pouvait constituer un moyen naturel pour cibler le canal TRPA1 pour interrompre le dialogue épithélio-stromal des cancers prostatiques. Nous avons donc étudié l'impact de ce facteur d'alimentation (RES) sur le canal TRPA1 humain et sur le canal exprimé dans les CAF des cancers prostatiques humains. En accord avec ce qui était démontré les canaux TRPA1 souris et rat, nous avons observé que le RES inhibait la forme normale du canal TRPA1 humain mais ce facteur activait le canal TRPA1 exprimé dans les CAF des cancers prostatiques humains. Ayant montré précédemment que le canal TRPA1 exprimé par les CAFs prostatiques intervenait dans la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF favorisant la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques employés, nous avons par la suite étudié l'impact des interactions entre les cellules épithéliales tumorales et les CAFs prostatiques dans les effets apoptotiques induits par le RES. Puis, nous avons étudié l'impact du RES sur les interactions épithélio-stromales. Pour réaliser ces études, nous avons utilisé des CAFs issus des cultures primaires ainsi qu'une lignée de CAFs, d'un individu atteint d'un cancer prostatique, qui nous a été généreusement fournie par le Dr. A. Oganessian (Department of Anesthesiology & Pain Medicine, University of Washington, USA) que nous avons préalablement caractérisée pour l'expression des marqueurs cellulaires et pour

l'expression du canal TRPA1 fonctionnel de la même façon que pour CAF issus des cultures primaires.

Nos travaux ont montré que le RES induisait un arrêt de croissance des CAFs prostatiques pour des concentrations importantes (50 et 100 μM), sans induire la mort cellulaire contrairement aux cellules épithéliales androgéno-dépendantes LNCaP. De plus, par des études d'ELISA, nous avons montré que le RES induisait d'une manière dose-dépendante, la sécrétion Ca^{2+} -dépendante d'HGF et de VEGF et que cette sécrétion était due à l'ouverture du canal TRPA1 et l'entrée de Ca^{2+} dans les CAF. Après avoir démontré par imagerie calcique que les réponses calciques induites par le RES n'étaient pas des artefacts par l'utilisation de la sonde calcique Fluo-4-AM et la validation des variations antiparallèles des longueurs d'onde de la sonde calcique Fura-2-AM, nous avons étudié les effets du RES sur la forme humaine et sauvage du canal TRPA1 (wt-hTRPA1) surexprimé dans des cellules HEK. Par imagerie calcique, nous avons ainsi montré que tout comme les formes du canal TRPA1 exprimées chez la souris et le rat, la forme wt-hTRPA1 était inhibée par le RES contrairement à la forme exprimée par les CAFs prostatiques. Après isolation, clonage et séquençage de la séquence codante pour le canal TRPA1, nous avons mis en évidence la présence d'une mutation (K539R) et de 2 polymorphismes (Y69C et K186N) au niveau de l'extrémité N-Ter du canal TRPA1 connu pour être responsable des propriétés d'activation du canal, les 2 polymorphismes observés ayant été caractérisés dans la littérature pour modifier significativement l'activité, l'expression et la sensibilité du canal aux agonistes (Deering-Rice *et al.*, 2015; Morgan *et al.*, 2015). Enfin, par des expériences de co-cultures entre les cellules LNCaP et les cellules PS30, nous avons montré que (1) la mort cellulaire des cellules LNCaP induite par le RES était significativement diminuée en présence des deux compartiments cellulaires et que (2) l'inhibition du canal TRPA1 stromal interférait sur le dialogue épithélio-stromal et resensibilisait les cellules LNCaP à l'apoptose induite par le RES.

Ainsi, nos travaux montrent l'importance de considérer le microenvironnement tumoral, ici les interactions avec les CAFs, dans l'étude de l'effet des molécules naturelles à vocation thérapeutique, leur efficacité pouvant être totalement différente voir être délétère en présence des différents acteurs du microenvironnement tumoral. De plus, nos études montrant des différences d'activation du canal TRPA1 entre espèces et éventuellement entre individus, elles illustrent bien l'importance de l'interaction entre les gènes et l'environnement et la nécessité de prendre en compte l'identité génétique de chaque patient dans la prescription des traitements contre le CaP.

Contributions : J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce papier sous la supervision du professeur Morad Roudbaraki. Pour certaines parties, dans le cadre des préparations des outils (des plasmides d'expressions), j'ai eu recours à l'aide précieuse des techniciens du laboratoire que je remercie vivement.



Activation of mutated TRPA1 ion channel by resveratrol in human prostate cancer associated fibroblasts (CAF)

Journal:	<i>Molecular Carcinogenesis</i>
Manuscript ID	MC-16-0282
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	26-Aug-2016
Complete List of Authors:	<p>Vancauwenberghe, Eric; INSERM U1003, Biology Derouiche, Sandra; NIPS Research fellow Division of Cell Signaling National Institute for Physiological Sciences Noyer, Lucile; INSERM U1003, Biology Lemonnier, Loïc; INSERM U1003, Biology Gosset, Pierre ; Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille, Medicine Sadofsky, Laura; Cardiovascular and Respiratory Studies, The University of Hull, Castle Hill Hospital Mariot, Pascal; INSERM U1003, Biology Warnier, Marine; Senescence Escape Mechanisms Laboratory, Tumoral Escape Department, Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon Slomianny, Christian; INSERM U1003, Biology Mauroy, Brigitte ; INSERM U1003, Biology; Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert Bonnal, Jean Louis; INSERM U1003, Biology; Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert Dewailly, Etienne; INSERM U1003, Biology Delcourt, Philippe; INSERM U1003, Biology Allart, Laurent; INSERM U1003, Biology Prevarskaya, Natalia; INSERM U1003, Biology Roudbaraki, Morad; INSERM U1003, Biology</p>
Keywords:	TRPA1, Prostate cancer, Tumor microenvironment, Resveratrol, Apoptosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 Activation of mutated TRPA1 ion channel by resveratrol in human prostate cancer associated
4 fibroblasts (CAF)
5

6 Eric Vancauwenberghe¹, Sandra Derouiche¹, Lucile Noyer¹, Loïc Lemonnier¹, Pierre Gosset²,
7 Laura R. Sadofsky⁴ Pascal Mariot¹, Marine Warnier¹, Christian Slomianny¹, Brigitte
8 Mauroy^{1,3}, Jean-Louis Bonnal^{1,3}, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt¹, Laurent Allart¹,
9 Natalia Prevarskaya¹ and Morad Roudbaraki^{1*}.
10
11
12
13
14

15 Affiliations

16 ¹Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, Equipe
17 labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of
18 Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et
19 Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

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

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

23 ⁴Cardiovascular and Respiratory Studies, The University of Hull, Castle Hill Hospital, Cottingham,
24 Hull HU16 5JQ, UK
25
26

27 **Running title:** Resveratrol activates CAF TRPA1
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 *To whom correspondence should be addressed:

51 Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003
52 SN3, Université Lille I Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
53 Fax: (33) 3 20 43 40 66
54 Phone : (33) 3 20 33 64 23
55 e-mail: morad.roudbaraki@univ-lille1.fr
56
57
58
59
60

Activation of mutated TRPA1 ion channel by resveratrol in human prostate cancer associated fibroblasts (CAF)

Eric Vancauwenbergh¹, Sandra Derouiche¹, Lucile Noyer¹, Loïc Lemonnier¹, Pierre Gosset², Laura R. Sadofsky⁴, Pascal Mariot¹, Marine Warnier¹, Christian Slomianny¹, Brigitte Mauroy^{1,3}, Jean-Louis Bonnal^{1,3}, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt¹, Laurent Allart¹, Natalia Prevarskaya¹ and Morad Roudbaraki^{1*}.

Affiliations

¹Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

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

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

⁴Cardiovascular and Respiratory Studies, The University of Hull, Castle Hill Hospital, Cottingham, Hull HU16 5JQ, UK

Running title: Resveratrol activates CAF TRPA1

*To whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003

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

Fax: (33) 3 20 43 40 66

Phone : (33) 3 20 33 64 23

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

Grant supports Acknowledgments

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

Abbreviations: TRPA1, Transient Receptor Potential Ankyrin 1; PCa, prostate cancer; RES, resveratrol; SNP, single nt polymorphism; VEGF, vascular endothelial growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; SOCE, store operated calcium entry; TME, Tumor microenvironment; HC-030031, 2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4-isopropylphenyl)acetamide; A967079, 4-fluorophenyl-2-methyl-1-pentene-3-one oxime; AITC, allyl-isothiocyanate; CAF, Cancer-associated fibroblasts; HEK, human embryonic kidney.

Key words: TRPA1, Prostate cancer, Tumor microenvironment, Resveratrol, Apoptosis.

ABSTRACT

Previous studies showed the effects of resveratrol (RES) on several cancer cells, including prostate cancer (PCa) cell apoptosis without taking into consideration the impact of the tumor microenvironment (TME). The TME is composed of cancer cells, endothelial, blood cells and cancer-associated fibroblasts (CAF), the main source of growth factors. The latter cells might modify in the TME the impact of RES on tumor cells via secreted factors. Recent data show clearly the impact of CAF on the resistance of the cancer cells to apoptosis via

secreted factors. However, the effects of RES on PCa CAF have not been studied so far. We investigated for the first time the effects of RES on the physiology of PCa CAF in the context of TME. Using a prostate cancer CAF cell line and primary cultured CAF from prostate cancer, we show that RES activates the N-terminal mutated TRPA1 channel leading to an increase in intracellular calcium concentration and the expression and secretion of growth factors (HGF and VEGF) without inducing apoptosis in these cells. Interestingly, in the present work, we also show that

when the prostate cancer cells were co-cultured with CAF, the RES-induced cancer cell apoptosis was reduced by 40%, an apoptosis reduction annealed in the presence of the TRPA1 channel inhibitors. The present work highlights CAF TRPA1 ion channels as a target for RES and the importance of the channel in the epithelial-stromal crosstalk in the TME leading to resistance to the RES-induced apoptosis.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the major causes of cancer-related death in men in western countries. Androgen-deprivation therapy (ADT) coupled to chemotherapies to prevent androgens from binding to the androgen receptor (AR) has been the norm for prostate cancer treatment over recent decades. Despite early success in suppressing prostate tumor growth, in some cases the emergence of hormone-refractory cancer cells leads to tumor growth in a hormone-refractory manner associated with an increased risk of metastasis. In these cases of advanced PCa, hormonal manipulations or chemotherapies are essentially palliative with no effective cure for advanced PCa. There is thus an urgent need to investigate the mechanisms of resistance in PCa in order to design new therapeutic targets.

In recent years, the importance of dietary components such as anti-oxidants in disease prevention has become an important area of research. Resveratrol (RES), a natural polyphenol found in red wine and foods such as grapes and peanuts, has been suggested to have potent chemo-preventive properties and has been reported to inhibit distinct phases of carcinogenesis *in vitro* [1]. Previous studies have demonstrated that resveratrol could not only induce apoptosis directly in PC-3 and LNCaP PCa cells [2,3], but can also sensitize LNCaP and other cell types to apoptosis induced by TRAIL and chemotherapeutic agents [4-6]. The mechanism of sensitization has been reported to involve down-regulation of the expression of survivin, a member of the IAP family [4,5] and altered expression of Bcl-2 family proteins [4-6]. Thus, apart from a role in chemoprevention, RES has been suggested as a potential therapeutic to enhance the effects of chemotherapeutic agents by regulating sensitivity to apoptosis.

All these studies are performed only on isolated prostate cancer cells without taking into consideration the TME where several cell types are in communication *via* soluble factors. In fact, carcinomas in general are composed of two interdependent cell components: the neoplastic epithelial cells and the supporting tumour stroma, which plays decisive roles in pivotal processes such as tumour cell proliferation, invasion and tumor vascularization [7-9] *via* the secretion of growth factors and cytokines. Following epithelial changes in carcinogenesis, the surrounding stroma is modified by cancer cell-derived factors. These modifications drive the emergence of the characteristic reactive stroma:

the modified stromal cells secreting extracellular matrix proteins and soluble factors (cytokines, growth factors), which in turn play important roles in initiation and/or progression of certain carcinomas, including breast and prostate cancers. The stromal cells are shown to secrete a great number of cytokines and growth factors including angiogenesis promoting factor vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) and hepatocyte growth factor (HGF). HGF is shown to be abundantly expressed and secreted in the tumor microenvironment and is known to promote proliferation and cell motility of epithelial cells expressing the HGF receptor c-Met. The stromal secreted factors such as HGF is also described to be involved in the resistances developed in the patients under treatment by chemotherapy agents. In this context, a growing number of studies have demonstrated the interest in the relationship between epithelial tumor cells and their microenvironment in order to improve available chemotherapeutics treatments. Modulation of these stromal factor secretions might impact the initiation or progression of prostate cancers and the identification of the modulators of these secretions might constitute interesting targets in the PCa chemotherapies and/or PCa treatments in general. Ion channels are integral membrane proteins that form a pore to allow the passage of specific ions by passive diffusion. A rise in free cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_c$) near the plasma membrane due to Ca^{2+} influx through the membrane Ca^{2+} channels is the main mechanism inducing exocytosis [10-12]. In the context of cancer, alterations in Ca^{2+} homeostasis with modulation of ion channel expression and activity can be essential in the carcinogenesis or its progression by modulating the processes like cell growth, differentiation, migration or secretion.

Published data show that environmental factors could modulate ion channel activity or expression [13]. Recently, RES has been shown to modulate calcium signaling in epithelial PCa cells by decreasing Endoplasmic Reticulum (ER) calcium storage and store operated calcium entry (SOCE) [14]. It is conceivable that RES modulates calcium signaling in PCa CAF and thereby modifies the secretion and/or expression of growth factors by these cells and subsequently the physiology of the cancer cells in the TME. However, the data concerning the impact of RES on calcium signaling in PCa CAF is missing.

Given the importance of the cancer associated fibroblasts of the tumor microenvironment, in the present work, we studied the impact of RES on PS30 cells, a prostate cancer CAF cell line and on primary cultured CAF from human prostate cancer. We show that RES activates a mutated TRPA1 calcium channel, an ion channel of the TRP family expressed in PCa CAF. The activation of the channel by RES induced an increase in intracellular calcium concentrations and the expression and secretion of the growth factors (HGF and VEGF) without inducing apoptosis in these

cells. Interestingly, in the present work we also show that when the prostate cancer cells were co-cultured with CAF, the RES-induced apoptosis in epithelial cancer cells was reduced by 40 %, an apoptosis reduction annealed in the presence of the TRPA1 channel inhibitors. These data show the importance of the CAF cells on the effects of RES on prostate cancer cells in the TME. Moreover, the present work highlights CAF TRPA1 channels as a target for RES and the importance of the channel in the epithelial-stromal crosstalk leading to the resistance to RES-induced apoptosis. Our data suggest the targeting of the CAF TRPA1 channel along with the use of RES as an anti-cancer agent to induce the apoptosis of the prostate cancer cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and antibodies

All chemicals, agonists and growth factors were from Sigma-Aldrich. Allylthiocyanate (AITC), HC-030031, A-967069 and resveratrol were dissolved in DMSO and then diluted to the desired concentration on the day of the experiments. Antibodies were from commercial sources as follows: Rabbit anti-hTRPA1 (Alomone Labs), mouse anti- α -actin and mouse anti-Vimentin (Dako, France), Rabbit anti-Calnexin (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (Molecular Probes).

Cell lines

LNCaP, PC-3 and DU145 prostate cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured as previously described (Gackiere *et al.* 2006). PS30 cell line was derived from a prostate cancer patient. To obtain these cells, primary human prostate stromal explants were infected with an amphotrophic retrovirus encoding the E6/E7 open reading frame of the human papillomavirus type 16. The cells were then characterized for the expression of myofibroblasts markers [15].

The cell line was a generous gift of Dr A. Oganessian A, Department of Anesthesiology & Pain Medicine, University of Washington (Seattle, Washington, USA). These cells were cultured in RPMI 1640 or DMEM supplemented with 10% FCS.

Tissue specimens and primary cell cultures

Human PCa biopsies were obtained from consenting patients following local ethical considerations. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number 'CP 01/33', issued by the 'Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille'. A portion of prostate tissue suspected of carcinoma was incised, and one half of the sliced tissue was submitted for immediate microscopic examination on cryostat sections. After establishment of the diagnosis of adenocarcinoma, the remaining half of the tissue was

used for primary culture. The tissue was cut into multiple minute cubes, placed on a plastic surface, and grown in Phenol-red-free RPMI 1640 containing charcoal-stripped Fetal Calf Serum (FCS) (CS-RPMI) (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). As soon as outgrowths formed around the tissue fragments, cells were trypsinized and cultured for calcium imaging, immunofluorescence, RT-PCR and western blot experiments.

Co-cultures

PS30 and DU145 cells were seeded in 24-well plates at 70% confluence separated by an insert with pores of 0.4 μ m diameter in order to study paracrine interactions via secreted factors. Cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, pre-treated or not with TRPA1 inhibitor (HC-030031, 50 μ M) for 24h then, treated with or without RES (1-50 μ M, 48h). The cells were then harvested by trypsinization and used for Hoechst staining assays as described below.

RT-PCR analysis of mRNA expression

PS30 cells or primary cultured CAF cells were treated by RES and or TRPA1 inhibitors at the indicated concentrations for 48h and then total RNA were isolated and RT-PCR experiments were performed as described earlier [16]. The PCR primers and the target sequences for siRNA in this study were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Eurogentec (Angers, France) and are detailed in Table 1.

Cell transfections

For siRNA experiments, equal numbers of cells from the same culture were seeded, transfected overnight either with 25 nM of control siRNA (targeting Luciferase mRNA) (Eurogentec, Angers, France), or with 2 different siRNA raised against TRPA1 mRNA (siTRPA1-1, siTRPA1-2). The Hiperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) was used to transfect the cells according to the manufacturer's instructions. The medium was changed 24 h after transfections and cells were incubated for a further 24h before performing experiments. The target sequences for TRPA1 siRNA are given in Table 1. The efficiency of the siRNA was validated by RT-PCR and by Western Blot studies conducted on PS30 cell line and primary cultured CAF (data not shown).

Immunofluorescence studies

The protein expression studies in PCa cells was determined either by immunofluorescence staining performed on 2% paraformaldehyde (PFA)-fixed cells as previously described [17] and then analysed either by confocal microscopy (Zeiss LSM 700; acquisition parameters: objective 40x/1.3 thickness of confocal slide, 1 μ m) or under phase contrast microscopy.

Western Blot Assay

Primary cultured stromal cells and PS30 cells were cultured to 80% confluence and total proteins were extracted. 20 µg of each sample were analysed by SDS-PAGE on either 6% or 10% acrylamide and processed for western-blotting using TRPA1 (1:500e), α -actin (1:200e), Vimentin (1:500e) and Calnexin (1/1000e) antibodies as described previously [17] and revealed by the ECL chemiluminescence kit (Millipore, France).

Calcium Imaging

Calcium imaging experiments were performed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) as previously described [17], using Fura-2 AM as the calcium dye. To represent the variation in $[Ca^{2+}]_c$, the fluorescence intensity ratio represented by F340/F380 was used as an indicator of changes in cytosolic Ca^{2+} concentration. For calcium imaging experiments using the Fluo-4 calcium probe, cells were loaded with Fluo-4/AM (5µM) for 30 min at 37°C. Cells were then washed in HBSS and processed for the effects of RES. The Fluo-4 dye was excited in loaded cells at 470-480nm and the emission was measured at 525 nm, reflecting the intracellular free calcium concentrations. Each experiment was performed on 35-45 cells in triplicate and repeated at least four times on different cell cultures and a representative figure is presented.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PS30 cells (5×10^4 cells) were incubated in RPMI supplemented with 0.5% FCS, and treated with RES at different concentrations (10, 25 and 50 µM) with or without TRPA1 inhibitors (HC-030031, 50 µM; A-967079, 1µM) or activator (AITC, 30 µM) for 24h, in 12-well plates at 80% of confluence. The supernatants of the cell cultures were then collected, centrifuged and processed for HGF and VEGF detections by ELISA Assays using an immunoassay kit (Abcam, Paris, France) according to the manufacturer's instructions.

Apoptosis Assays

For Hoechst staining of cells nuclei, treated and untreated cells were harvested by trypsinization and by centrifugation for 5 min, washed with 1 ml PBS and attached to glass coverslips by cytospin then, fixed in 70% methanol at -20°C for 15 min. The cells nuclei were then stained with Hoechst 33342 dye (4 µg/mL) (blue fluorescent) for 15 min at room temperature in the dark, mounted with mowiol and examined by fluorescence microscopy by counting the apoptotic and non-apoptotic cell nuclei in 10 randomly chosen fields.

Statistical analysis

Plots were produced using Origin 8.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean \pm S.E. Statistical analysis was performed using unpaired *t* tests or ANOVA tests

followed by either Dunnett (for multiple control *versus* test comparisons) or Student-Newman-Keuls post-tests (for multiple comparisons). Student's *t*-test was used for statistical comparison of the differences and $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Effects of resveratrol on prostate cancer associated fibroblast cells

Although resveratrol (RES) is known to induce apoptosis or increase sensitivity to apoptotic stimuli in prostate epithelial cancer cell lines as LNCaP or PC-3 cells, its effect on prostate CAFs has not been studied so far. In this context, we used an immortalized human prostate cancer stromal cell line, PS30 cells, as well as primary cultured human prostate cancer stromal cells (PrCSC) in order to study if prostate CAFs physiology could be altered by RES. The cells were treated with different concentrations of RES (1 to 100µM) for 72h, then, the cells were examined under light microscope. As shown in [Figure 1A](#), the RES treatment of the cells showed a dose-dependent modification of the CAF cells shape. Indeed, the concentrations of RES up to 25 µM failed to induce any changes in cell shape whereas for higher concentrations (50 and 100µM), a modification in the cell shape with a more elongated and thinner morphology was observed compared to the control cells. As shown in [Figure 1B](#), the morphological modifications are accompanied by a dose-dependent decrease in α -actin and an increase in vimentin expression, the markers for smooth muscle cells and fibroblast respectively. In the same way, MTS/PMS viability assays were performed on PS30 cells treated with RES at different concentrations (0,1 to 100µM) for 72h. As shown in [Figure 1C](#), for concentrations of 0,1 to 25µM, RES failed to affect significantly the number of living cells but induced a decrease of more than 30% for higher concentrations (50 and 100µM) compared to control cells. Absence of any morphological signs of cytotoxicity such as cell rounding or floating in the medium and counting of nuclei stained with Hoechst dye show that this decrease in cell number induced by RES was not linked with the cell death by apoptosis or necrosis ([Figure 1D](#)). Thus, in contrast to epithelial cancer cells (LNCaP or PC-3), RES failed to induce cell death in prostate CAFs but seems to induce a cell morphology changes associated with the modifications of cell markers (α -actin and vimentin) expression.

CAFs are known to promote cancer development and metastasis through paracrine interactions with epithelial cancer cells *via* secretion of cytokines and growth factors. Thus, we studied if RES could modulate the secretion by PS30 cells. For this, the secretion rates of two growth factors were evaluated by ELISA assays in the conditioned media (CM) by PS30 cells treated or not with RES for 24h. As shown in [Figures 1E and 1F](#), RES (10-50 µM) induced an increase in the secretion of two growth factors actively involved in carcinogenesis: Hepatocyte

Growth Factor (HGF) (Figure 1E) and Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) (Figure 1F) compared to control. Moreover, intracellular Ca^{2+} chelation with the incubation of the cells with BAPTA/AM decreased the basal secretion of HGF and VEGF more than 2 fold (Figures 1E and F) suggesting that the basal secretion is a Ca^{2+} -dependent process in CAF. It is possible that RES is able to induce a modulation of the ion channels activity leading to a cytosolic calcium rise and subsequent secretion.

Resveratrol induces Ca^{2+} entry in prostate CAFs

In order to study whether the effects of RES on CAF gene expression and growth factor secretions are mediated by the activation of calcium signaling in these cells, we performed Ca^{2+} imaging experiments. As shown in Figure 2, RES induced a rapid rise in cytosolic free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_c$) in PS30 cells in a dose-dependent manner ($EC_{50}=6.49\mu M$) (Figure 2B). The RES-induced calcium response consisted in a rapid rise followed by

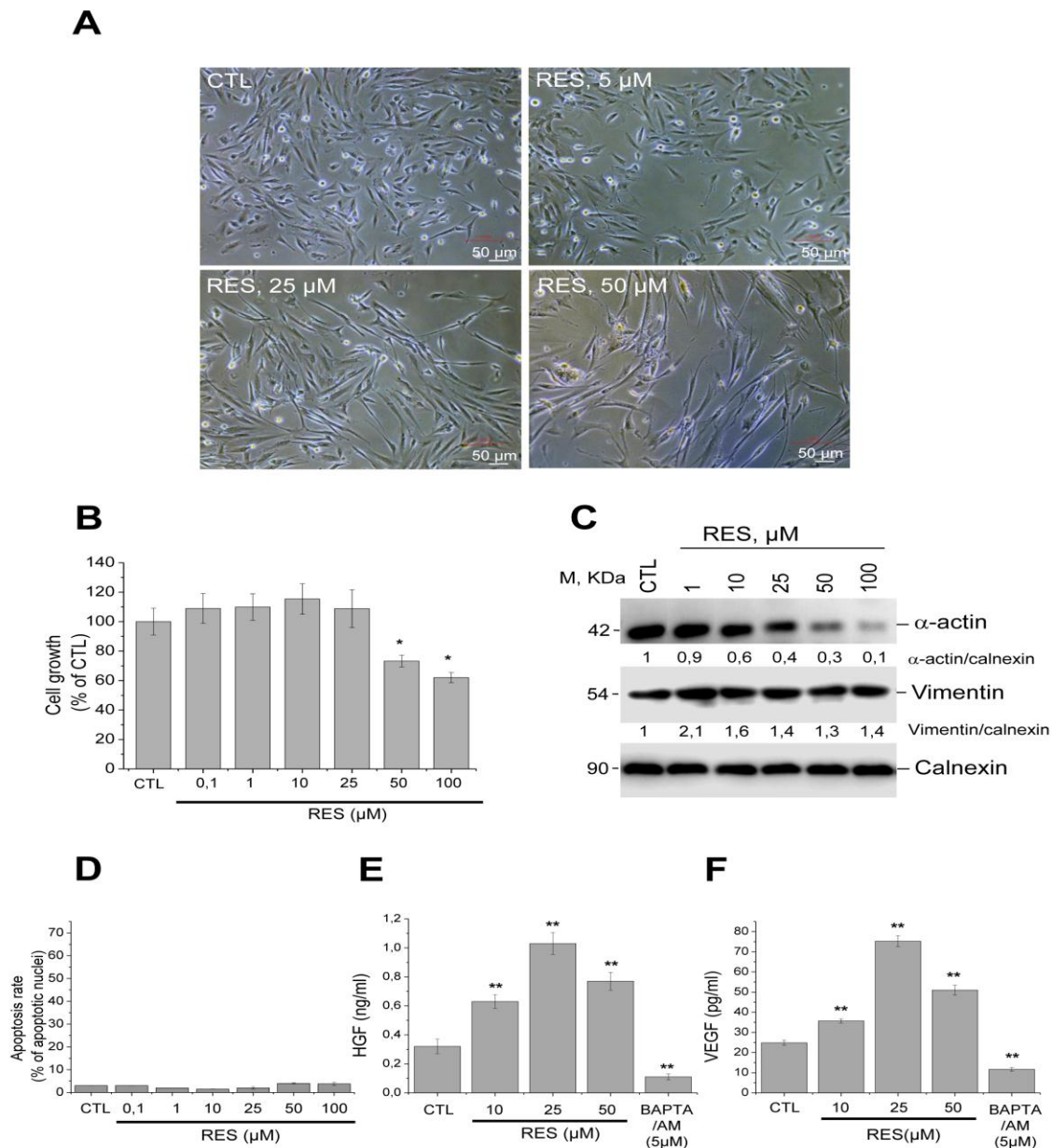


Figure 1: Effects of RES on human prostate cancer (PCa) cancer-associated fibroblasts (CAF)

(A) Microscope examination of cells treated with different concentrations of RES. PS30 cells were treated with RES at different concentrations (5, 25 and 50 μM) for 72h in RPMI medium containing 10% FCS. (B) Cell growth was measured by MTS/PMS assay on prostate CAFs (PS30) treated with RES at different concentrations (0,1 to 100 μM , 72h). (C) Western blotting experiments showing the effects of RES on CAF cells markers (α -actin and vimentin) expression. Densitometric quantification for normalized α -actin and vimentin relative to calnexin as an internal standard is shown. Cells were treated with RES (1 to 100 μM , 72h) and processed for Western blotting experiments as described in Materials and Methods section. (D) The impact of RES on apoptosis was assessed by a Hoechst staining technique. PS30 cells treated for 72h with RES (0,1 to 100 μM) and the nuclei were then stained as described in Materials and Methods section. Apoptotic cells were evaluated then counted under a fluorescence microscope. (E, F) Prostate cancer CAFs (10^5 cells/well) were incubated in triplicate with RES (10, 25 and 50 μM) or BAPTA/AM (5 μM) in RPMI medium containing 0.5% FCS for 24h h. Then, ELISA assays were realized on conditioned media in order to determine the variation in the secretion of HGF (E) and VEGF (F). BAPTA/AM (5 μM) was used in order to determine if the basal secretion process was Ca^{2+} -dependent. All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown. *- $p < 0,05$, **- $p < 0,001$,

a sustained plateau obtained for the concentrations of RES > 1 μM. For these experiments, we used Fura-2/AM, a ratiometric fluorescent Ca²⁺ dye, where cytosolic Ca²⁺ levels are determined by measuring the emission of fluorescence at 510 nm following alternate excitation at 340 nm (F340) and 380 nm (F380) and the F340/F380 ratio reflects the variation of the [Ca²⁺]_c. Previous works suggest that RES might interfere with Fura-2 intracellular Ca²⁺ measurements with a light absorption at 340 nm and emission at 510 nm modifying thus the F340 without affecting F380 values [18,19]. We therefore performed experiments and analysis to verify this possibility in order to validate the effects of RES on [Ca²⁺]_c in PS30 cells. First, for each calcium imaging experiment using Fura-2, we checked the variations of fluorescence after excitations at 340nm and 380 nm. In all experiments with RES for the concentrations tested, the F340 and F380 showed an anti-parallel variation (Figures 2C and 2D), suggesting that the calcium response induced by RES was not due to the interferences of the RES with Fura-2 fluorescence. In a second series of experiments, we used Fluo-4, another fluorescent Ca²⁺ dye with an excitation and emission wavelengths of 470 and 525 nm respectively. As shown in Figure 2E, the application of RES on Fluo-4 loaded cells increased the emitted fluorescence at 525nm (F470), suggesting an increase in [Ca²⁺]_c. Taken together, the decrease of F380 values simultaneously with increase of F340 values for Fura-2 and increase of F470 values for Fluo-4 after RES application (25 μM) on PS30 cells confirm that RES induces a Ca²⁺ increase in these cells. Moreover, absence of response when the cells are incubated in a medium HBSS without Ca²⁺ demonstrate that RES induces a Ca²⁺ entry and not a mobilization from intracellular Ca²⁺ stores (Figure 2F). This implies that RES activates plasma membrane ion channels to induce a Ca²⁺ entry in prostate CAFs.

Resveratrol activates TRPA1 in prostate CAFs

In order to identify the ion channels involved in the effects of the RES on PS30 cells, different voltage-dependent (nifedipin, flunarizin,

Nickel) and voltage-independent (Capsazepin, SKF96365, BCTC, HC-030031, A-967079) calcium-permeable ion channels inhibitors were tested on the RES-induced Ca²⁺ response. Among the inhibitors tested, only TRPA1 inhibitors (HC-030031, A-967079) blocked the RES-induced Ca²⁺ response, suggesting the activation of TRPA1 by RES in human prostate CAF (Figure 3). Indeed, the application of HC-030031 (50 μM) on RES-induced Ca²⁺ entry suppressed the calcium response (Figure 3A).

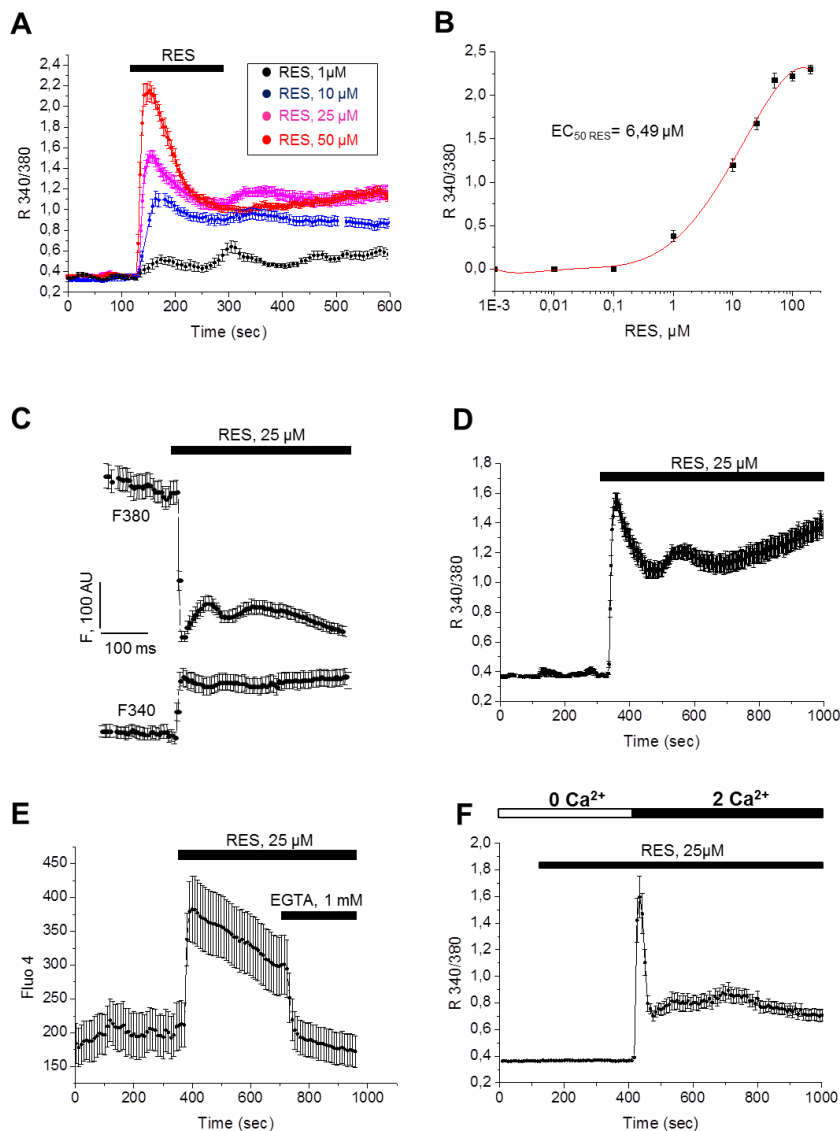


Figure 2: Resveratrol induces Ca²⁺ entry in prostate CAFs

(A) Impact of RES on the cytosolic Ca²⁺ concentration was studied in PS30 cells by Ca²⁺ imaging technique by using ratiometric Fura-2 as fluorescent Ca²⁺ dye where RES was applied at different concentrations on the cells. Ca²⁺ concentration measurements are represented by the F340/F380 ratio. (B) Dose-response curve of RES effects on cytosolic Ca²⁺ concentrations in PS30 cells (EC₅₀ = 6.49 μM). (C) Anti-parallel variations of Fura-2 fluorescence emission at 510 nm after excitation at 340 nm (F340) and at 380 nm (F380) when RES (25 μM) was applied. The corresponding F340/F380 ratio is presented (D) showing the impact of RES on cytosolic calcium concentrations. (E) Calcium imaging experiments performed on PS30 cells using Fluo-4 as a fluorescent Ca²⁺ dye (excitation, 470 nm; emission, 525 nm) showing Ca²⁺ response induced by RES (25 μM). (F) To determine whether Ca²⁺ response induced by RES was the result of a mobilization from the intracellular Ca²⁺ stores or of a Ca²⁺ entry, RES (25 μM) was applied to PS30 cells in Ca²⁺-free HBSS medium (0Ca²⁺) and in HBSS containing 2mM Ca²⁺ (2Ca²⁺) medium during Ca²⁺ imaging experiments using Fura-2 as a calcium probe. All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown.

Similarly, treatment of PS30 cells or primary cultured prostate CAF with the TRPA1 inhibitor for 5 min completely inhibited the RES-induced Ca^{2+} entry (Figures 3B and C), the response being restored when the inhibitor was removed from the medium (Figure 3B). Similar results were obtained by using A-967079 (1 μM), another specific inhibitor of TRPA1 (data not shown). In the same manner, knockdown of TRPA1 expression by short interference RNA (siRNA) prevented the Ca^{2+} entry induced by RES (Figure 3E).

These data show that TRPA1 channel is the main component of RES-induced calcium entry in PCa CAF.

These observations are surprising because RES is known to inhibit mouse and rat TRPA1 channel [20,21]. We thus studied the impact of RES on human wild type TRPA1 (wt-TRPA1) expressed by transfection in HEK293 cells. For this purpose, in calcium imaging experiments, the effects of AITC (30 μM) on intracellular calcium concentration was studied in the presence and absence of RES (25 μM) in HEK293 cells transiently transfected with human wt-TRPA1 expression vector (HEK-wtTRPA1). As shown in Figure 3F, in Ca^{2+} imaging studies performed on HEK293 cells expressing the human TRPA1 channel, the Allylthiocyanate (AITC, 30 μM)-induced calcium entry is inhibited by RES (25 μM) whereas in human prostate CAFs, RES activated the channel and failed to affect the Ca^{2+} entry induced by TRPA1 activators such as Allylthiocyanate (AITC, 30 μM) (Figure 3D).

Functional TRPA1 channels are expressed in prostate CAF cells

After the characterization of TRPA1 ion channel as the main target of RES, we investigated its expression in different human prostate cancer cells and CAF. These studies show that the channel is expressed in PS30 and in primary cultured prostate CAF (PrCsC) cells but its expression was absent in epithelial cancer cell lines (LNCaP, DU145, PC-3) and in primary cultured epithelial cancer cells (PrCEC) (Figure 4A). The protein expression of TRPA1 channel in PS30 and in primary cultured prostate CAF (PrCsC) was confirmed by western blot (Figure 4B) and by immunofluorescence studies (Figure 4C). The PS30 and primary cultured prostate CAF (PrCsC) were characterized by the

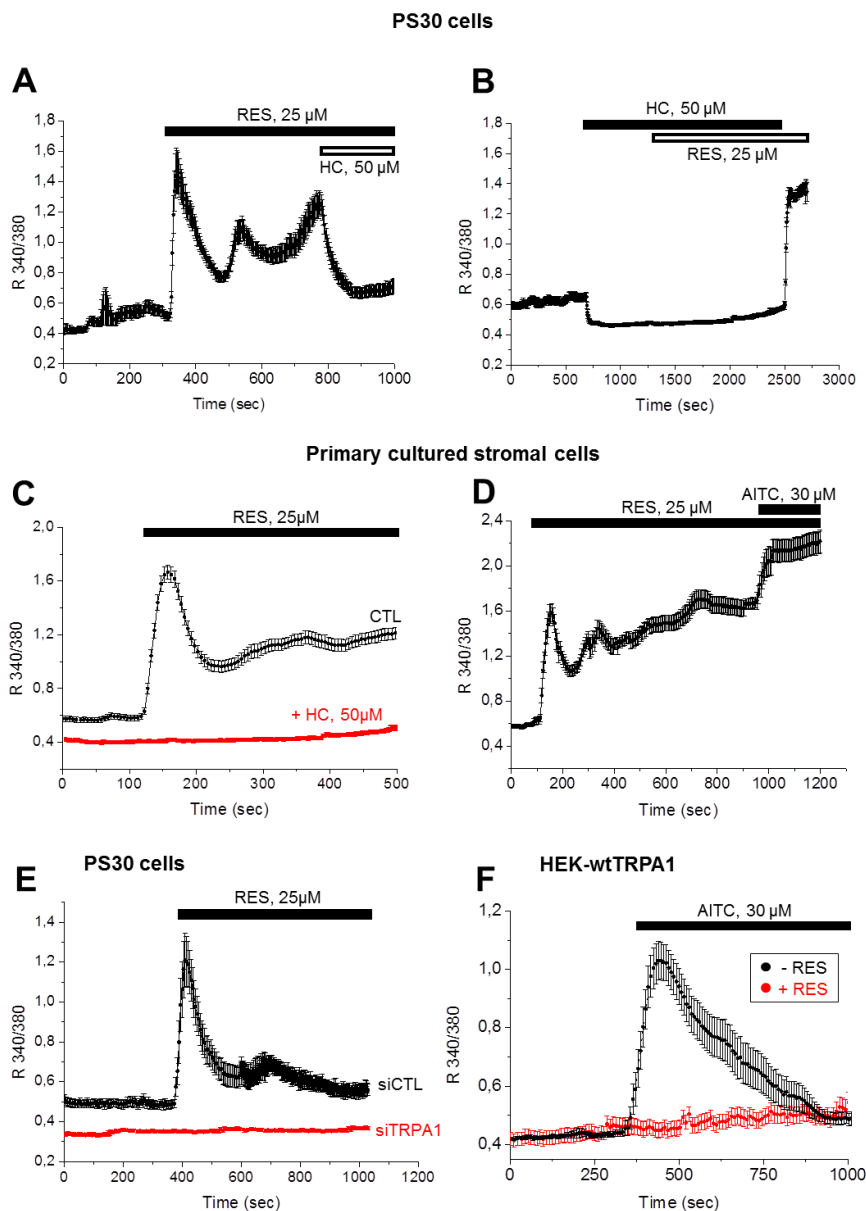


Figure 3: Resveratrol activates TRPA1 ion channel in prostate CAFs

Ca^{2+} imaging experiments showing the involvement of TRPA1 ion channel in RES-induced calcium entry in PS30 cell line (A, B) and in primary cultured PCa CAF (C). In the latter cells, the application of the RES induced a calcium response and failed to inhibit the AITC-induced activation of TRPA1 channel (D). The involvement of the TRPA1 channel is shown either by using the TRPA1 inhibitor (HC-030031, 50 μM) (A, B, C) or by the transfection of the cells by siTRPA1 in order to down-regulate the TRPA1 protein expression (E). TRPA1 involvement on the Ca^{2+} entry induced by RES was confirmed by Ca^{2+} imaging studies with the application of RES (20 μM) on PS30 cells transfected with siRNA directed against TRPA1 mRNA (siTRPA1, 25 nM for 48h) and siCTL (25 nM, 48h). The TRPA1 inhibitor (HC-030031, 50 μM) is applied either during the Ca^{2+} response (A) or before the application of RES (B, C). (F) In calcium imaging experiments, the effects of AITC (30 μM) on intracellular calcium concentration was studied in the presence and absence of RES (25 μM) in HEK293 cells transiently transfected with human wt-TRPA1 expression vector (HEK-wtTRPA1). All experiments were performed at least 3 times in 3 independent cell cultures and representative figures are shown.

expression of the CAF markers vimentin and α -actin as shown for PS30 cells in **Figure 4B** and **4C**. The functionality of TRPA1 channel in PS30 cells is confirmed in Ca^{2+} imaging

studies by the use of AITC, the activator of the channel. As shown in **Figure 4D** and **4E**, AITC induced a dose-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ($\text{EC}_{50} = 5.19 \mu\text{M}$) in PS30 cells which were inhibited by TRPA1 inhibitors (A-967079, HC-030031) (data not shown). Consistent with the TRPA1 expression studies, the application of either AITC ($30 \mu\text{M}$) or RES ($25 \mu\text{M}$) failed to induce a calcium response in PCa epithelial cell lines DU145, PC-3 or in LNCaP cells (**Figure 4F** and **4G**). In the latter cell line, at the

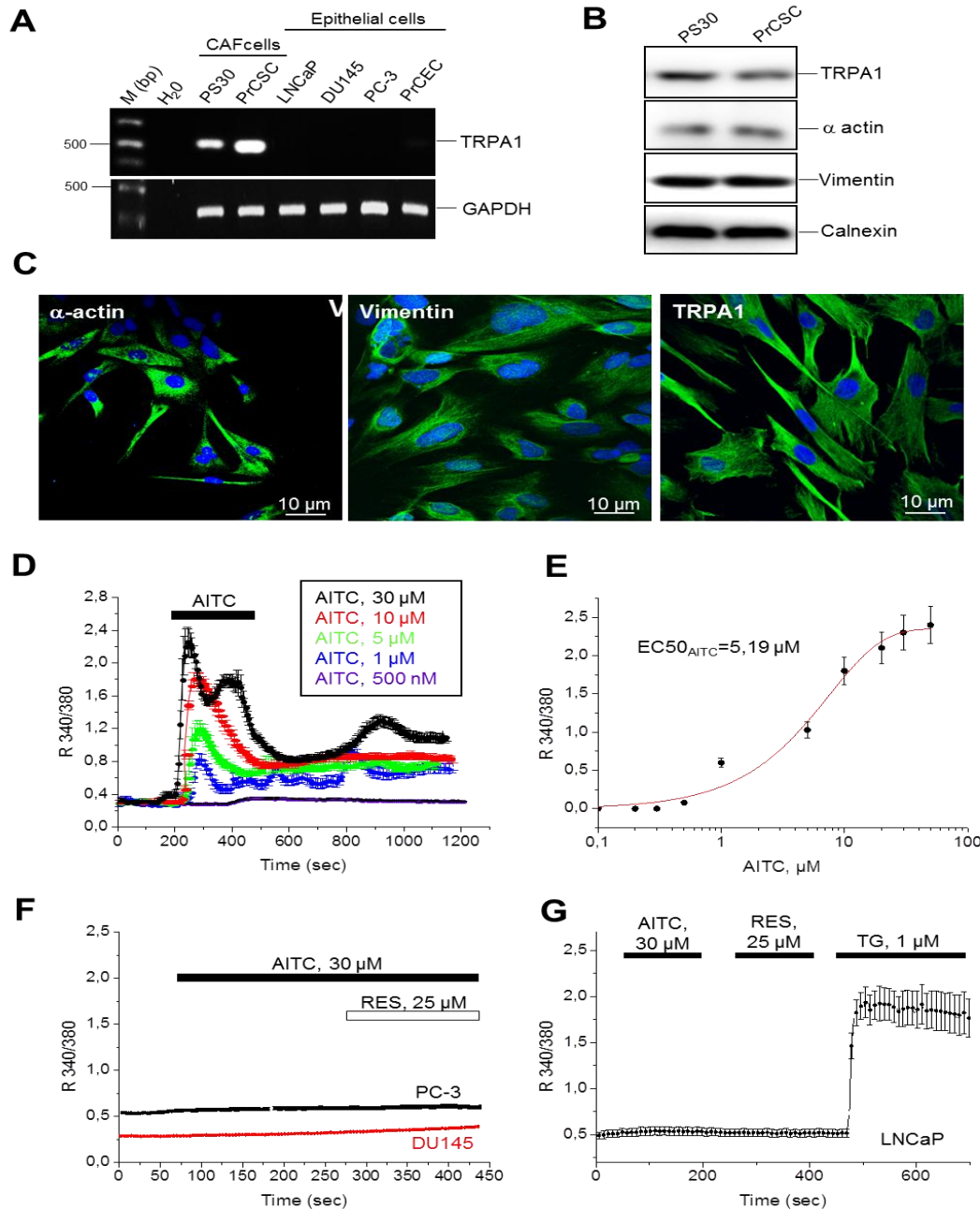


Figure 4: Human prostate CAFs express functional TRPA1 channel

(A) Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed to study the expression of TRPA1 (510 bp) mRNA using primers TRPA1-1 (see Table 1 for sequences) in PS30 cells, PrCSC (primary cultured CAF), epithelial prostate cancer cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3) and in hPEC (primary cultured prostate cancer epithelial cells). Protein expression of TRPA1 and myofibroblasts markers: α -actin and vimentin was studied by western blot in PS30 cells and PrCSC (B) and by immunofluorescence experiments in PS30 cells (C). (D) TRPA1 activation by concentrations (500 nM to $30 \mu\text{M}$) of AITC was Ca^{2+} imaging technique in PS30 cells. (E) Dose-response curve showing the amplitude of calcium response (TRPA1 activation) as a function of AITC concentrations ($\text{EC}_{50} = 5.19 \mu\text{M}$).

end of experiments, the calcium responsiveness of the cells was tested using Thapsigargin (TG, 1 μ M), a SERCA inhibitor known to induce depletion of the intracellular calcium stores and a subsequent store-operated calcium entry (SOCE) (Figure 4G).

Resveratrol affects epithelia-stromal paracrine interactions in prostate cancer through TRPA1 channel functionality

As mentioned, RES induced $[Ca^{2+}]_c$ increase by activating TRPA1 channel (Figure 3) and secretion of growth factors (HGF and VEGF) in human prostate CAF cells (Figure 1E and F). We further first investigated whether the channel was involved in the secretion of these factors. As shown in Fig. 5, TRPA1 inhibition by HC-030031 (50 μ M) prevented the RES-induced secretion of HGF (Figure 5A) and VEGF (Figure 5B). Interestingly, the TRPA1 inhibitor blocked the secretion of the growth factors by at least 50% suggesting the involvement of the channel also in basal secretion of growth factors. As a calcium increase is also known to induce gene expression, we studied whether RES induced growth factor gene

expression and whether the TRPA1 channel played a role in the effects of RES.

RT-PCR experiments showed that RES is able to increase HGF and VEGF expression (RES, 1 and 10 μ M, 48h), which is prevented by TRPA1 inhibition (HC-030031, 50 μ M) (Figure 5C). Taken together, these data suggest that the modulation of TRPA1 channel activity by RES could impact the epithelia-stromal paracrine interactions.

RES is shown to induce apoptosis in PCa epithelial cells LNCaP, PC-3 and DU145 cells. We thus studied whether the impact of RES on epithelial cancer cells is modified when co-cultured with CAF. By using the LNCaP cells alone, we initially studied the impact of RES on the apoptosis rate in LNCaP cells in our hands. As shown in Figure 5D, RES induced significantly an increase in apoptosis rate in LNCaP cells only at the high concentrations of 50 and 100 μ M with apoptosis rates of 34 to 46% respectively after a 72h of incubation (Figure 5D). We further used the concentration of 50 μ M RES in LNCaP/CAF co-culture experiments. Here, we utilized co-cultures between PS30 and LNCaP cells (Figure 5E),

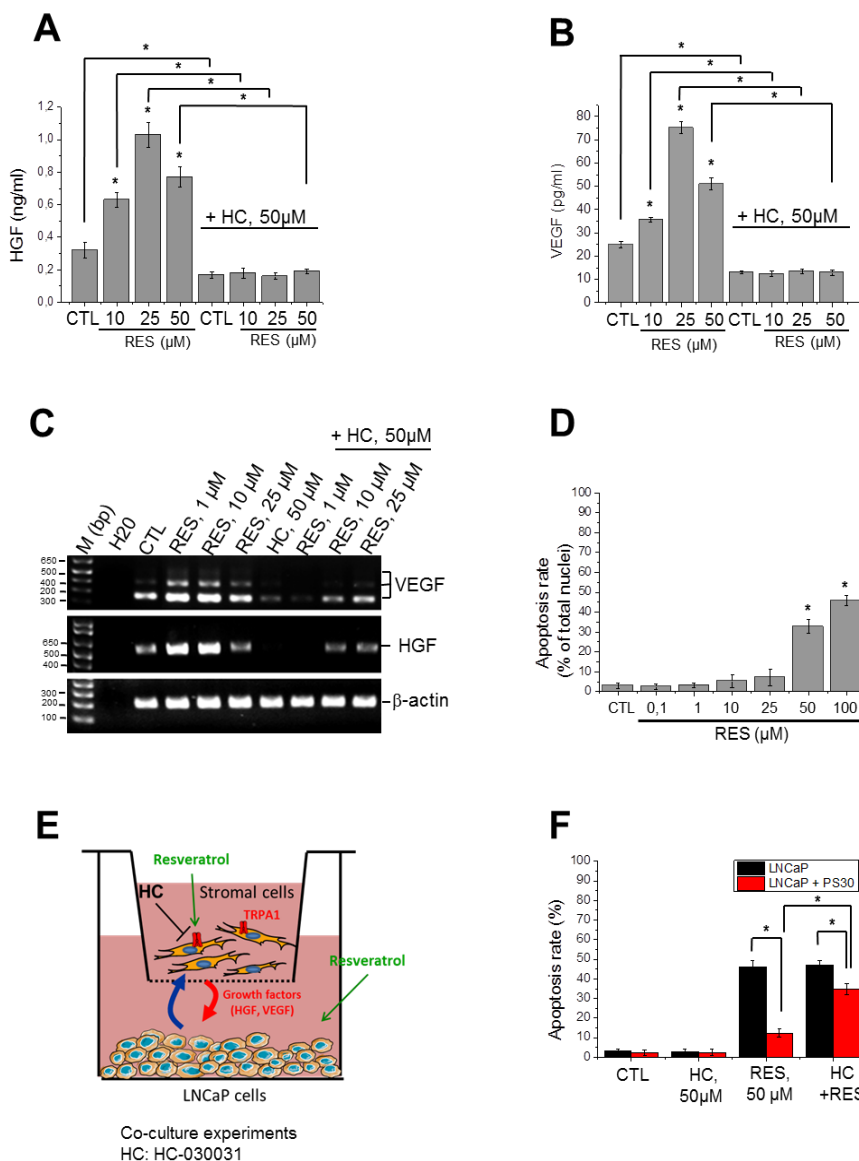


Figure 5: Resveratrol modulates growth factor secretion in prostate CAFs and participate to epithelio-stromal crosstalk through TRPA1 activation

In order to study whether TRPA1 was involved in the Ca^{2+} -dependent secretion induced by RES, PS30 cells were treated with RES at different concentrations (10, 25 and 50 μ M for 24h) in presence or absence of a TRPA1 inhibitor, (HC-030031 (50 μ M) then, conditioned media were processed by ELISA assays for the secretion rates of HGF (A) and VEGF (B). (C) Study of HGF and VEGF expression by RT-PCR experiments performed from mRNA of PS30 cells treated with RES at different concentrations (1, 10 and 25 μ M) in presence or absence of HC-030031 (50 μ M) for 48h. HGF and VEGF expression rates in each sample are normalized by densitometry studies using β -Actin expression as internal standard. (D) The impact of RES on apoptosis of LNCaP cells was assessed by Hoechst staining experiments. LNCaP cells treated for 72h with RES (0.1 to 100 μ M) were stained with Hoechst 33342 dye (4 μ g/mL) and apoptotic cells (with nuclear condensation) were evaluated then counted under a fluorescence microscope as described in Materials and Methods. (E) Schematic representation of the co-cultures between LNCaP cells and PS30 cells separated each other by an insert with pores of 0.4 μ m diameter. (F) A depiction of the co-cultures of LNCaP and PS30 cells. The two cell types were then treated with RES (50 μ M, 72h) in presence or absence of HC-030031 (50 μ M) in order to determine the impact of CAF and TRPA1 on apoptosis of LNCaP cells induced by RES (50 μ M). The rate of LNCaP cells apoptosis was determined by Hoechst staining experiments as described for (D). The data represent the mean \pm S.E. from three experiments performed in triplicate. * $p < 0.001$ compared with non-treated controls or with appropriate controls as shown on figures.

separated by an insert (pores diameter 0,4 μm), in order to study paracrine interactions between the two cell compartments treated with RES (50 μM) in presence or absence of HC-030031 (50 μM) for 72h. In these experiments, we observed that the presence of prostate CAFs decreased the apoptosis rate of LNCaP cells in the presence of RES by more than 3.7 fold compared to the control. Interestingly, TRPA1 inhibition by HC-030031 (50 μM) restored more than 74% of apoptosis normally induced by RES (Figure 5F) in LNCaP cells cultured alone.

Resveratrol activates mutated TRPA1 in CAF cells

As mouse, rat [20,21] and human (present study, Figure 3F) TRPA1 channels are inhibited while the channel expressed in PCa CAF is activated by RES, we hypothesized that the TRPA1 expressed in PCa CAF might present mutations and/or single-nucleotide polymorphisms (SNPs) rendering it activatable by RES. We thus cloned and sequenced the entire coding sequence of the channel in PS30 cells. For this, by RT-CR, we cloned separately the N-(1823 bp) and C-terminal (1950 bp) of the coding sequence for TRPA1 expressed in PS30 cells by using the forward and backward primers given in Table 1. The PCR products were then cloned in PGEM-T easy cloning vector (Promega, France) and then sequenced and translated to obtain the amino-acids sequences. The latter was then compared to the wild type TRPA1 amino-acids sequence (NM_007332).

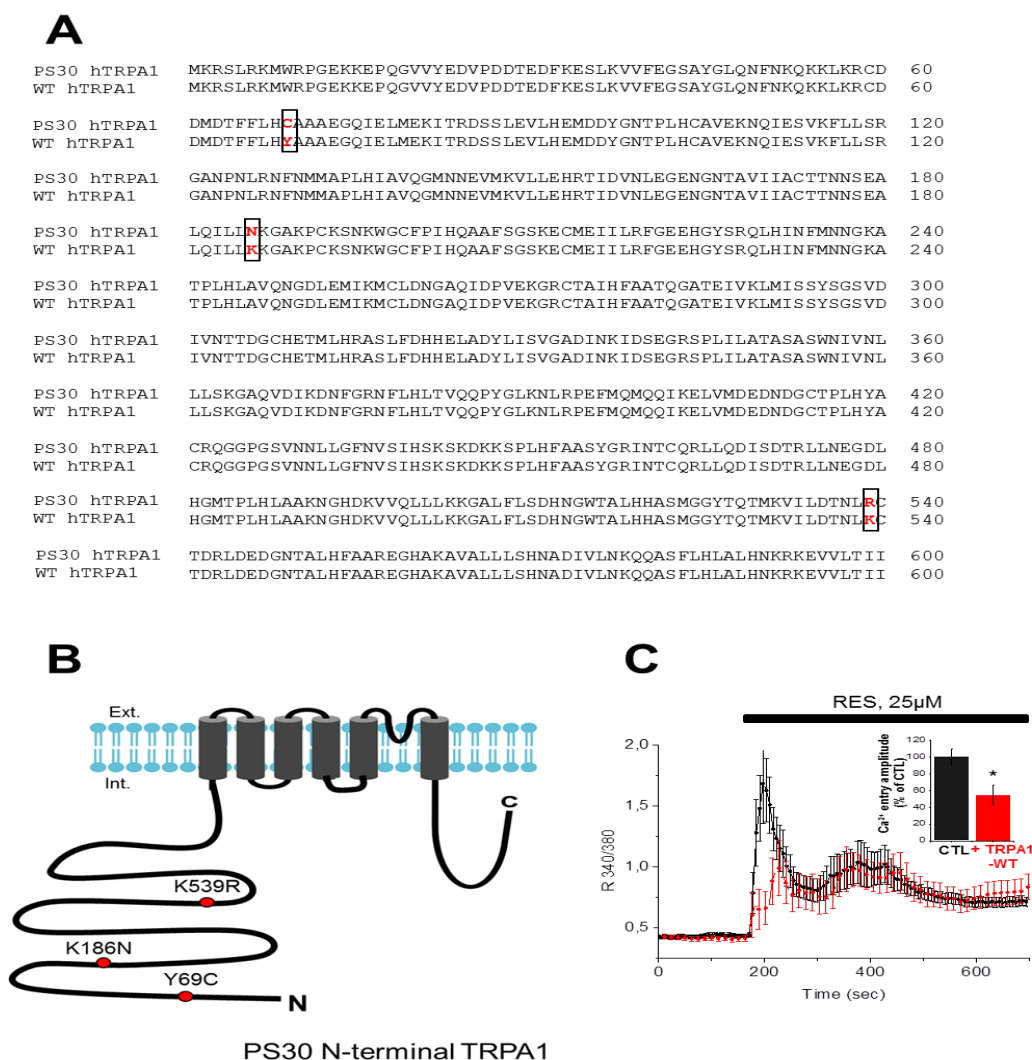


Figure 6: RES activates a mutated TRPA1 channel expressed in PS30 cells

(A) The entire cDNA sequence for TRPA1 expressed in PS30 cells was cloned by RT-PCR and sequenced as described in Materials and Methods. The resultant sequence was translated into the predicted amino acid sequence PS30 TRPA1 and aligned with the amino acid sequence of full length wild type hTRPA1 (accession number NM_007332). Boxed sequences represent mutated amino acids in PS30 TRPA1 sequence. As the mutations are observed in the N-terminal sequence of the PS30 TRPA1, only the sequence alignments of this region are shown. (B) Schematic localization of the mutations in TRPA1 channel expressed in PS30 cells comprising 2 SNPs (K186N and Y69C) and one mutation (K539R) in the N-terminal end. (C) In order to characterize the importance of TRPA1 channel expressed in PS30 cells in the Ca^{2+} response induced by RES (25 μM), the latter cells were transfected with the expression vector for wt-TRPA1, a channel inhibited by RES and then Ca^{2+} imaging experiments were performed to study the effects of RES and AITC in PS30 transfected cells.

Protein sequence alignments (Figure 6A) showed 1 mutation (K539R) and 2 SNPs (Y69C and K186N) (according to <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000104321>) in TRPA1 N-terminal domain known to be

actively involved in TRPA1 activation [22]. In these cloning and sequencing studies, the C-terminal domain amino acids sequences presented 100% identity with wt-hTRPA1 (Figure 6B). These mutations/SNPs might be involved in the sensitivity of the TRPA1 channel to RES. As the wt-TRPA1 is inhibited by RES, the expression of this form of the channel in PS30 cells should induce the formation of heterotetramers of PS30 TRPA1 and wt-hTRPA1. The formation of these heterotetramers might affect negatively the sensitivity of the endogenous mutated TRPA1 channels to RES in PS30 cells. To verify this, PS30 cells were transfected with either control vector (empty vector) or with the wt-hTRPA1 expression vector. For all transfection studies, the cells are co-transfected with GFP (Green Fluorescent Protein) expression vector in order to select the transfected cells for our studies. Forty-eight hours after transfections, the effects of RES (25 μ M) were investigated in control and wt-hTRPA1 transfected PS30 cells. In these studies, the amplitude of RES-induced Ca^{2+} entry was decreased by 46% (compared to the control cells) in PS30 cells transfected with the wt-hTRPA1 (Figure 6C). These data show that the activator effect of RES is reduced on TRPA1 heterotetramers formed by PS30 TRPA1 and wt-hTRPA1. Taken together, these data suggest that the TRPA1 channel activation by RES is specific to the PS30-expressed TRPA1, a channel mutated in the N-terminal domain.

DISCUSSION

Resveratrol (RES), a natural polyphenolic antioxidant has been reported to possess beneficial effects in pathologies including cancers. RES has been shown to present anti-carcinogenic effects by inducing cell cycle arrest, apoptosis and autophagy-mediated cell death in PCa cells [23-25]. However, these data obtained in *in vitro* studies on isolated epithelial cells, did not take in consideration the different cell components and their paracrine interactions in the TME. CAF are important cell component known for their secretion of growth factors and cytokines inducing cancer cell transformation and resistance to apoptosis. In this context, prostate CAFs can also interfere in the different cancer treatments used, like chemotherapy, by inducing apoptosis resistance in PCa cells. The effects of RES on cancer cells could thus be different in the TME where a permanent CAF-cancer cell interaction modulates the physiology of both cell components.

In the present work, for the first time, we studied the impact of RES on human PCa CAF. We showed that RES treatments of PCa CAF induced a reduction in

cell growth at high concentrations (>50 μ M) but failed to induce apoptosis in these cells. Interestingly, by using primary cultured CAF cells from human PCa and PS30 cell line, we showed that RES modulates also the expression and secretion of growth factors HGF and VEGF, two important paracrine factors in TME and involved in prostate cancer cell growth, cell migration and in tumor angiogenesis. A limited number of published work dealt with the impact of RES on fibroblast cells physiology. In accord with our data, RES failed to induce apoptosis in fibroblasts of different origins. Indeed, RES has been reported to be an antioxidant and to induce collagen I gene expression in human gingival fibroblasts without induction of apoptosis [26]. The non-apoptotic effects of RES in fibroblasts have been also reported by others. Giovannelli *et al* [27] reported protective effects of RES against senescence-associated changes in cultured human fibroblasts. Indeed, these authors showed protective effects against DNA oxidative damage, reduced senescence-associated increases in nuclear size and DNA content and a reduction in the levels of acetylated forms of H3 and H4 histones and p53 protein in cultured human fibroblasts MRC5. In our studies, we observed that high concentrations of RES induced an inhibition of CAF cells growth with modifications of the α -actin and vimentin expression suggesting a cell differentiation in PCa CAF. Consistent with our data, RES has been reported also to reduce both ANG II- and transforming growth factor-induced fibroblasts differentiation to the myofibroblast phenotype, indicated by a reduction in α -smooth muscle actin expression and stress fiber organization. This study suggests RES as an anti-fibrotic agent in the myocardium by limiting fibroblasts proliferation and differentiation, two critical steps in the pathogenesis of cardiac fibrosis [28].

In the present work, we observed that RES induced growth factors expression and secretion in PCa CAF (Figures 1E, 1F, 5C). These data suggest that the alimentary factor RES modulates *in situ* CAF-epithelial cells interactions *via* secreted factors. Moreover, in co-culture experiments, the RES-induced epithelial cells apoptosis was inhibited by at least 40%, showing clearly the protective impact of CAF on epithelial cells under RES treatments. In addition, according to the published data and our present data, only the high concentrations (50-100 μ M) of RES induced apoptosis in PCa cells. As the maximal serum concentrations of RES in humans was found to be around 1 to 2 μ M for the highest amounts of RES daily administered [29] the use of the *in vitro* data obtained on isolated cancer cells is questionable. Indeed, upon oral ingestion, the concentration of intact RES in the circulation is very low [30] due to rapid conjugation to sulphates and glucuronides serving as a reservoir of recoverable RES and depending of cell ability to remove sulphate groups with specific enzymes [31,32] which determine the final concentration available to the

targeted tissues. But, for these low RES concentrations found in human serum, we observed an increase in VEGF and HGF mRNA expression (RES 1 μ M) and secretion (RES 10 μ M) suggesting the existence of adverse effects of RES in the context of TME even at low concentrations.

Our data show that the basal and RES-induced secretions were Ca²⁺-dependent as shown by the use of BAPTA/AM, an intracellular calcium chelator (Figures 1E and F) and the TRPA1 calcium-permeable channel inhibitor HC-030031 (Figures 5A and 5B). These data show that the secretion in CAF involves ion channel or transporter activation. Ion channels are integral membrane proteins that form a pore to allow the passage of specific ions by passive diffusion. A rise in free cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) near the plasma membrane due to Ca²⁺ influx through the membrane Ca²⁺ channels is the main mechanism inducing exocytosis [10-12]. In cancers, the alterations in Ca²⁺ homeostasis due to the modulation of ion channels expression and activity can be essential in the carcinogenesis and/or its progression by modulating processes including cell growth, differentiation, migration or secretion. In this context, we showed that TRPA1 was activated by RES (Figures 2 and 3) to induce growth factor expression and secretion.

Transient receptor potential (TRP) ankyrin repeat 1 (TRPA1) is a Ca²⁺-permeable ion channel that senses acute and inflammatory pain signals as a nociceptor [33-35]. TRPA1 has already been shown to be activated by environmental irritants and oxidative- and thiol-reactive compounds, some of which are endogenously produced under oxidative stress conditions [36-38]. In particular, mutagenesis studies have identified that cysteine 414, cysteine 421, and cysteine 621 of human TRPA1 are targeted by electrophilic compounds such as mustard oil (MO) and cinnamaldehyde (CA) to activate TRPA1 [37,39]. On the other hand, non-electrophilic compounds like Δ 9-tetrahydrocannabinol, nicotine, and menthol also are shown to activate TRPA1 via unknown mechanisms [36,40,41]. Moreover, currently used clinical drugs such as acetaminophen, dihydropyridines, and general anaesthetics stimulate TRPA1, which may account for the clinical and adverse actions of these drugs [42-45]. Also, the antitumor drugs cisplatin (CIS) and oxaliplatin (OXA) activate TRPA1 via the generation of reactive oxygen species, which in turn may lead to peripheral neuropathy (PN) [46]. It is therefore noteworthy to investigate the effects of clinical drugs and experimental agents on the human TRPA1 channel. In the present study, we have shown that TRPA1 is expressed in primary cultured CAF cells from human PCa and PS30 cell line but not in PCa epithelial cells. Interestingly, we observed that TRPA1 activation by RES induced expression (Figure 5C) and secretion (Figures 5A and B) of growth factors as HGF and VEGF. This RES-induced gene expression can be mediated by the activation of the estrogen receptor

and/or Calcineurin/NFAT pathway activated by an increase in the Ca²⁺ concentration. Indeed, it has been shown that resveratrol is a phytoestrogen and that it exhibits variable degrees of estrogen receptor agonism and the receptor mediates the transcription activation induced by RES in different cell systems [47]. As shown in the present work, RES induces the activation of TRPA1 and Ca²⁺ entry. One of the possibilities of the transduction pathways induced by RES leading to gene expression is the activation of the Calcineurin/NFAT pathway activated by an increase in the Ca²⁺ concentration induced by the excitation of the TRPA1 channel. Indeed, we have shown that TRPA1 activation induces a translocation of NFATC3 leading to the gene expression (data under publication). As shown in figure 5, the RES-induced HGF and VEGF gene expression are inhibited by the TRPA1 inhibitor. These data suggest that the RES-induced gene expression in the PS30 cells is mediated by calcium-dependent mechanisms including the Calcineurin/NFAT pathway.

Taken together, our data suggest an important impact of RES in TME by the activation of TRPA1 calcium-permeable channel and a subsequent growth factor secretion which might modulate cancer cells growth, migration and resistance to apoptosis. Indeed, our present data show that at high concentrations (\geq 50 μ M), RES induced apoptosis in PCa epithelial cells LNCaP (Figure 5D) while this apoptosis is strongly decreased when LNCaP cells were co-cultured with PS30 cells. These data suggest that PCa CAFs promote apoptosis resistance to RES treatments (Figure 5E and F) through paracrine secretion pathways. TRPA1 being involved in growth factors secretion such as HGF and VEGF, our results show that the ion channel participates actively to this crosstalk allowing apoptosis resistance against RES and its inhibition with HC-030031 or A-967079 re-establishes the apoptosis rate observed in LNCaP cells cultured alone. Consequently, this work suggest that it is essential to study the effects of a molecule such as RES in the presence of the different cell components of the tumor microenvironment in order to accurately understand these effects on human prostate cancers.

Concerning the modulation of TRPA1 activity by RES, it has been shown that the mouse and rat ortholog of TRPA1 channels are inhibited by the polyphenol [20,21]. In the present work we show that RES also inhibits the wild type (WT) human TRPA1 (Figure 3F) but surprisingly, it activates the TRPA1 expressed in human prostate cancer CAF cells (Figure 3). These data are of importance because if the TRPA1 ion channel expressed in mouse and rat is inhibited by RES, it could interfere on epithelial-stromal crosstalk and reduce tumorigenesis in studies conducted in nude mice where only epithelial cancer cells are subcutaneously injected. To take in consideration this aspect, the human CAF such as PS30 cells which express a TRPA1 ion channel activated by RES, has to be co-injected with epithelial cancer cells to better mimic the human TME when

considering the PCa cells tumorigenesis studies. Thus, *in vivo* models using only human epithelial tumor cells without human cancer-associated stromal cells can constitute a severe limit in the evaluation of RES or other molecules efficacy against prostate cancer.

In the present study, in order to better understand the discrepancy between WT-hTRPA1 (inhibited by RES) and the PCa CAF-expressed TRPA1 (activated by RES), we cloned and sequenced the entire cDNA sequence for TRPA1 channel expressed in human PCa CAF cells. Compared to wt-hTRPA1, we observed 3 mutations in the N-terminal cytoplasmic domain of the channel (Figure 6). These mutations seem to be involved in the effects of the Resveratrol on CAF cells TRPA1. As mentioned above, according to the hTRPA1 SNP databases, two of the mutations (Y69C, K186N) were the SNP and one (K539R) a mutation. The amino acids modifications (SNP or mutations) in the N-terminal domain of hTRPA1 are known to modulate activation levels and sensitivity of the TRPA1 channel. Indeed, it has been described that the Y69C and K186N substitutions exhibited high expression and sensitivity to TRPA1 agonists. Indeed, in this report, a substitution in TRPA1 (Y69C) exhibited high expression/sensitivity to agonists [22]. These observations could explain the activation of TRPA1 expressed in human prostate CAFs while the wt-hTRPA1 is inhibited by the polyphenol. These data suggest also that, according the patients, differences in TRPA1 sequences could determine the potential efficacy of RES or other molecules used in PCa therapies and suggest the establishment of a personalized medicine taking into account the patient's protein expression profiles and environment. In the future, the high-throughput sequencing and detection of the mutations and/or SNPs could allow adapt treatments against PCa such as the targeting of the CAF TRPA1 channel along with the use of RES or other molecules as anti-cancer agents to induce the apoptosis of the PCa cells as suggested by the data presented in the present work.

In conclusion, we showed that RES induces expression and secretion of growth factors such as HGF and VEGF and that a mutated TRPA1 ion channel expressed in human PCa CAF promotes apoptosis resistance of PCa cells. This work also shows the importance of taking into consideration the human tumour microenvironment for the efficacy studies of molecules including RES in human PCa therapies which could be based on tumor-stroma paracrine interactions *via* the secretion of the growth factors and its modulation.

Acknowledgments

We would like to thank Dr A. Oganessian A, Department of Anesthesiology & Pain Medicine, University of Washington (Seattle, Washington, USA) for providing the PS30 cell line and E Richard for the

technical assistance in images analysis by confocal microscopy.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests

REFERENCES

1. Jang M, Cai L, Udeani GO et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275(5297):218-220.
2. Aziz MH, Nihal M, Fu VX, Jarrard DF, Ahmad N. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther* 2006;5(5):1335-1341.
3. Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM, Castellon EA. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J Androl* 2007;28(2):282-293.
4. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res* 2004;64(1):337-346.
5. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 2004;23(40):6702-6711.
6. Jazirehi AR, Bonavida B. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2004;3(1):71-84.
7. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411(6835):375-379.
8. Wernert N. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 1997;430(6):433-443.
9. Wernert N, Locherbach C, Wellmann A, Behrens P, Hugel A. Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. *Anticancer Res* 2001;21(4A):2259-2264.
10. Katz D. The Release of Neural Transmitter Substances. Liverpool University Press 1969.
11. Burgoyne RD. Mechanisms of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells. *J Physiol Pharmacol* 1995;46(3):273-283.
12. Neher E, Zucker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 1993;10(1):21-30.
13. Derouiche S, Warnier M, Mariot P et al. Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling. *Springerplus* 2013;2(1):54.
14. Carpenter SL, Goldman J, Sherman AK et al. Clinical variables and *Staphylococcus aureus* virulence factors associated with venous thromboembolism in children. *Thromb Res* 2016;138:69-73.
15. Price DT, Rudner X, Michelotti GA, Schwinn DA. Immortalization of a human prostate stromal cell line using a recombinant retroviral approach. *J Urol* 2000;164(6):2145-2150.

16. Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H, Denef C. Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology* 1999;140(10):4874-4885.
17. Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A et al. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* 2009;28(15):1792-1806.
18. Kopp RF, Leech CA, Roe MW. Resveratrol Interferes with Fura-2 Intracellular Calcium Measurements. *J Fluoresc* 2014;24(2):279-284.
19. Paudel RC, Kiviluoto S, Parys JB, Bultynck G. Resveratrol is not compatible with a Fura-2-based assay for measuring intracellular Ca(2)(+) signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;450(4):1626-1630.
20. Yu L, Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Modulation of TRP channels by resveratrol and other stilbenoids. *Mol Pain* 2013;9:3.
21. Nalli M, Ortari G, Moriello AS, Morera E, Di Marzo V, De Petrocellis L. TRPA1 channels as targets for resveratrol and related stilbenoids. *Bioorg Med Chem Lett* 2016;26(3):899-902.
22. Morgan K, Sadofsky LR, Morice AH. Genetic variants affecting human TRPA1 or TRPM8 structure can be classified in vitro as 'well expressed', 'poorly expressed' or 'salvageable'. *Biosci Rep* 2015;35(5).
23. Shih A, Zhang S, Cao HJ et al. Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- α . *Mol Cancer Ther* 2004;3(11):1355-1364.
24. Lin HY, Shih A, Davis FB et al. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *J Urol* 2002;168(2):748-755.
25. Selvaraj S, Sun Y, Sukumaran P, Singh BB. Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway. *Mol Carcinog* 2016;55(5):818-831.
26. Orihuela-Campos RC, Tamaki N, Mukai R et al. Biological impacts of resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine on oxidative stress in human gingival fibroblasts. *J Clin Biochem Nutr* 2015;56(3):220-227.
27. Giovannelli L, Pitozzi V, Jacomelli M et al. Protective effects of resveratrol against senescence-associated changes in cultured human fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011;66(1):9-18.
28. Olson ER, Naugle JE, Zhang X, Bomser JA, Meszaros JG. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(3):H1131-1138.
29. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 2004;32(12):1377-1382.
30. Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1215:9-15.
31. Miksits M, Wlcek K, Svoboda M et al. Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells. *Planta Med* 2009;75(11):1227-1230.
32. Andreadi C, Britton RG, Patel KR, Brown K. Resveratrol-sulfates provide an intracellular reservoir for generation of parent resveratrol, which induces autophagy in cancer cells. *Autophagy* 2014;10(3):524-525.
33. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 2006;124(6):1269-1282.
34. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 2006;50(2):277-289.
35. Obata K, Katsura H, Mizushima T et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 2005;115(9):2393-2401.
36. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004;427(6971):260-265.
37. Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ et al. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 2007;445(7127):541-545.
38. Story GM, Peier AM, Reeve AJ et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112(6):819-829.
39. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(51):19564-19568.
40. Karashima Y, Damann N, Prenen J et al. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 2007;27(37):9874-9884.
41. Talavera K, Gees M, Karashima Y et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci* 2009;12(10):1293-1299.
42. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L et al. TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Nat Commun* 2011;2:551.
43. Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)* 2008;2(6):429-438.
44. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(25):8784-8789.
45. Nassini R, Materazzi S, Andre E et al. Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. *FASEB J* 2010;24(12):4904-4916.
46. Nassini R, Gees M, Harrison S et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 2011;152(7):1621-1631.
47. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(25):14138-14143.

Discussion

Le cancer de la prostate est le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme après le cancer du poumon. En 2012, selon l'OMS, plus d'1.1 million d'hommes ont été diagnostiqués avec un cancer de la prostate dans le monde. Dans les pays développés, l'incidence du carcinome de la prostate s'accroît parallèlement à l'augmentation de l'espérance de vie. La croissance et le développement de cet organe étant sous contrôle androgénique, les traitements non chirurgicaux visent à empêcher la stimulation d'AR par différentes stratégies appelées hormonothérapie. Ces techniques employées couramment en clinique ont montré une grande efficacité avec plus de 94% des cancers qui répondaient à la suppression androgénique (Amaral *et al.*, 2012; Kahn *et al.*, 2014). Malheureusement, après une période moyenne de rémission de 2 à 3 ans, la tumeur parvient à s'adapter et à échapper au blocage hormonal passant à un état de cancer dit « castration-résistant » (Amaral *et al.*, 2012). A ce stade où le cancer est particulièrement agressif, la médiane de survie est comprise entre 18 et 24 mois (Attar *et al.*, 2009). En effet, les traitements employés à ce moment utilisant des agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine et le docétaxel couplés à un corticostéroïde, le prédnisone ne permettent que d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients sans réellement permettre une rémission du cancer.

Ces dernières années, les données de la littérature se sont intéressées au microenvironnement tumoral et au rôle que ce dernier pouvait jouer dans la cancérogenèse prostatique. Ce microenvironnement se caractérise principalement par le stroma tumoral appelé « stroma réactif » sous-jacent à la tumeur qui se formerait durant la néoplasie intra-épithéliale prostatique (Tuxhorn *et al.*, 2002) avec une forte diminution du taux de cellules musculaires lisses et une augmentation du nombre de fibroblastes particuliers appelés CAF (cancer-associated fibroblast) ou myofibroblastes (Hagglof et Bergh, 2012). Ces cellules en étroite collaboration avec les cellules tumorales, constituent le type cellulaire majoritaire du stroma réactif et ont un rôle très important dans la croissance et l'augmentation du potentiel métastatique des cellules cancéreuses épithéliales en remodelant la composition de la MEC mais également en sécrétant de nombreux facteurs de croissance et cytokines. En effet, il existe une communication étroite entre les cellules épithéliales tumorales et le stroma tumoral favorable au développement du cancer en dépit de l'absence d'androgènes et à l'acquisition de mécanismes de résistances des cellules tumorales face aux agents pharmacologiques employés. ***La connaissance de ces interactions et leur ciblage pourrait à long terme, permettre l'élaboration de thérapies nouvelles et efficaces pour le traitement de ces cancers.***

Des études récentes indiquent que les altérations de l'homéostasie calcique et la modulation de l'activité des canaux ioniques pourraient jouer un rôle essentiel dans la régulation des

grands processus physiologiques ainsi que la cancérogenèse (Prevarskaya *et al.*, 2007; Prevarskaya *et al.*, 2010; Prevarskaya *et al.*, 2011). En effet, il a été montré que l'augmentation de Ca^{2+} libre dans la cellule suivant l'ouverture des canaux ioniques cytosoliques était capable d'induire directement l'exocytose des vésicules contenant les hormones, facteurs de croissance et cytokines, le Ca^{2+} contrôlant la quantité et la cinétique des vésicules sécrétées (Berridge *et al.*, 2000; Martineau *et al.*, 2004; Gustavsson *et al.*, 2012). Dans ce contexte, de récents travaux du laboratoire ont montré qu'un canal ionique appartenant à la famille des TRP, le canal TRPA1, était spécifiquement exprimé au niveau des cellules stromales de cancers prostatiques. Le canal TRPA1 étant considéré comme un chimiosenseur capable d'être activé par de nombreuses molécules endogènes et environnementales, ce dernier pourrait jouer un rôle clé dans le microenvironnement tumoral en participant au processus d'exocytose des facteurs de croissance et cytokines. Ainsi, durant cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du canal TRPA1 dans la physiologie des cellules stromales ainsi que dans les interactions épithélio-stromales et la cancérogenèse de la prostate. *En effet, ce canal TRPA1 pourrait constituer une cible thérapeutique pour interférer sur le dialogue épithélium-stroma et la cancérogenèse prostatique mais également un marqueur pronostic intéressant des cancers de la prostate chez l'homme.*

I. Rôle du canal TRPA1 dans le microenvironnement tumoral prostatique

A. Physiologie des cellules stromales

Durant cette thèse, à partir des prélèvements de tissu prostatique humain issus de plusieurs patients atteints ou non de cancer, nous avons montré pour la première fois que le canal TRPA1 était spécifiquement exprimé dans le stroma tumoral prostatique, et plus particulièrement dans les fibroblastes associés au cancer (CAFs), son expression étant très faible voire inexistante dans les cellules épithéliales tumorales. Nous montrons également par des études d'imagerie calcique, de RT-PCR et d'ELISA, que le canal TRPA1 stromal est fonctionnel et que son activation permet une importante entrée de Ca^{2+} libre dans la cellule assurant la sécrétion et l'expression de facteurs de croissance comme l'HGF et le VEGF, facteurs connus pour favoriser la migration et l'invasion des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse.

1. Fonctionnalité du canal TRPA1

L'expression du canal dans les CAFs prostatiques et son rôle dans la sécrétion de facteurs de croissance est d'importance car le canal TRPA1 est connu pour directement être modulé par un grand nombre de molécules exogènes et endogènes. C'est le cas des molécules générées

par le stress oxydatif comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Andersson *et al.*, 2008), des lipides oxydés tels que le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) (Taylor-Clark *et al.*, 2008; Trevisan *et al.*, 2014) ou encore du formaldéhyde (Tong *et al.*, 2010), une molécule générée par les cellules cancéreuses constituant un potentiel facteur paracrine favorisant les interactions épithélio-stromales *via* l'activation du canal. De manière intéressante, plusieurs études récentes ont montré que l'activité du canal TRPA1 est aussi modulée *via* les voies de signalisation induites par l'activation des RCPG comme le récepteur à la bradykinine (BK). Selon le modèle cellulaire étudié, le type de RCPG activé et les voies de signalisation induites, les modes d'activation ou de sensibilisation du canal TRPA1 aux agonistes vont différer, le canal pouvant être activé par la PKA dans la voie de signalisation impliquant l'adénylate cyclase (Wang *et al.*, 2008), ou encore par les sous-unités $\beta\gamma$ constituant les protéines G capables de directement interagir avec le canal TRPA1 pour réguler son activité (Wilson *et al.*, 2011; Lieu *et al.*, 2014), et enfin le Ca²⁺ provenant des stocks calciques intracellulaires qui peut se lier directement au niveau du domaine EF-hand présent au niveau de l'extrémité N-terminal du canal TRPA1 pour permettre son ouverture et une entrée de Ca²⁺ consécutive dans la cellule (Jordt *et al.*, 2004). Dans ce contexte, nos études montrent que le canal TRPA1 est activé par des agonistes sécrétés par les cellules épithéliales tumorales comme l'Endothéline-1 (ET-1), l'influx calcique induit par l'ouverture du canal assurant l'expression et la sécrétion d'HGF et de VEGF.

L'ET-1, peptide vasoconstricteur exprimé et sécrété par les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes possède un rôle important dans la tumorigenèse prostatique, son expression étant associée à l'évolution du CaP (Nelson *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1996; Nelson et Carducci, 1999; Nelson *et al.*, 2003). L'ET-1 intervient dans de nombreux mécanismes propices au cancer tels que la prolifération (Kopetz *et al.*, 2002), la résistance à l'apoptose, l'invasion et la formation de métastases osseuses, des niveaux élevés d'ET-1 étant observés dans le plasma de patients atteints de CaP métastatique comparés aux individus sains ou avec des cancers à des stades moins avancés (Shichiri *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1995). Dans ce contexte, nous avons montré que l'ET-1, exprimé et sécrété par les cellules épithéliales tumorales prostatiques, activait le canal TRPA1 suivant la fixation sur son récepteur ET_A-R en induisant la voie de signalisation PLC β /IP₃, la fixation de l'IP₃ sur son récepteur IP₃R assurant la vidange des stocks calciques réticulaires dans le cytosol suivie par l'activation du canal TRPA1 et une augmentation significative de la concentration en Ca²⁺ libre intracellulaire. Ces résultats sont concordants avec une autre étude où le canal TRPA1 était impliqué dans les réactions de douleur spontanées modulées par l'ET-1, où de faibles doses d'ET-1 potentialisaient la nociception induite par le cinnamaldéhyde, un agoniste du

canal TRPA1 (Liang *et al.*, 2010). De manière intéressante, ces études sont complémentaires avec des travaux réalisés en parallèle où nous avons montré que l'ET-1 induisait également la voie de signalisation PLC β /IP $_3$ dans les cellules épithéliales tumorales prostatiques (Vancauwenberghe *et al.*, 2016). En effet, dans cette étude, l'ET-1 induisait une mobilisation des stocks calciques réticulaires suivie d'une entrée capacitive de Ca $^{2+}$ mettant en jeu d'autres canaux que le canal TRPA1 dont les canaux Orai1, TRPC1 et TRPV6 assurant la prolifération des cellules tumorales. Ces données sont importantes car d'une part, elles montrent qu'un même agoniste peut participer à la signalisation calcique de plusieurs types cellulaires simultanément, ici, les cellules tumorales et les CAFs et d'autre part que les canaux mis en jeu dans la signalisation calcique induite par l'ET-1 sont différents d'un type cellulaire à un autre. Ainsi, les récepteurs à l'ET-1 ainsi que le canal TRPA1 constituent des cibles intéressantes pour interférer dans les interactions épithélio-stromales du microenvironnement tumoral prostatique.

Par la suite, nous avons étudié plus en détail le mécanisme d'activation du canal TRPA1 suivant la vidange des stocks calciques réticulaires. En effet, l'activation du canal TRPA1 permettant un influx calcique secondaire à la déplétion des stocks calciques réticulaires, l'entrée de Ca $^{2+}$ dans la cellule permise grâce à l'ouverture du canal constitue une entrée capacitive de Ca $^{2+}$ ou SOCE (Store-Operated Calcium Entry) considérée comme la principale entrée de Ca $^{2+}$ dans les cellules non excitables impliquant dans de nombreux processus physiologiques (Putney, 2011). Ces résultats étaient confirmés en présence de thapsigargine (TG), un inhibiteur de la pompe SERCA, connu pour induire artificiellement le SOCE, en favorisant la vidange réticulaire *via* les canaux de fuite réticulaires constitutivement ouverts. Dans cette étude, nous avons montré d'une part que le canal TRPA1 constituait un canal SOC (Store-Operated Calcium) dans les CAFs prostatiques et d'autre part que le canal était directement activé par le Ca $^{2+}$ intracellulaire indépendamment de l'association entre les protéines STIM1 et Orai1, acteurs majoritaires du SOCE dans de nombreux modèles cellulaires. En effet, le Ca $^{2+}$ possède un rôle très important dans la régulation de l'activité du canal TRPA1 en l'activant directement et/ ou en le sensibilisant aux agonistes suite à sa fixation sur un domaine EF-hand présent au niveau du domaine Nter du canal. Ce domaine putatif est présent au niveau des Ankr entre les AA 466 et 479. En effet, des études électrophysiologiques et d'imagerie calcique ont montré que lorsque des mutations étaient induites dans cette zone, en particulier l'AA 474 (L474A), la sensibilité au Ca $^{2+}$ était supprimée et l'activation du canal suivant la vidange des stocks calciques réticulaires était diminuée de manière significative (Doerner *et al.*, 2007; Zurborg *et al.*, 2007). Ainsi, dans notre étude, par l'utilisation de mutants du canal TRPA1 pour son domaine EF-hand (L474A),

nous montrons que le Ca^{2+} intracellulaire provenant de la vidange du RE induit par l' IP_3 ou la TG est majoritairement responsable de l'activation du canal TRPA1 en se liant à son domaine EF-hand.

2. Sécrétion de facteurs de croissance

Par des études d'ELISA et de dot blot réalisées sur les milieux conditionnés des cellules stromales traitées ou non avec des activateurs (AITC) et des inhibiteurs du canal TRPA1 (HC-030031, A967079), nous avons montré que l'activation du canal TRPA1 permettait un influx calcique responsable de la sécrétion d'HGF et de VEGF, 2 facteurs de croissance ayant un rôle clé dans la tumorigenèse. A ce sujet, le rôle du canal TRPA1 dans la sécrétion a déjà été décrit dans d'autres modèles cellulaires et tissus comme les voies respiratoires nasales où le canal était impliqué dans la sécrétion de MUC5B (Alenmyr *et al.*, 2011) ou dans des cellules intestinales endocrines comme la lignée tumorale STC-1 (Secretin Tumor Cell line-1) où l'activation du canal permettait la sécrétion de cholecystokinine (CCK) (Purhonen *et al.*, 2008).

De manière intéressante, les expériences réalisées en présence de la sonde FM1-43 s'insérant dans le feuillet externe de la membrane plasmique afin de suivre le trafic membranaire intracellulaire en présence ou en absence de Ca^{2+} extracellulaire nous ont permis de confirmer que l'activation du canal TRPA1 intervenait dans un processus d'exocytose Ca^{2+} -dépendant et suppose que d'autres facteurs sont sécrétés en réponse à l'activation du canal. En effet, il est bien admis que le Ca^{2+} participe aux phénomènes de sécrétion contrôlés par une élévation du taux de Ca^{2+} cytosolique capable d'induire directement l'exocytose des vésicules contenant les hormones, facteurs de croissance, cytokines, neurotransmetteurs et autres peptides, le Ca^{2+} contrôlant la quantité et la cinétique des vésicules sécrétées (Berridge *et al.*, 2000; Martineau *et al.*, 2004; Gustavsson *et al.*, 2012). L'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, suivant l'ouverture des canaux calciques, va alors recruter et activer directement ou par l'intermédiaire d'effecteurs Ca^{2+} -senseurs (PKC, CaMK), les protéines intervenant dans le processus d'exocytose et formant le complexe SNARE (Synaptic-soluble NSF Attachment protein REceptor), assurant la fusion de vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique de manière à permettre leur libération dans le milieu extérieur (Mansvelder et Kits, 2000; Giannippoli *et al.*, 2006). De plus, le Ca^{2+} est capable d'activer directement plusieurs protéines accessoires associées aux phospholipides membranaires dont le rôle est d'améliorer la précision spatiale et temporelle des SNAREs conduisant l'exocytose. Ces protéines ont en commun un domaine C2, également possédé par PKC, qui tout comme le domaine EF-hand, est capable de directement lier le Ca^{2+} afin d'induire un changement de conformation de la protéine cible et favoriser l'exocytose (Barclay *et al.*, 2005).

Ainsi, par la suite, afin de déterminer le secrétome des CAFs en conditions basales et suivant l'activation du canal TRPA1, des études de « Human Growth Factor Antibody Array » seront réalisées. Ces études sont similaires à l'ELISA sandwich à la différence que ce sont des membranes qui sont utilisées à la place des plaques. Sur ces membranes sont disposés les anticorps d'intérêt de « capture » sur lesquels seront appliqués les milieux conditionnés des CAFs traités ou non avec l'activateur ou l'inhibiteur du canal TRPA1. Ainsi, suivant l'incubation avec les anticorps secondaires couplés à l'HRP, la présence des facteurs de croissance, cytokines, interleukines, MMP et protéines de la MEC sécrétés ou non suivant la modulation de l'activité du canal TRPA1 seront révélés sous forme de spots d'intensité plus ou moins importante par chimioluminescence.

B. Intervention du canal TRPA1 dans les interactions épithélio-stromales

Une fois activé par les cellules tumorales et inflammatoires, les CAFs vont en retour sécréter un grand nombre de protéines dont de nombreux composants de la MEC (comme les fibres de collagène, la fibronectine, la ténascine, la laminine, la galectine...) ainsi que des protéases, des facteurs de croissance et des cytokines qui vont promouvoir un environnement propice à la tumorigenèse, à l'angiogenèse, la formation de métastases et la résistance aux traitements employés (Hanson *et al.*, 2006; Cano *et al.*, 2007; Rodriguez-Canales *et al.*, 2007). Dans ce contexte, nous montrons que l'ouverture du canal TRPA1 exprimé par les CAFs induit une entrée libre de Ca^{2+} dans la cellule permettant l'expression et la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF.

L'HGF ou scatter factor qui agit *via* le récepteur transmembranaire c-Met exprimé par les cellules tumorales et endothéliales, est une cytokine capable de stimuler la prolifération, et en particulier, la motilité et la morphogenèse des cellules épithéliales (Takayama *et al.*, 1997) ainsi que l'angiogenèse (Bussolino *et al.*, 1992; Shojaei *et al.*, 2010). Dans les stades avancés de CaP, c-Met est surexprimé (Pisters *et al.*, 1995) et associé à une importante sécrétion d'HGF par le stroma réactif. Les voies de signalisation induites par l'HGF *via* l'activation de son récepteur c-Met, en particulier la voie PI3K/AKT, sont connues pour favoriser la progression tumorale et les métastases dans de nombreux cancers dont celui de la prostate. En effet, des taux élevés d'HGF dans le sang sont systématiquement observés chez les patients atteints de CaP ayant métastasé contrairement à des patients qui ont un cancer localisé (Gupta *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2009). Enfin, les voies de signalisation mises en place par l'axe HGF/c-Met constitue un des mécanismes communs de résistance des cellules tumorales contre les thérapies ciblées (Yu *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2015). Ainsi, par l'utilisation des milieux conditionnés et des co-cultures, nous avons étudié les effets de l'HGF et des sécrétions des CAFs sur les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques.

1. Induction de l'EMT

Après avoir identifié l'expression du récepteur c-Met dans les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes DU145 et PC-3, nous avons montré que l'HGF et le MC des CAFs prostatiques induisaient un changement morphologique des cellules DU145 associé à un remaniement de l'expression de nombreuses protéines, cette différenciation correspondant à une transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT. L'EMT est un processus particulier observé durant le développement ainsi que durant l'évolution de plusieurs cancers mettant en place un programme transcriptionnel épigénétique complexe qui va permettre aux cellules épithéliales tumorales d'acquérir des caractéristiques mésenchymateuses. Cela va se caractériser par la translocation nucléaire de facteurs de transcription comme Snai1 induisant la diminution des contacts intercellulaire en réprimant des protéines membranaires comme l'E-Cadhérine et l'acquisition de capacités invasives. Les cellules ayant subi l'EMT sont alors capables d'envahir la MEC puis de métastaser vers des organes distants où les cellules vont subir une transition inverse appelé transition mésenchymo-épithéliale (mesenchymal to epithelial transition, MET) afin de se redévelopper au sein de l'organe nouvellement colonisé (Acloque *et al.*, 2009; Thiery *et al.*, 2009). Ainsi, suivant l'activation du canal TRPA1, l'HGF et le MC sécrétés par les CAFs prostatiques induisent l'EMT des cellules DU145 favorisant leur caractère invasif et la résistance à l'apoptose normalement induite par les agents pharmacologiques employés contre ces dernières. En effet, en plus de participer aux métastases, il a aussi été montré dans certaines études que l'EMT participait à la résistance aux agents chimiothérapeutiques.

2. Rôle dans la résistance à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques

Dans un premier temps, par l'utilisation des milieux conditionnés et de l'HGF, des co-cultures 2D et 3D entre les CAFs prostatiques et les cellules épithéliales tumorales, nos travaux montrent que l'HGF et le sécrétome des CAFs prostatiques favorisent la résistance des cellules cancéreuses épithéliales à l'apoptose normalement induite par des agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine et le docétaxel, utilisés dans le traitement de nombreux cancers dont le sein et la prostate. Dans un deuxième temps, nos études *in vitro* ont montré que l'inhibition du canal TRPA1 avec HC-030031 diminuait fortement cette résistance à la thérapie acquise par les cellules épithéliales tumorales. En effet, l'inhibition du canal pourrait interférer sur le dialogue épithélio-stromal et resensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. Par conséquent, le ciblage du canal TRPA1 exprimé dans les CAFs pourrait interférer dans les interactions épithélio-stromales et être utilisé en combinaison avec les agents chimiothérapeutiques afin d'améliorer leur efficacité. En utilisant cette stratégie, il serait possible d'utiliser ces agents à de faibles

concentrations afin de réduire leur toxicité et améliorer la qualité et la durée de vie des patients. En effet, les neuropathies périphériques induites par les agents chimiothérapeutiques (CIPN, Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies) sont des effets secondaires majoritairement observés suivant l'utilisation des drogues de la famille des taxanes (paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel) avec des symptômes comprenant des douleurs, des paralysies, une dérégulation de la sensibilité thermique et mécanique ou encore des cas de paresthésie et de dysesthésie pouvant fortement altérer la qualité de vie des patients entraînant anxiété et dépression. De plus, ces symptômes peuvent durer plusieurs années après la fin des chimiothérapies ; les analgésiques et anesthésiques employés comme les opioïdes (Morphine et méthadone) étant encore insuffisants pour atténuer ces effets. De manière intéressante, une étude a montré que l'inhibition du canal TRPA1 (HC-030031 et acide α -lipoïque) réduisait de manière importante les CIPN dans des modèles de souris (Chen *et al.*, 2011; Trevisan *et al.*, 2013). Ainsi, en plus de potentialiser les effets des agents chimiothérapeutiques, l'inhibition du canal TRPA1 pourrait améliorer la qualité de vie des patients en diminuant des effets secondaires comme les CIPN. Dans ce contexte, 2 antagonistes pharmacologiques GRC 17536 (Glenmark) et HX100 (Hydra Biosciences) ont été développés pour traiter les patients atteints de douleurs liées aux neuropathies diabétiques ainsi que des patients atteints d'asthme qui ont montré des résultats prometteurs, les antagonistes étant respectivement en essais clinique de phase 2a et 1 et supportant le rôle du canal TRPA1 dans le traitement des CIPN. Enfin, en plus des avantages décrits ci-dessus, le ciblage du canal TRPA1 en combinaison avec les traitements actuels pourrait s'avérer intéressant car les mutations dans les CAFs sont rares contrairement aux cellules tumorales. En effet, il a été montré que les événements de mutations et de réarrangements chromosomiques étaient fréquents dans les cellules épithéliales tumorales et participaient activement à la résistance aux traitements de ces cellules (Hosein *et al.*, 2010; Palumbo *et al.*, 2015). Ainsi, le ciblage du canal TRPA1 stromal pourrait être une thérapie dont l'efficacité est davantage durable que les traitements employés contre les cellules tumorales comme les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase pour lesquels les cellules tumorales développent régulièrement des résistances.

De manière intéressante, d'autres travaux ont montré l'importance du ciblage des CAFs dans la chimio-sensibilisation d'autres cancers comme le cancer du pancréas. Dans ces études, les auteurs ont montré que l'activation de sst1, un récepteur de la somatostatine exprimé spécifiquement par les CAFs pancréatiques, inhibait la voie PI3K/mTOR/4E-BP1, constitutivement active dans les CAFs, avec pour effets, une inhibition de la synthèse protéique et de la sécrétion de facteurs solubles comme l'IL-6 bloquant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques. De plus, par des études *in vivo*,

l'utilisation de SOM230, un analogue multi-récepteur de la somatostatine, en combinaison avec la gemcitabine, un agent chimiothérapeutique, resensibilisait les cellules tumorales pancréatiques à la chimiothérapie, diminuant significativement le développement tumoral par une inhibition de croissance et l'induction d'apoptose dans ces cellules (Duluc *et al.*, 2015; Moatassim-Billah *et al.*, 2016). Ainsi, le ciblage du microenvironnement tumoral en association avec les agents pharmacologiques anti-tumoraux constitue une stratégie prometteuse dans le co-traitement des cancers comme les CaP et du pancréas.

Ayant montré que le MC des CAFs et l'HGF induisaient l'EMT et la résistance des cellules DU145 à l'apoptose normalement induite par les agents chimiothérapeutiques, il est possible qu'il existe un lien entre les 2 et que cette résistance soit acquise grâce au remodelage moléculaire conféré par l'EMT. En effet, quelques études se sont intéressées à cet aspect en étudiant l'EMT dans des modèles *in vivo* de souris transgéniques développant respectivement des cancers du sein [455] et du pancréas [456]. Dans ces modèles, l'EMT était un phénomène rare et n'était pas nécessairement un prérequis dans le processus de dissémination métastatique alors que suite à des traitements chimiothérapeutiques anti-prolifératifs comme le cyclophosphamide, la doxorubicine, le paclitaxel ou encore le fluorouracile, une forte augmentation de la fréquence d'EMT était observée avec une dissémination métastatique très importante, les cellules ayant subi l'EMT étant particulièrement résistantes aux agents chimiothérapeutiques. En effet, il a été observé dans les cellules ayant subi la transition, une diminution de la prolifération associée à une augmentation de nombreuses protéines (enzymes et transporteurs) intervenant dans la détoxification et la résistance des cellules aux agents pharmacologiques tels que les transporteurs Abcb1a et b, l'aldéhyde déshydrogénase ou encore le cytochrome P450 [455] prouvant par la même occasion que le ciblage de l'EMT en synergie avec les agents chimiothérapeutiques resensibilisait les cellules tumorales à l'apoptose et limitait fortement la dissémination de ces cellules. Dans ce contexte, il serait intéressant de confirmer nos résultats obtenus *in vitro* de resensibilisation des cellules tumorales à la mort cellulaire induite par la chimiothérapie suivant l'inhibition du canal TRPA1 (co-cultures et cultures 3D) en étudiant les effets synergiques induits par des inhibiteurs du canal TRPA1 (A967079) et des agents chimiothérapeutiques comme le docétaxel dans des modèles *in vivo*.

Enfin, nos études montrent l'importance de l'HGF *via* ses effets sur les cellules DU145, rendant également le ciblage de la voie HGF/cMet attractive. A ce sujet, des études précliniques ont reportés une signalisation anormale du récepteur c-Met dans plusieurs cancers suggérant le ciblage de la voie HGF/c-Met dans l'amélioration des thérapies actuelles.

Plusieurs stratégies ciblant c-Met dont l'utilisation d'inhibiteurs et d'anticorps ont montré des résultats encourageants durant les essais cliniques (Jun *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2013). Cependant, il est bien admis que le récepteur c-Met est exprimé dans de nombreux types cellulaires aussi bien dans les cellules normales que tumorales où les voies de signalisation mises en jeu par l'activation du récepteur participent activement à l'homéostasie cellulaire et tissulaire comme c'est le cas pour les os où la calcification et l'activité ostéoblastique dépendent de l'axe HGF/c-Met (Sharma et Adjei, 2011). Ainsi, en dépit de la potentielle efficacité des traitements ciblant les récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur c-Met, de potentiels effets secondaires particulièrement délétères peuvent être observés. C'est par exemple le cas du Sunitinib, un inhibiteur de VEGFR, PDGFR et c-kit, également impliqué dans l'inhibition de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), responsable d'une dérégulation de l'homéostasie métabolique dans le cœur menant à des problèmes cardiaques (Cheng et Force, 2010).

3. Induction du remodelage de l'expression des canaux ioniques et migration cellulaire

Parallèlement à l'induction de l'EMT et de la résistance aux agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine et le docétaxel, nos études montrent que l'HGF sécrété par les CAFs prostatiques induit un remodelage de l'expression de plusieurs canaux ioniques impliqués dans la signalisation calcique des cellules DU145. En effet, par des études de Western Blot et d'imagerie calcique, nous avons observé que de manière dose-dépendante, l'HGF entraînait une augmentation de l'expression des canaux potassiques Ca^{2+} dépendants IK_{Ca} et SK3 ainsi que du canal calcique Orai1 avec pour conséquence, une augmentation significative de l'entrée capacitive de Ca^{2+} . En effet, comme cela a été montré dans d'autres études, l'activation des canaux potassiques comme le canal à conductance intermédiaire IK_{Ca} permet une hyperpolarisation membranaire qui favorise la force électromotrice du Ca^{2+} et l'activation consécutive de canaux calciques voltage-indépendants assurant une entrée de Ca^{2+} dans la cellule modulant la physiologie cellulaire (Lallet-Daher *et al.*, 2009). Nos études sont concordantes avec des travaux réalisés dans d'autres modèles cellulaires où il a été montré que l'HGF favorisait l'expression de canaux ioniques comme le canal TRPV1 dans des cellules cancéreuses du foie (Vriens *et al.*, 2004) ou encore le canal potassique voltage-dépendant KCNA1 et le canal cationique TRPC6 dans des cellules tubulaires rénales (Rampino *et al.*, 2007). Ainsi, HGF/cMet mettant en jeu de nombreuses voies dont la voie des MAP Kinases et la voie PI3K/AKT, il est possible que l'expression des canaux IK_{Ca} , SK3 et Orai1 soit modulée positivement suite au recrutement et à la translocation nucléaire de facteurs de transcription comme le facteur NF- κ B dont le site de fixation est présent dans le

prometteur des gènes codant pour ces 3 protéines. En effet, des études ont montré que l'expression du canal Orai1 était modulé positivement par NF- κ B et que le SOCE était diminuait de manière significative lorsque les cellules étaient traitées avec des inhibiteurs de NF- κ B (Eylenstein *et al.*, 2012). Ainsi, il est possible que la voie PI3K/AKT induite par l'HGF favorise la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B, ce dernier se fixant sur les régions promotrices des gènes codant pour les canaux ioniques cités précédemment afin de favoriser leur expression et par la suite, augmenter le SOCE, responsable ici, de la migration des cellules tumorales. Cependant, l'implication de cette voie de signalisation dans l'expression des canaux ioniques nécessite davantage d'études.

Ces données sont importantes car ce remaniement peut intervenir à 2 niveaux constituant (1) un mécanisme permettant l'induction de l'EMT en modulant la signalisation calcique des cellules tumorales et/ou (2) une conséquence des voies de signalisation et de l'EMT mises en places par l'HGF et sa fixation sur cMet afin de favoriser des processus clés comme la migration et l'invasion. Dans ce contexte, l'expression de plusieurs canaux ioniques modulée par l'EMT a été décrite dans la littérature, c'est par exemple le cas des canaux TRPM7 (Davis *et al.*, 2014), TRPM8 (Liu *et al.*, 2014), du canal Orai1 et de la protéine STIM1 (Hu *et al.*, 2011) dans les cellules épithéliales tumorales mammaires ayant subi la transition ou encore le canal potassique voltage-dépendant EAG1 dans les cellules cancéreuses pulmonaires (Abdul et Hoosein, 2002).

Par ailleurs, il serait intéressant de comprendre le rôle du Ca^{2+} dans l'induction de l'EMT induite par l'HGF dans les cellules DU145. Une étude réalisée par Davis *et al.* (Davis *et al.*, 2014) a montré que le Ca^{2+} intracellulaire intervenait dans le processus d'EMT induite par l'EGF et l'hypoxie dans les cellules épithéliales cancéreuses mammaires notamment par une chélation du Ca^{2+} intracellulaire. Ainsi, par la suite, il serait intéressant de déterminer si le Ca^{2+} intracellulaire est bien impliqué dans l'induction de l'EMT des cellules DU145 et de comprendre comment le Ca^{2+} intracellulaire peut induire cette EMT notamment en étudiant la translocation nucléaire du facteur Snail après application d'HGF en présence ou en absence de Ca^{2+} intracellulaire.

La migration cellulaire étant bien connue pour être un processus Ca^{2+} -dépendant faisant intervenir un grand nombre de canaux ioniques et de transporteurs ainsi que de nombreux effecteurs Ca^{2+} -senseurs (Schwab *et al.*, 2012), nous montrons par la suite que d'une part, l'HGF et le MC des CAFs prostatiques induisent la migration des cellules épithéliales tumorales et d'autre part, que le canal potassique SK3 et le canal calcique Orai1 dont l'expression augmente sont impliqués dans cette migration. En effet, nous avons mis en

évidence que l'expression du canal SK3 augmente en fonction de l'évolution du cancer et que son inhibition diminue significativement l'entrée capacitive de Ca^{2+} avec pour conséquence une diminution nette de la migration cellulaire induite par l'HGF et le MC des CAFs. Dans ce contexte, l'implication des canaux SOC et de SK3 dans la migration a déjà été caractérisée dans d'autres cancers comme le cancer du sein (Yang *et al.*, 2009; Chantome *et al.*, 2013), où il a été montré que le canal potassique SK3 était capable de s'associer avec le canal Orai1 pour assurer l'entrée capacitive de Ca^{2+} favorisant l'activation de calpaïnes et assurant la migration des cellules tumorales. Cette association avec un autre canal intervenant dans l'entrée capacitive, le canal TRPV6, a également été montrée dans notre laboratoire avec un canal potassique activé par le Ca^{2+} , le canal IK_{Ca} dans les cellules cancéreuses épithéliales prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP où l'association des 2 protéines assurait un couplage fonctionnel. Dans cette étude, l'activation du canal à conductance intermédiaire IK_{Ca} permettait une hyperpolarisation membranaire qui favorisait la force électromotrice du Ca^{2+} et l'activation consécutive du canal TRPV6 assurant une entrée de Ca^{2+} dans la cellule et la prolifération cellulaire (Lallet-Daher *et al.*, 2009).

Ainsi, nos études mettent en exergue l'impact des facteurs de croissance sécrétés suite à l'activation du canal TRPA1 exprimé par les CAFs comme l'HGF dont la fixation sur son récepteur c-MET permet l'EMT des cellules épithéliales tumorales associé à un remaniement des canaux ioniques dans ces cellules et une augmentation de la motilité ainsi qu'une résistance à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques, montrant bien l'importance de cibler le canal TRPA1 dans les CaP.

II. Impact des facteurs environnementaux sur le microenvironnement tumoral : cas du resveratrol

Dans le cadre de l'amélioration des traitements contre le cancer en général, plusieurs molécules naturelles, provenant pour la plupart de l'alimentation et des végétaux ayant des propriétés anti-oxydantes, ont été proposées pour cibler les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral en association avec les thérapies existantes. C'est le cas du resveratrol, du curcumin, de la berbérine, de l'onionine A, de l'épigallocatechine gallate (EGCG), la génistéine, la naringénine, la pipérine ou encore le zerumbone (pour revue, voir (Casey *et al.*, 2015)). Ces substances ont été montrées dans diverses études être capables d'avoir une action chimiopréventive ou de diminuer la tumorigenèse en intervenant à plusieurs niveaux en inhibant la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species), en modulant diverses voies de signalisation des cellules tumorales

afin d'induire un arrêt de la prolifération et une apoptose cellulaire, en intervenant sur d'autres types cellulaires du microenvironnement tumoral comme la stimulation de l'activité pro-tumoral des macrophages ou encore en sensibilisant les cellules tumorales aux chimiothérapies (Casey *et al.*, 2015). Parmi les substances citées, le resveratrol (Yu *et al.*, 2013; Nalli *et al.*, 2016) et le curcumin ont été montrés agir comme des inhibiteurs du canal TRPA1, le curcumin activant le canal avant de le désensibiliser (Leamy *et al.*, 2011), tandis que la pipérine, alcaloïde et composé actif du poivre, agit comme un activateur du canal TRPA1 (Okumura *et al.*, 2010). Ainsi, nos travaux ayant montré que l'activation du canal favorisait un influx calcique permettant la sécrétion de facteurs de croissance et que son inhibition resensibilisait les cellules tumorales à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques dans des modèles *in vitro*, nous nous sommes intéressés au rôle du resveratrol (RES) dans la modulation de l'activité du canal TRPA1 exprimé par les CAFs prostatiques.

En effet, plusieurs études ont montré que le resveratrol, polyphénol naturel et antioxydant, issu du vin rouge et du raisin, induisait l'apoptose dans les cellules issues des lignées épithéliales cancéreuses prostatiques comme les LNCaP et les PC-3 (Aziz *et al.*, 2006; Benitez *et al.*, 2007) et sensibilisait les cellules LNCaP à l'apoptose induite par TRAIL et les agents chimiothérapeutiques notamment en diminuant l'expression de la survivine et en altérant l'expression des protéines de la famille Bcl-2 (Fulda et Debatin, 2004; Fulda et Debatin, 2004; Jazirehi et Bonavida, 2004). Dans ce contexte, nous avons montré que le RES induisait bien la mort cellulaire des cellules LNCaP à des concentrations importantes mais que ce n'était pas le cas lorsque ces cellules étaient cultivées en présence des CAFs prostatiques. Ces résultats sont importants car ils mettent en exergue l'importance de prendre en considération les interactions existantes entre les cellules épithéliales cancéreuses et les autres types cellulaires composant le stroma tumoral dans le cadre des traitements employés et l'efficacité des molécules naturels et pharmacologiques sur les cellules tumorales. En effet, nous avons montré d'une part que l'interaction épithélio-stromale altérait les effets apoptotiques du RES sur les cellules tumorales mais également, de manière intéressante, que ces effets passaient par l'activation du canal TRPA1.

En effet, contrairement à son rôle inhibiteur dans les formes exprimées chez le rat et la souris, nous avons montré que le RES induisait l'ouverture du canal TRPA1 stromal assurant une entrée de Ca^{2+} libre dans la cellule et la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF et le VEGF, l'inhibition du canal resensibilisant les cellules LNCaP à l'apoptose induite par le RES. De plus, nous avons découverts que ce mécanisme d'activation du canal TRPA1 par le RES était spécifique à la forme exprimée par les CAFs prostatiques, la forme wild-type (wt) humaine du canal étant inhibée tout comme les formes orthologues exprimées chez le rat et la

souris. Ainsi, par séquençage des CAFs prostatiques issus des prélèvements de différents patients atteints de CaP, nous avons identifié la présence de polymorphismes et d'une mutation au niveau du domaine Nter du canal TRPA1 potentiellement responsables de la modification de la sensibilité du canal au RES, l'extrémité N-ter étant extrêmement importante dans la régulation de l'activité de ce dernier. Parmi les polymorphismes observés, 2 d'entre eux (Y69C et K186N) ont été caractérisées par Morgan *et al.* (Morgan *et al.*, 2015) et Deering-Rice *et al.* (Deering-Rice *et al.*, 2015) qui ont montré que ces polymorphismes modifiaient significativement l'expression, l'activité et la sensibilité du canal aux agonistes. Afin d'identifier quels polymorphismes sont responsables de l'activation du canal TRPA1 par le RES, des études sont actuellement en cours afin de tester par imagerie calcique, l'effet du RES sur les formes du canal TRPA1 possédant le polymorphisme Y69C ou K186N. Par la suite, **nous chercherons également à savoir s'il existe un lien entre les CaP et les polymorphismes que nous avons observé et si ces polymorphismes modifient la sensibilité du canal à d'autres agonistes que le RES.**

Nos travaux suggèrent que l'utilisation des molécules naturelles comme le RES associé ou non à d'autres traitements doit à la fois prendre en compte le microenvironnement tumoral et les interactions existantes en son sein ainsi que les caractéristiques génétiques des acteurs moléculaires intervenant dans la tumorigenèse. Ces données sont importantes car le canal TRPA1 constitue une alarme sensorielle modulée par un grand nombre de molécules environnementales et endogènes dont l'impact sera différent d'un individu à l'autre en fonction des différences génétiques interindividuelles dont font parties les SNPs. La médecine devenant de plus en plus personnalisée et prenant en compte les interactions entre l'environnement et les gènes, la connaissance de ces polymorphismes par un séquençage individuel permettrait de prescrire un traitement adapté aux patients afin d'optimiser les thérapies utilisées et d'éviter l'utilisation ou l'ingestion de molécules interférant dans l'efficacité attendue.

III. Modulation de l'expression du canal TRPA1 : Impact des stéroïdes

En plus de moduler l'activité du canal *via* les voies de transduction comme la voie PLC β /IP $_3$ ou la voie Adénylate Cyclase (AC)/ Protéine Kinase A (PKA) (Wang *et al.*, 2008), nous avons montré que les agonistes sécrétés par les cellules épithéliales tumorales et endothéliales comme l'ET-1 ou les médiateurs de l'inflammation comme la BK favorisent l'expression du canal TRPA1. L'analyse du promoteur du gène *trpa1* montre plusieurs sites de fixations de facteurs de transcription tels que NF-AT, NF- κ B, PPAR γ , HIF1 α ou encore les récepteurs aux androgènes AR et aux œstrogènes ER- α qui pourraient réguler positivement l'expression génique du canal TRPA1. Ces facteurs de transcription sont pour la plupart des acteurs majeurs de la cancérogenèse et sont pour la plupart activés par des conditions propices au cancer comme c'est le cas pour l'hypoxie et HIF1 α (Kimbrow et Simons, 2006) de même que les hormones stéroïdes dont la concentration varie en fonction de l'évolution des CaP. En effet, il est bien admis dans la littérature que l'expression d'AR exprimé par les cellules stromales diminue suivant l'évolution du cancer alors que le taux d'œstrogènes et l'expression d'ER α stromal augmente (Harkonen et Makela, 2004). Dans ce contexte, nous avons étudié par des études de western blot, l'impact de la DHT et de l'œstradiol (E $_2$) à différentes concentrations sur l'expression du canal exprimé par les CAFs (Figure 41). Nos résultats montrent que de faibles concentrations en DHT (10 $^{-10}$ M) augmentent l'expression du canal TRPA1 alors que des concentrations plus importantes de l'ordre de 10 $^{-8}$ M le répriment totalement. Cela suggère que l'hormonothérapie visant à réduire le taux d'androgènes

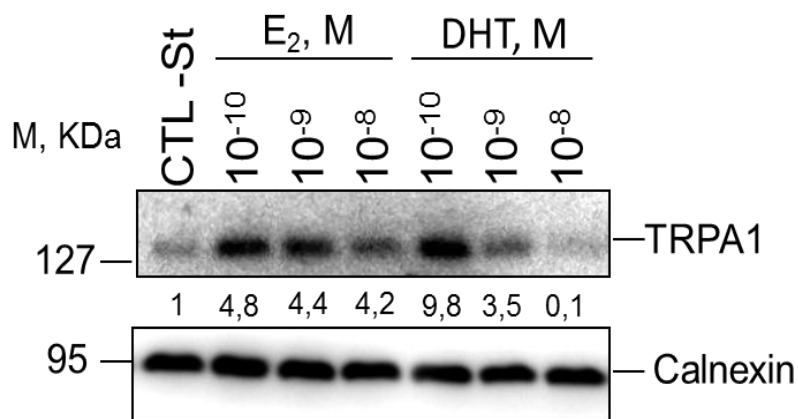


Figure 41 : Modulation de l'expression du canal TRPA1 exprimé par les CAFs prostatiques par les hormones stéroïdiennes à différentes concentrations. Le taux d'expression du canal TRPA1 pour chaque échantillon a été normalisé par des études de densitométrie utilisant la calnexine comme standard interne

circulants est favorable à l'expression du canal TRPA1 et donc à la sécrétion de facteurs de croissance propice au cancer en dépit du traitement administré. De plus, l'E₂ à des concentrations respectives de 10⁻¹⁰M et 10⁻⁹M favorise également l'expression du canal TRPA1 montrant bien l'impact des hormones stéroïdiennes dans la régulation de l'expression du canal. Des études complémentaires sont nécessaires afin de vérifier si cet effet transcriptionnel *via* les stéroïdes passe par leurs récepteurs respectifs AR et ER, notamment par l'utilisation d'inhibiteurs d'AR et d'ER comme le bicalutamide (casodex) et le raloxifène (Evista).

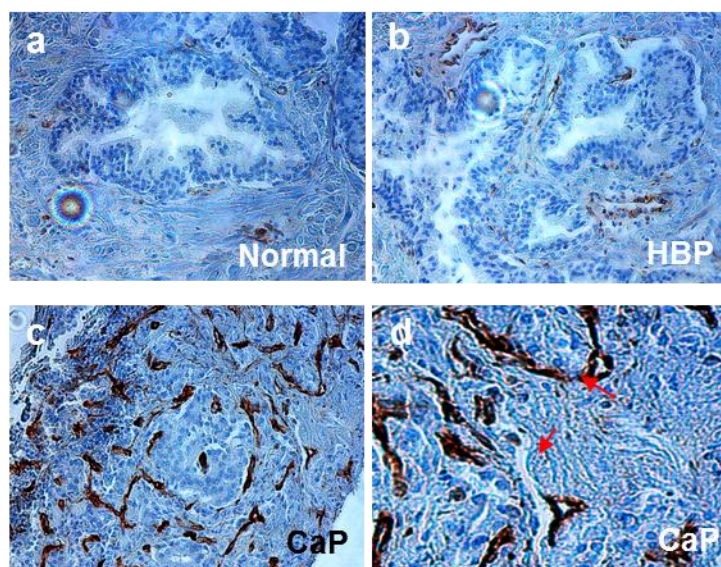
IV. Rôle du canal TRPA1 dans la physiologie des cellules endothéliales

Nous avons montré que l'expression du canal TRPA1 dans le stroma tumoral prostatique concernait principalement les fibroblastes associés au cancer ou CAFs, cellules participant activement au développement du cancer et à la formation de métastases, caractérisés par leur morphologie ainsi que par l'expression de l' α -actine et de la vimentine. Cependant, lors de cette thèse, des études réalisées en parallèle nous ont également permis d'observer une expression importante du canal TRPA1 dans les micro-vaisseaux présents au sein du CaP (Figure 42A) et plus particulièrement au niveau des cellules endothéliales les constituant, caractérisés par l'expression des marqueurs CD31, CD34 et VWF.

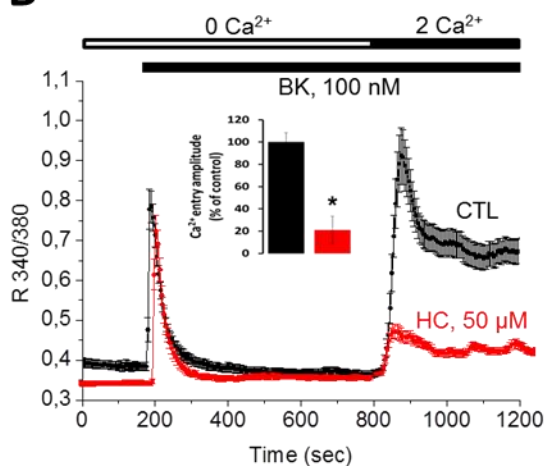
En effet, comme pour les CAFs, des études d'imagerie calcique sur des cellules endothéliales des cancers prostatiques en culture primaire nous ont permis de montrer que le canal exprimé par les cellules endothéliales était fonctionnel et activé par les voies de transduction induites par des médiateurs de l'inflammation comme la bradykinine (Figures 42B et C), hormone peptidique vasodilatatrice connue comme un agoniste des cellules endothéliales et dont le rôle dans l'activation du canal TRPA1 est bien connu dans la littérature. L'activation des récepteurs à la BK induit l'ouverture du canal TRPA1, probablement par le mécanisme que nous avons décrit dans les CAF, permettant alors une entrée de Ca²⁺ libre dans les cellules endothéliales associées au CaP. Nous avons observé que dans ces cellules, le canal TRPA1 favorisait la migration et la prolifération et la sécrétion de l'ET-1 agissant à la fois sur les CAFs et les cellules épithéliales tumorales comme nous l'avons montré dans les travaux précédemment décrits dans ce manuscrit. Ces rôles joués par le canal TRPA1 dans les cellules endothéliales suggèrent son implication potentielle dans l'angiogenèse (manuscrit en cours de préparation). Des études sont actuellement en cours visant à étudier l'expression du canal TRPA1 dans les vaisseaux tumoraux selon l'évolution des cancers prostatiques. Ces données sont importantes car elles montrent l'importance du canal TRPA1 dans le

microenvironnement tumoral prostatique étant à la fois exprimé dans les CAFs et les cellules endothéliales associées au cancer. Ainsi, le ciblage du canal TRPA1 par l'utilisation d'inhibiteurs ou d'anticorps spécifiques dirigés contre ce dernier en combinaison avec les thérapies actuelles pourraient interférer sur les interactions épithélio-stromales et améliorer les traitements faisant du canal TRPA1 une cible de choix dans le traitement des CaP. Cependant, des études complémentaires, en particulier des études *in vivo* sont nécessaires afin de confirmer le rôle du canal dans le développement tumoral et la chimio-résistance des cellules tumorales.

A



B



C

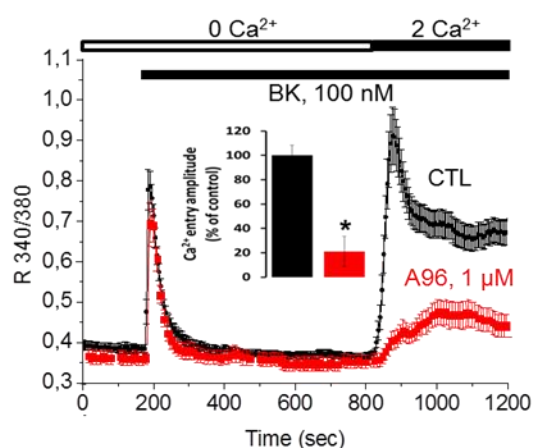


Figure 42 : Expression et fonctionnalité du canal TRPA1 dans les cellules endothéliales associées au CaP. (A) L'expression du canal TRPA1 a été étudiée par immunohistochimie en utilisant un anticorps dirigé contre le canal TRPA1 sur des tissus humains non-cancéreux (régions saines) (a) des tissus d'hyperplasie bénigne prostatique (HBP) (b) et des tissus cancéreux prostatiques (c). L'implication du canal TRPA1 dans la réponse calcique induite par la voie de la signalisation de la bradykinine (BK, 100 nM) a été déterminée par des expériences d'imagerie calcique en présence ou en absence des inhibiteurs du canal TRPA1 : HC-030031, 50 μM (B) et A967079, 1 μM (C).

Perspectives

I. Confirmer le rôle du canal TRPA1 dans le microenvironnement tumoral par des études du développement tumoral

Des données obtenues au cours de cette thèse et décrites pour la plupart dans ce manuscrit de thèse suggèrent que le canal TRPA1 peut favoriser le développement tumoral. De plus, plus récemment, nous avons montré son expression également au niveau de vaisseaux tumoraux où le canal favorise la prolifération, la migration et la sécrétion de facteurs comme l'ET-1 intervenant dans la signalisation calcique de ces cellules. De par l'expression du canal dans les CAFs et les cellules endothéliales associées au cancer formant les vaisseaux, le canal TRPA1 pourrait potentiellement favoriser le développement tumoral. Dans ces études de développement tumoral, nous pourrions également confirmer l'intervention du canal dans la résistance à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. Si ces études montrent l'intervention du canal dans le développement tumoral et la chimio-résistance, on pourrait proposer le canal TRPA1 comme une cible pour les co-traitements des cancers prostatiques (et peut-être d'autres cancers comme les cancers mammaires et pancréatiques). Dans ce contexte, des sociétés pharmaceutiques ont développés des antagonistes du canal comme GRC 17536 (Glenmark) et HX100 (Hydra Biosciences) utilisés pour traiter les patients atteints de douleurs liées aux neuropathies diabétiques ainsi que des patients atteints d'asthme qui ont montré des résultats prometteurs, les antagonistes étant respectivement en essais clinique de phase 2a et 1. Ces inhibiteurs à long terme, pourraient être utilisés pour les traitements ou co-traitements des cancers prostatiques ainsi que d'autres cancers. En effet, en plus d'augmenter l'efficacité des agents chimiothérapeutiques, l'inhibition du canal TRPA1 par l'utilisation de ces antagonistes pourrait atténuer les effets secondaires liés à ces agents comme c'est le cas pour les neuropathies périphériques où il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs du canal (HC-030031, acide α -lipoïque) réduisait fortement les CIPN dans d'autres modèles de souris (Chen *et al.*, 2011; Trevisan *et al.*, 2013).

Dans le cadre des études du développement tumoral, l'utilisation des modèles animaux développant spontanément des tumeurs prostatiques serait d'une aide précieuse et indiscutable. Plusieurs modèles de développement de cancers spontanés existent comme notamment le modèle TRAMP, le modèle PTEN et le modèle PSP-KIMAP. Dans ce dernier modèle, les souris transgéniques PSP-KIMAP ont subi un Knock-In pour le gène codant pour PSP94 (prostate secretory protein of 94 amino acids) spécifiquement exprimé dans les cellules épithéliales prostatiques remplacé par le gène codant pour l'antigène SV40T hautement oncogénique qui forment des tumeurs prostatiques spontanées dont les caractéristiques sont très proches des carcinomes prostatiques humains. et qui sont capables de former des PIN

ainsi que des métastases au niveau des os, des nœuds lymphatiques, des poumons et du foie (Duan *et al.*, 2005). L'avantage de ces souris transgéniques tient dans le fait que contrairement à des modèles d'injection sous-cutanées et de xéno greffes de 1 à 2 types cellulaires, l'ensemble du microenvironnement tumoral et de l'interactome est présent, accentuant la proximité avec le modèle humain et permettant de mieux caractériser l'impact du canal TRPA1 dans les interactions épithélio-stromales des CaP.

Récemment dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Thierry Capiod (INSERM U1151, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Paris), nous avons eu accès à des tissus prostatiques de souris contrôle et de souris PSP-KIMAP ayant développé des tumeurs. Comme le montre la figure 43, de façon très intéressante, nous avons observé l'expression du canal dans les tissus prostatiques de souris KIMAP au niveau des CAFs et des vaisseaux prostatiques. Les études seront poursuivies par la suite pour confirmer l'utilisation du modèle KIMAP pour études du rôle du canal TRPA1 dans le développement tumoral. Ce modèle pourra également être utilisé pour des études ciblant le canal TRPA1 par l'utilisation de plusieurs approches dont (1) le traitement des souris KIMAP avec un inhibiteur pharmacologique du canal TRPA1, A967079 et (2) avec des siRNA dirigés contre les ARNm codant pour le canal TRPA1. De même, il serait possible dans le cadre d'une collaboration avec un autre

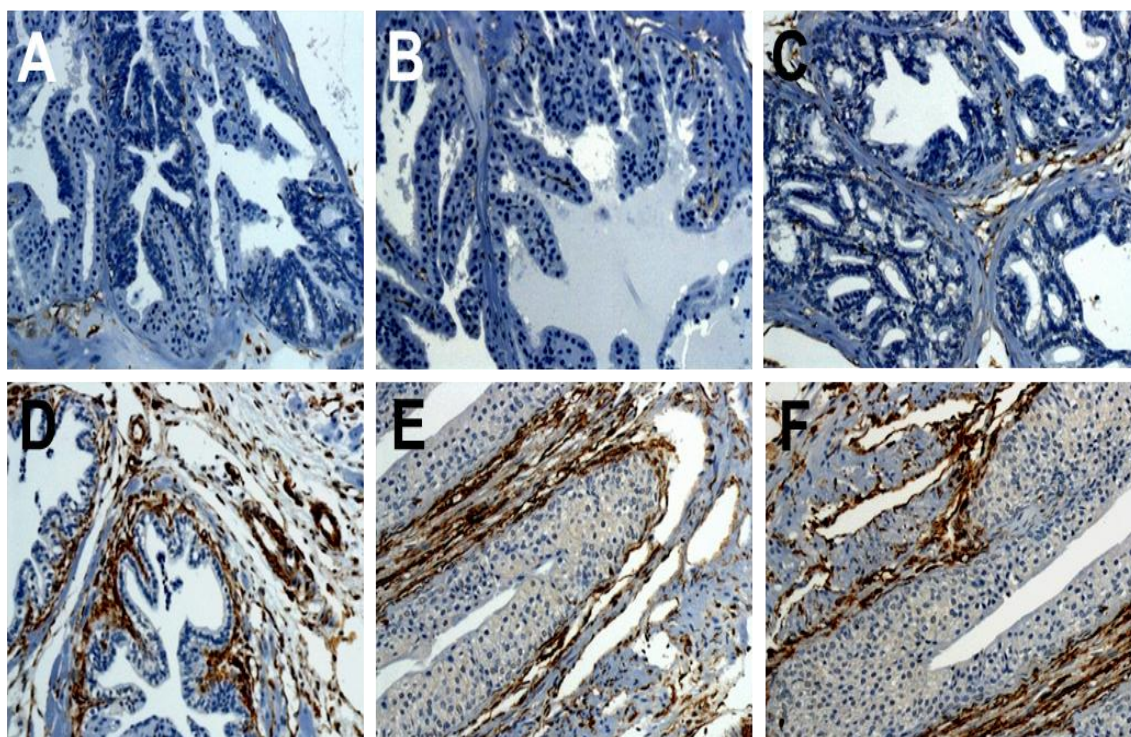


Figure 43 : Etude de l'expression du canal TRPA1 dans la prostate de souris par immunohistochimie. Cette étude a été réalisée dans des souris CTL âgées de 5 mois (A,B,C) et des souris PSP-KIMAP âgées de 5 mois développant des cancers prostatiques (D,E,F) en utilisant des anticorps dirigés contre le canal TRPA1. Le canal est marqué en marron (réaction peroxydase/DAB) tandis que les noyaux des cellules sont marqués en bleu (hématoxyline).

laboratoire (Dr David Julius, Department of Physiology, University of California, San Francisco, California, USA), de croiser des souris KIMAP avec un modèle de souris KnockOut pour le canal TRPA1 de manière à obtenir des souris portant les 2 caractéristiques dans la descendance qui nous permettraient d'étudier l'impact direct de l'absence du canal TRPA1 dans la tumorigenèse *in vivo*.

Une dernière approche consisterait à développer des anticorps monoclonaux à visée thérapeutique qui cibleraient spécifiquement un épitope présent au niveau du domaine pore du canal commun à l'homme et la souris, inhibant ainsi son activité et induisant potentiellement son internalisation. L'efficacité de ces anticorps serait alors dans un premier temps testé par des expériences *in vitro* sur les cellules exprimant le canal TRPA1 où leurs effets sur l'activité du canal serait déterminé par des études électrophysiologiques et par imagerie calcique. Dans un deuxième temps, une fois leur efficacité validée, ces anticorps ciblant le domaine pore du canal TRPA1 pourraient être utilisés dans des modèles animaux comme les souris PSP-KIMAP afin d'avoir une autre mode de ciblage du canal TRPA1 et évaluer son rôle dans la tumorigenèse prostatique *in vivo*. Si ces expériences sont concluantes, il serait également intéressant d'utiliser les mêmes approches où les souris utilisées seraient soumises à des traitements chimiothérapeutiques comme le docétaxel par intraveineuse afin de caractériser l'impact du canal TRPA1 dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques dans des modèles. L'ensemble de ces manipulations est nécessaire afin de déterminer l'impact du canal TRPA1 dans la tumorigenèse prostatique qui, si les résultats sont concluants, pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique en association avec les traitements thérapeutiques actuels.

II. Etudier le rôle du canal TRPA1 dans la sécrétion d'exosomes

Après avoir montré au cours de cette thèse que l'ouverture du canal TRPA1 induisait un influx calcique permettant la sécrétion de plusieurs facteurs de croissance par les CAFs, il serait intéressant d'étudier le rôle du canal TRPA1 dans la sécrétion des exosomes. En effet, dans le cadre du microenvironnement tumoral et des interactions épithélio-stromales, un nouveau mode de communication propice au cancer et intervenant dans les mécanismes de résistance des cellules tumorales aux traitements a été caractérisé ces dernières années impliquant des vésicules extracellulaires sécrétées de très faible taille entre 30 et 100 nm de diamètre appelées exosomes présents dans tous les fluides biologiques. Ces vésicules ont été caractérisées pour la première fois chez les réticulocytes matures de mammifères et sont capables de contenir plusieurs sortes de molécules provenant des cellules telles que des ARN (ARNm et miARN) et des protéines afin de les libérer dans les cellules cibles en fusionnant

avec la membrane plasmique (Azmi *et al.*, 2013). Leur rôle dans la tumorigenèse sont multiples où ils ont été montrés intervenir dans l'angiogenèse (Grange *et al.*, 2011), l'EMT (Garnier *et al.*, 2012), la formation du stroma tumoral en participant à la différenciation myofibroblastique (Cho *et al.*, 2012). Les exosomes interviendraient également dans la formation de niches métastatiques (Rana *et al.*, 2013) ainsi que la résistance aux traitements pharmacologiques en favorisant leur expulsion hors de la cellule en association avec le transporteur MDR-1 comme pour le docétaxel dans des cas de CaP (Corcoran *et al.*, 2012). L'impact des exosomes sur la tumorigenèse étant conséquent et faisant partie intégrante du microenvironnement tumoral, nous nous sommes demandés si tout comme pour la sécrétion de facteurs de croissance, le canal TRPA1 était capable d'assurer la sécrétion d'exosomes suivant son ouverture et une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Pour le moment, des études préliminaires réalisées avec l'aide du Dr. Christian Slomianny et Etienne Dewailly nous ont permis d'extraire par ultracentrifugation différentielle et de caractériser par microscopie électronique à contraste négatif, la présence d'exosomes de faible taille (30 nm de diamètre) dans les milieux conditionnés (sans SVF) des CAFs prostatiques à notre disposition. Par la suite, des mises au point seront réalisées de manière à déterminer si le canal est impliqué dans la sécrétion d'exosomes à partir des milieux conditionnés de CAFs prostatiques traitées ou non avec l'activateur (AITC, 5 μM) ou des inhibiteurs (HC-030031 50 μM , A967079 1 μM) du canal TRPA1, les exosomes étant isolés par ultracentrifugation puis quantifiés à l'aide d'un appareil permettant de déterminer à la fois la taille et la quantité des exosomes présents dans les échantillons testés (Sitar *et al.*, 2015) en collaboration avec le laboratoire du Pr. Salzet.

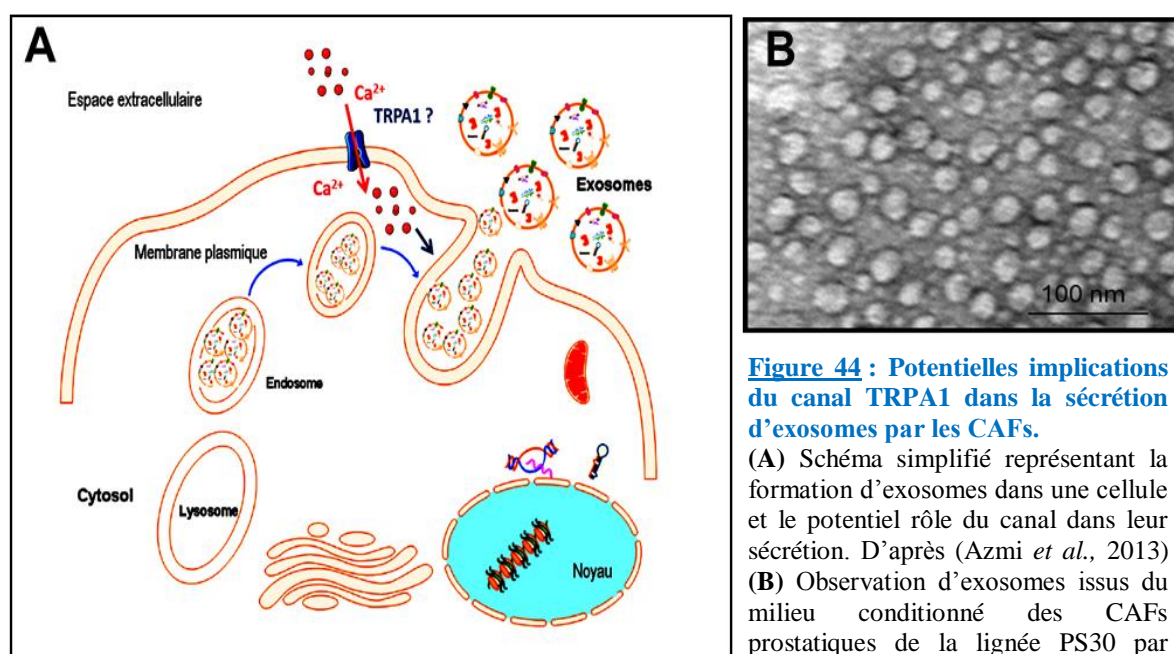


Figure 44 : Potentielles implications du canal TRPA1 dans la sécrétion d'exosomes par les CAFs.
(A) Schéma simplifié représentant la formation d'exosomes dans une cellule et le potentiel rôle du canal dans leur sécrétion. D'après (Azmi *et al.*, 2013)
(B) Observation d'exosomes issus du milieu conditionné des CAFs prostatiques de la lignée PS30 par microscopie électronique à transmission (MET) en contraste négatif.

III. Etudier le rôle du canal TRPA1 dans la tumorigenèse prostatique associée aux nerfs sympathiques et parasympathiques

L'expression et le rôle du canal TRPA1 ayant été principalement caractérisé dans les neurones sensoriels, il serait intéressant de déterminer d'une part si ce dernier est exprimé dans les nerfs associés au CaP et d'autre part quel est son rôle dans les cellules nerveuses. En effet, les études réalisées ces dernières années montrent clairement le rôle émergent des nerfs sympathiques et parasympathiques dans la tumorigenèse prostatique ainsi que la dissémination métastatique *via* un mécanisme d'invasion périneurale (Magnon *et al.*, 2013). Pour le moment, nous avons observé sur des lames de tissus de cancer prostatique, l'expression du canal TRPA1 au niveau de structures ressemblant aux nerfs. Ce canal TRPA1 pourrait ainsi participer à la sécrétion de norépinephrine (NE) et d'acétylcholine (Ach) impliqué dans la tumorigenèse prostatique. Parallèlement à ces études, il serait intéressant de savoir si le canal TRPA1 exprimé par les CAFs et les cellules endothéliales est modulé (expression et activité) par les sécrétions des nerfs sympathiques et parasympathiques. En effet, les récepteurs $\beta 2$ et $\beta 3$ adrénergiques sont connus pour être exprimés par les cellules stromales où se fixerait la NE afin d'assurer l'initiation du cancer pendant la néoplasie intra-épithéliale et la survie des cellules tumorales alors que les fibres cholinergique du système nerveux parasympathique infiltrant aussi la tumeur, libéreraient de l'acétylcholine (Ach) agissant sur son récepteur muscarinique de type 1 également exprimé par les cellules stromales afin d'assurer la migration, l'invasion et la formation de métastases par les cellules tumorales à des stades plus avancés (Magnon *et al.*, 2013). Ainsi, par la suite, dans un premier temps, une étude de l'expression de ces récepteurs dans les CAFs et les cellules endothéliales associées au CaP à notre disposition sera réalisé, puis dans un deuxième temps, des études d'imagerie calcique, de RT-PCR, de western-blot et d'IF seront réalisées en présence de NE et d'Ach de manière à voir si les voies de transduction mises en place par ces agonistes modulent l'activité et l'expression du canal TRPA1. Enfin, si le canal TRPA1 est impliqué dans les voies de transduction liées à ces neurotransmetteurs, leur impact sur la physiologie des cellules stromales *via* le canal TRPA1 et les interactions épithélio-stromales sera étudiée.

IV. Etudier les polymorphismes du canal TRPA1 et sa sensibilité aux facteurs environnementaux

Nous avons montré que la présence des SNPs ou des mutations pouvaient affecter l'activité du canal TRPA1 et sa sensibilité aux agonistes comme le resveratrol, un polyphénol présent dans l'alimentation avec comme conséquence un impact sur les interactions épithélio-stromales et les traitements employés contre les cellules tumorales. Il serait donc intéressant d'étudier la fréquence des polymorphismes observés chez les individus atteints de cancer et s'il existe une correspondance avec l'incidence des cancers et leurs grades d'évolution. En effet, ces polymorphismes pourraient sensibiliser les individus au CaP ou être en parties responsables des résistances aux thérapies employées, les facteurs environnementaux dont l'alimentation ou les polluants interférant sur l'efficacité des traitements en modulant les interactions épithélio-stromales *via* le canal TRPA1. Ainsi, parallèlement à ces études, pour chaque prélèvement de patients reçus de l'hôpital, un séquençage de l'ADN codant pour le canal TRPA1 stromal devrait être automatiquement effectuée, puis par imagerie calcique et par des techniques d'électrophysiologie, il faudrait établir un screening d'un grand nombre de facteurs environnementaux susceptibles d'activer ou d'inhiber le canal TRPA1 (alimentation, polluants, anesthésiques, analgésiques...). Ces études permettraient alors de prescrire des traitements adaptés pour chaque patient en fonction de leur signature génétique ainsi que des recommandations sur les interactions environnementales à éviter en prévention du cancer suivant un séquençage individuel, ou durant le traitement prescrit contre le cancer.

Conclusion générale

Les travaux réalisés pendant cette thèse nous ont permis pour la première fois de mettre en exergue le rôle d'un canal ionique, le canal TRPA1, dans les interactions épithélio-stromales propices au cancer de la prostate humaine et à la résistance des cellules tumorales face aux traitements chimiothérapeutiques. En effet, nous avons montré que le canal TRPA1, canal cationique de la famille des TRP, était spécifiquement exprimé dans le stroma tumoral en particulier dans les fibroblastes et les cellules endothéliales associées au cancer et que son activation permettait une entrée importante de Ca^{2+} libre dans la cellule assurant l'expression et la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF et le VEGF capables (1) d'induire l'EMT et la migration des cellules tumorales avec un remodelage de l'expression des canaux ioniques et de la signalisation calcique dans ces cellules, l'angiogenèse ainsi que (2) la résistance des cellules tumorales à la mort cellulaire normalement induite par des agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine et le docétaxel. Dans le contexte du microenvironnement tumoral, le canal TRPA1 voit son expression et son activité modulés *via* les voies de transduction induites par des agonistes sécrétés par les cellules cancéreuses prostatiques comme l'ET-1. L'activation de ces voies dont la voie $\text{PLC}\beta/\text{IP}_3$ induit la vidange des stocks calciques intracellulaires, le Ca^{2+} se fixant directement sur un domaine EF-hand présent au niveau de l'extrémité Nter du canal TRPA1 afin de permettre son activation et une entrée capacitive de Ca^{2+} . L'influx calcique généré assure alors l'expression et la sécrétion de facteurs de croissance favorisant le développement du cancer. Enfin, nous avons montré que la séquence du canal TRPA1 exprimé par les CAFs présentait des SNPs et des mutations responsables d'un changement de l'activité du canal en réponse à des substances naturelles anti-tumorales comme le resveratrol avec pour conséquence une modulation du dialogue épithélio-stromale et une résistance des cellules tumorales à la mort cellulaire.

Bien que des études *in vivo* soient nécessaires par la suite, l'ensemble de ces résultats montrent bien le potentiel du canal TRPA1 comme un éventuel marqueur pronostique et une cible thérapeutique du cancer de la prostate en association avec les thérapies actuelles mais également comme un senseur chimique qui peut répondre différemment à des substances d'origine endogène ou exogène pour chaque patient en fonction de sa signature génétique, évaluant ainsi le potentiel nocif des molécules pharmacologiques employés et des facteurs environnementaux.

Annexes

Milieu de culture pour les bactéries

Milieu « TB » :

- Tryptone (pancreatic digest of casein): 12 g/L
- Yeast extract: 24 g/L
- Glycérol: 0,4 %
- K₂HPO₄: 12,54 g/L
- KH₂PO₄: 2.31 g/L

Milieu « LB » :

- Tryptone: 10 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 10 g/L

Agar:

- Tryptone: 10 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 5 g/L
- Agar: 15 g/L

S.O.C. medium :

- Tryptone: 20 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 0,5 g/L
- KCl: 0,18 g/L
- MgCl₂: 0,95 g/L
- Glucose: 20 mM

Solutions pour extraction d'ADN

Tampon de lyse :

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

Solution de Phénol/Chloroform/AIA :

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

Solutions pour extraction d'ARN

Acétate de sodium (3M) :

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

Solution de Phénol/Chloroform/AIA :

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

Solutions pour extraction de protéines

Tampon RIPA :

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

Solutions pour immunofluorescence

Tampon citrate :

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

Solution de PBS :

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

Para-Formaldéhyde (PFA) :

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

Solution de saturation pour immunofluorescence :

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

Solutions pour électrophorèse

Tampon TBE :

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

Tampon TAE :

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

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

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

Solution de transfert :

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

Tampons de charge et marqueurs de poids moléculaire

Tampon de charge pour protéine (Tampon de Laemelli) :

- Tris pH 6,8 : 62,5 mM
- SDS : 2 %
- Saccharose : 10 %
- Bleu de Bromophénol : 0,001 %
- DTT : 100 mM

Tampon de charge pour ADN :

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

Marqueur de poids moléculaire pour ADN/ARN :

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

Autres solutions

Tampon TE (Tris-EDTA) :

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

HBSS :

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

*Communications
personnelles et
publications*

Communications orale :

Involvement of the TRPA1 ion channel in epithelial-stromal interactions in human prostate cancer. Vancauwenberghe E, Derouiche S, Mariot P, Bokhobza A, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Allart L, Prevarskaya N. and Roudbaraki M.

1^{er} congrès des jeunes chercheurs du LabEx ICST : 29 et 30 Octobre 2014 à Lille. Participation comme membre du comité d'organisation du congrès et présentation orale de 20 minutes sur mes travaux.

Involvement of the TRPA1 ion channel in epithelial-stromal interactions in human prostate cancer. Vancauwenberghe E, Derouiche S, Mariot P, Bokhobza A, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Allart L, Prevarskaya N. and Roudbaraki M.

24^{ème} Journée Annuelle de l'ARTP : Marqueurs diagnostiques et pronostiques : 18 Novembre 2015 au Palais des Congrès à Paris. Présentation orale de 8 minutes sur mes travaux.

Communications sous forme de poster :

Involvement of the TRPA1 ion channel in epithelial-stromal interactions in human prostate cancer. Vancauwenberghe E, Derouiche S, Mariot P, Bokhobza A, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Allart L, Prevarskaya N. and Roudbaraki M.

23^{ème} Journée Annuelle de l'ARTP : Modèles animaux et métastase osseuse du cancer de la prostate : 19 Novembre 2014 au Palais des Congrès à Paris.

Gain du prix pour le meilleur poster 2014.

Prostate cancer Stromal TRPA1 activation induces HGF secretion and resistance to chemotherapeutics agents. Vancauwenberghe E, Derouiche S, Mariot P, Bokhobza A, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Allart L, Prevarskaya N. and Roudbaraki M.

15^{ème} édition de la Journée André Verbert (colloque des doctorants) : 14 Septembre 2015 à Lille 2.

Prostate cancer Stromal TRPA1 activation induces HGF secretion and resistance to chemotherapeutics agents. Vancauwenberghe E, Derouiche S, Mariot P, Bokhobza A, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Allart L, Prevarskaya N. and Roudbaraki M.

5th RSC / SCI symposium on Ion Channels as Therapeutic Targets: 14 et 15 Mars 2016, Wellcome Genome Campus Conference Centre, Cambridge, UK.

Publications :

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Pascal Mariot, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Lucile Noyer, Marine Warnier, Alexandre Bokhobza, Christian Slomianny, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Emilie Desruelles, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki. **TRPA1 activation in prostate cancer-associated fibroblasts induces HGF secretion and chemotherapeutic resistance in prostate cancer cells.** *Oncotarget*. En révision.

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Lucile Noyer, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Laura R. Sadofsky, Pascal Mariot, Marine Warnier, Christian Slomianny, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki. **Activation of mutated TRPA1 ion channel by resveratrol in human prostate cancer associated fibroblasts (CAF).** *Molecular Carcinogenesis*. Soumis depuis le 26/08/2016 (under review).

Eric Vancauwenberghe^{*}, Hélène Lallet-Daher^{*}, Sandra Derouiche, Pierre Gosset, Philippe Delcourt, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Laurent Allart, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki. **Involvement of ion channels in Endothelin-1-induced signalling in human prostate cancer cells.** *Journal of Cell Signalling*. Accepté octobre 2016.

Derouiche, S., Mariot, P., Warnier, M., Bidaux, G., Vancauwenberghe E, Gosset, P., Mauroy, B., Bonnal, J.L., Slomianny, C., Delcourt, P., Prevarskaya, N. and Roudbaraki, M. **Activation of TRPA1 channel by Antibacterial agent Triclosan induces VEGF secretion in human prostate cancer stromal cells** *Cancer Prevention Research*, en révision.

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Lucile Noyer, Christian Slomianny, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Emilie Desruelles, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki. **TRPA1 channel constitutes a SOC channel in human prostate cancer stromal cells.** En cours de soumission.

Eric Vancauwenberghe, Sandra Derouiche, Pascal Mariot, Loïc Lemonnier, Pierre Gosset, Lucile Noyer, Marine Warnier, Alexandre Bokhobza, Christian Slomianny, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt, Laurent Allart, Emilie Desruelles, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki. **The involvement of ion channels in HGF/c-Met-mediated epithelial stromal interactions and prostate cancer cells migration.** En cours de soumission.

* Co-premiers auteur

Article 5

Involvement of ion channels in Endothelin-1-induced signalling in human prostate cancer cells

Eric Vancauwenberghé*, Hélène Lallet-Daher*, Sandra Derouiche, Pascal Mariot, Pierre Gosset, Philippe Delcourt, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Laurent Allart, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki

**Contributed equally to this work*

(Accepté pour publication dans *Journal of Cell Signaling*)

L'ET-1, peptide vasoconstricteur exprimé et sécrété par les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes et les cellules endothéliales, possède un rôle important dans la tumorigenèse prostatique, son expression étant associée à l'évolution du CaP (Nelson *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1996; Nelson et Carducci, 1999; Nelson *et al.*, 2003). L'ET-1 intervient dans de nombreux mécanismes propices au cancer tels que la prolifération (Kopetz *et al.*, 2002), la résistance à l'apoptose, l'invasion et la formation de métastases osseuses, des niveaux élevés d'ET-1 étant observés dans le plasma de patients atteints de CaP métastatique comparés aux individus sains ou avec des cancers à des stades moins avancés (Shichiri *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1995).

Nous avons montré précédemment que l'ET-1 activait le canal TRPA1 exprimé par les CAFs prostatiques suivant la fixation sur son récepteur ET_A-R en induisant la voie de signalisation PLC_β/IP₃, la fixation de l'IP₃ sur son récepteur IP₃R assurant la vidange des stocks calciques intracellulaires dans le cytosol suivie par l'activation du canal TRPA1 et une augmentation significative de la concentration en Ca²⁺ libre intracellulaire. Ainsi, *via* l'activation du canal TRPA1, l'ET-1 induisait la sécrétion de facteurs de croissance comme l'HGF agissant sur les cellules tumorales afin d'induire l'EMT favorisant la migration et la chimio-résistance de ces cellules.

Les cellules épithéliales tumorales prostatiques n'exprimant pas le canal TRPA1 et exprimant les récepteurs à l'ET-1, ET_A-R et ET_B-R, nous nous sommes intéressés au rôle de l'ET-1 dans ces cellules et si des canaux ioniques étaient impliqués dans les effets de l'ET-1 dans ces cellules. En effet, de manière intéressante, il est possible que ce facteur favorise la tumorigenèse prostatique et la formation de métastases en agissant sur les différents types cellulaires composant la tumeur.

Dans ce contexte, par des études de MTS/PMS et de comptage cellulaire, nos travaux montrent que de manière dose-dépendante, l'ET-1 induit la prolifération des cellules tumorales de la lignée androgéno-indépendante PC-3 et que ce mécanisme est Ca²⁺ dépendant. En effet, par des études d'imagerie calcique, nous montrons que la fixation de

l'ET-1 sur son récepteur ET_AR active la voie de transduction PLC_β/IP₃, l'IP₃ se fixant sur son récepteur IP₃R afin d'assurer la vidange des stocks calciques réticulaires. Des canaux membranaires sont alors consécutivement activés par la déplétion réticulaire afin d'assurer l'entrée capacitive de Ca²⁺ ou SOCE. Parmi les canaux intervenant dans le SOCE des cellules tumorales induit par l'ET-1, nous avons mis en évidence les canaux calciques Orai1, TRPC1 et TRPV6 mais également les canaux potassiques Ca²⁺-activés IK_{Ca} et BK_{Ca}. L'inhibition de ces canaux ainsi que l'utilisation de siARN contre ces derniers diminuaient considérablement le SOCE et la prolifération cellulaire des cellules tumorales prostatiques. En effet, suivant leur activation par le Ca²⁺ intracellulaire, il est bien admis que les canaux potassiques sont capables d'amplifier la signalisation calcique en modulant le potentiel de membrane et en favorisant la force électro-motrice de Ca²⁺ (Lallet-Daher *et al.*, 2009). Enfin, nous avons montré que l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire assuré par les canaux précédemment cités activait la voie calcineurine/NFAT conduisant à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire des cellules PC-3.

Ces données sont importantes car d'une part, elles montrent qu'un même agoniste peut participer à la signalisation calcique de plusieurs types cellulaires simultanément, ici, les cellules tumorales et les CAFs afin de favoriser la tumorigenèse. D'autre part nos travaux montrent que les canaux mis en jeu dans la signalisation calcique induite par l'ET-1 sont différents d'un type cellulaire à un autre. Ainsi, les récepteurs à l'ET-1 ainsi que les canaux ioniques impliqués dans ces effets constituent des cibles intéressantes pour interférer dans les interactions épithélio-stromales du microenvironnement tumoral prostatique en agissant à la fois sur les cellules tumorales et les cellules stromales associés au cancer.

Involvement of Ion Channels in Endothelin-1-induced Signalling in Human Prostate Cancer Cells

Eric Vancauwenberghe^{1*}, Hélène Lallet-Daher^{1*}, Sandra Derouiche¹, Pascal Mariot¹, Pierre Gosset², Philippe Delcourt¹, Brigitte Mauroy^{1,3}, Jean-Louis Bonnal^{1,3}, Laurent Allart¹, Natalia Prevorskaya¹ and Morad Roudbaraki¹

¹Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France

²D epartement de Pathologies, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), Lille, France

³Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert, Lille, France

*Corresponding author: Morad Roudbaraki, Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France, E-mail: morad.roudbaraki@univ-lille1.fr

Received date: September 21, 2016; Accepted date: October 18, 2016; Published date: October 26, 2016

Copyright:   2016 Vancauwenberghe E, 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.

Abstract

Objective: Endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor secreted primarily by endothelial and various epithelial cancer cells has been implicated in prostate cancer progression and the ET axis has been suggested to represent a novel and exciting target in the treatment of prostate cancer (PCa). ET-1, acting primarily through the endothelin receptors (ETRs) is integrally involved in multiple facets of PCa progression, including cell growth, inhibition of apoptosis, angiogenesis and development of bone metastases. ET-1 and ETRs are expressed in PCa tissues and their expression is modulated during the evolution of these cancers. The purpose of the present work was to study the effects of ET-1 on proliferation of human PCa cells PC-3 and the mechanisms by which the activation of ETRs may promote the PCa cells growth.

Methods: Prostate cancer cell lines and primary cultured epithelial cells from prostate cancer, RT-PCR and calcium imaging techniques were used to study the expression and functionality of the Endothelin receptors and involvement of ion channels in the effects of ET-1 in prostate cancer cells.

Results: We show for the first time that the application of ET-1 induces a dose-dependent cell proliferation and an increase in intracellular free Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_i) via a mobilisation of the internal calcium stores and by a capacitative calcium entry (CCE). These effects of ET-1 were completely abolished by BQ123, a selective ETAR antagonist, but not by BQ788, a selective ETBR antagonist. By use of pharmacological inhibitors and siRNA targeting calcium-activated (IKCa1 and BKCa) potassium channels and calcium channels (TRPC1, TRPV6, Orai1), we showed that these ion channels play an important role in calcium entry and cell proliferation induced by ET-1 in PCa cells.

Conclusion: These results suggest that these ions channels evidenced here might constitute potential targets to block the ET axis in human prostate cancers.

Keywords: Endothelin-1; Calcium signalling; Calcium-activated Potassium channels; Capacitative calcium entry; Orai-1; TRPV6; TRPC1 ion channels; Prostate cancer; Proliferation

Abbreviations ETs: Endothelins; ET-1: Endothelin-1; ETRs: Endothelin Receptors; ETAR: Endothelin A Receptor; ETBR: Endothelin B Receptor; PCa: Prostate Cancer; IKCa1: Ca²⁺-activated K⁺ Channel with Intermediate Conductance; BKCa: Ca²⁺-activated K⁺ channel with big conductance; TRP channels, RT-PCR: Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction; CRAC: Calcium Release-activated Ca²⁺ Channel; CCE: Capacitative Calcium Entry; SOCE: Store Operated Calcium Entry.

Introduction

Prostate cancer is characterized by low rates of cell proliferation coupled with diminished rates of cell death [1]. This pattern has made prostate cancer among the most resistant of malignancies to cytotoxic chemotherapeutic agents. Furthermore, the cornerstone of the

management of advanced prostate cancer, androgen deprivation therapy, relies on the effective induction of apoptotic pathways. The emergence of androgen refractory prostate cancer, which leads to the lethal form of the disease, indicates that these cells likely have developed survival mechanisms to escape death.

Recent studies in the understanding of prostate cancer biology have led to the development of drugs directed against precise molecular alterations in the prostate tumor cells. Endothelins (ETs) and their receptors have emerged as a potential target in prostate cancer. The potent vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1) has been implicated in prostate cancer disease progression [2-4]. ET-1 expression occurs in almost every human prostate cancer tissue studied [4,5] and the expression increases in metastatic PCa [2,3]. Interest in the role of ET-1 in cancer has grown over the last decade since studies [6], Shichiri et al. [7] reported that several human tumor cell lines released ET-1 into the culture medium and that this stimulated proliferation of these cells. By activating of the Endothelin receptors (ETRs), ET-1 is involved in several aspects of prostate cancer progression including proliferation, escape from apoptosis, invasion, and new bone

formation, processes that are general to many malignancies. Moreover, patients with metastatic prostate cancer have elevated levels of plasma ET-1 compared with patients with organ-confined cancer as well as healthy individuals [4]. Biological activity of the ETs is mediated by the activation of two G protein-coupled receptor subtypes, endothelin receptor A (ETAR) and B (ETBR) interacting with heterotrimeric G proteins. Each G-protein activates several downstream effectors [8] through the activation of phospholipase C (PLC) [9], which cleaves phosphatidylinositol bisphosphates generating two second messengers IP₃ and DAG leading to an increase in intracellular calcium levels and an activation of protein kinase C (PKC) and MAPK. These transduction pathways might relay the mitogenic signal induced by ETs to the nucleus and promote cell proliferation. Activation of the endothelin receptor A (ETA) can lead to induction of a survival pathway, whereas activation of the endothelin receptor B (ETB) can result in clearance of circulating ET-1 as well as in stimulation of apoptosis. However, the response to the binding of either receptor remains cell type-dependent. In prostate cancer, the expression of the endothelin receptors, ETAR and ETBR, is altered compared to the pattern seen in normal prostatic tissues [5,10]. The ETB, predominant on benign prostatic epithelial cells, has a much lower expression on prostate cancer cells, owing, at least in part, to frequent hypermethylation of the ETB gene, *EDNRB* [11]. Increased ET-1 expression, coupled with the increased ETA expression that occurs with higher prostate tumor stage and grade, may produce a survival advantage for the prostate cancer cells. Specific ETAR antagonists may therefore provide an improved approach in tumor treatment in which ETAR blockade could result in tumor growth inhibition. Selective ETAR antagonists may block the proliferative effects of exogenous ET-1 in both prostate cancer cells and osteoblasts by direct effects on the tumor cells. Indeed, in a phase III clinical trial of the ETA antagonist, atrasentan, there was a significant delay in time to disease progression compared to placebo in men with hormone refractory disease [12,13]. Clinical trials of atrasentan has also demonstrated benefits in prostate cancer progression [14] and this drug is actually in phase 3 of clinical trial [15] decreased pain in men with prostate cancer.

Studies have shown that the ET-1-induced elevation of intracellular free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) in different cell systems. An elevation of [Ca²⁺]_i is known to play an important role in cell growth, survival, migration and apoptosis. According to the published data, the elevation of [Ca²⁺]_i caused by ET-1 is controlled by different pathways including a transmembrane Ca²⁺ influx and an intracellular Ca²⁺ release via the activation of inositol trisphosphate receptor (IP₃R) and of ryanodine receptors (RyRs). Increasing number of works show the implication of potassium and calcium channels in the ET-1 effect on the cell proliferation [16]. Early evidence for the role of the [Ca²⁺]_i in ET-1 induced proliferation of tumor cells was described by Shichiri et al. [7] in epithelial carcinoma cell lines derived from the human cervix (HeLa) and larynx (Hep-2). They found that ET-1 stimulated both Ca²⁺ signalling and proliferation of quiescent cells in a dose-dependent manner. Similar results were reported in ovarian cancer cells by Bagnato et al. [17]. Although the presence of ET-1 and receptors mRNA and proteins have been shown in human prostate cancer tissues and prostate cancer cell lines [18], actually no information is available about the ET-1 and calcium signalling in prostate cancer.

In a previous work, we have shown that the calcium-activated IKCa1 potassium channel controls prostate cancer cell proliferation by

a close regulation of passive calcium entry via TRPV6 [19]. Even though little is known about the effects of ET-1 on the calcium signalling in PCa cells, the involvement of ion channels in ET-induced calcium signalling and the involvement of ion channels in ET-1-induced cell proliferation. In the present study, we show for the first time the mitogenic effect of ET-1 and ETRs in human prostate cancer cells PC-3 and primary cultures human prostate cancer cells (PrEC) and then, we explored the effects of ET-1 on ([Ca²⁺]_i) and determined the involvement of the Ca²⁺-activated K⁺ channels and of the plasma membrane calcium channels in ET-induced Ca²⁺ signalling. We further studied the ET-1 the involvement of the ion channels in ET-1-induced cell proliferation in human prostate cancer cells. The data presented here suggest that the ion channels constitute interesting targets in therapies to disrupt the ET-1 axis in human prostate cancer.

Materials and Methods

Reagents and chemicals

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

Cell culture

LNCaP, DU45 and PC-3 prostate cancer cell lines, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), were cultured in RPMI supplemented by 10% fetal calf serum (FCS) as previously described by [20]. Primary cultured prostate cancer epithelial cells (PrCE) were obtained and cultured as described in a previous work [21]. Before experiments, cells were cultured in 2% FCS for 48 hours.

RNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated as described by Chomczynski et al. [22]. After DNase I (Invitrogen) treatment to eliminate genomic DNA, RT-PCR experiments were carried out using a GeneAmp PCR system 2400 thermal cycler (Applied Biosystems), as previously described [23]. The PCR primers used in this study (Table 1) were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Invitrogen. The expression of β -actin mRNA was used as an internal standard. PCRs were carried out using 1 μ l of the RT reaction the total RNA extracted from cells. The conditions were as follows: 7 min at 95°C, then 40 cycles of 30 sec extension at 72°C each, 30 sec to 1 minute according to the size of amplicons and a final 7 min extension step. Half of the PCR samples were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml) and viewed by Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

siRNA cell transfection

PC-3 cells were transfected overnight with 20 nM siRNA control (siRNA number 1, Dharmacon Inc.) or raised against IKCa1, BKCa, Orai-1, TRPV6 and TRPC1 (Table 1) using GenePorter transfection reagent (Gene Therapy Systems, Inc., GTS, San Diego) in serum-free DMEM, according to the manufacturer's recommended protocol. The cells were then incubated in RPMI medium containing 10% SVF for two days to down-regulate the expression of these targets (mRNA) prior to use in experiments.

Gene	5'-forward-3'	5'-reverse-3'	RT-PCR product Size (bp)	Accession number
ET _A	GATCACAATGACTTTGGCGTA	CTCAAGCTGCCATTCTTCT	328	NM_001957
ET _B	TTGGTGGCTGTTTCAGTTTCT	TGCTCACCAATACAGAGCA	351	NM_000115
IK _{Ca1}	ACTGGTTCGTGGCCAAGCTTTACA	TCCAGCAGCCATCAGCAAGCCA	867	NM_002250
BK _{Ca}	AGTACAAGTCTGCCAACCAGAGAGA	TCAAAGCCGCTCTTCTGCACGTAC	1634	NM_002247
SK3	TCATGAAGACGCTCATGACCA	TGGAGGAACTTCTCTGGTGT	469	NM_002249
TRPC1	AGCGCATGTGGCAATCTTTGT	CGCTCCATGATTTAGAAAATGG	595	NM_003304
TRPV6	ATGGTGATGCGGCTCATCAGTG	GTAGAAGTGGCTAGCTCCTCG	255	XM_001126541
Orai1	CTTCTTCGACCTCGTCTCTCT	CGTAAGGCCAAAGCATGGAA	406	NM_032790
STIM1	CCAACAGTGAAACACAGCAC	CATCATCTTCTTCATGTGCTCC	435	JX014264
β-actin	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	212	NM_001101
siRNA	Target sequences (5'-3')			
TRPC1	GGGUGACUUAUUAUGGUU			NM_001251845
TRPV6	GACUCUCUAUGACCUCACA			NM_018646
Orai1	UGAGCAACGUGCACAUCU			NM_032790.3
IK _{Ca1}	UGUAAAGCUUGGCCACGAAC			NM_002250
BK _{Ca}	GAGUCCUGGUUGUCUUAGU			XM_017016207

Table 1: RT-PCR Oligonucleotides and siRNA target sequences

Cell growth assays

Cell growth assays were performed as previously described by [24]. Cells were incubated for 4 days in a medium containing the solvent (DMSO) either alone (control) or with ET-1, U73122, U73433 at various concentrations. Treatments by the siRNA targeting ions channels mRNA was performed as described above. The selective ETAR antagonist BQ123 [25] and the selective ETBR antagonist BQ788 [26] were used. Since previous studies described ET-1 as a mitogen requiring low concentrations of serum for maximal mitogenic activity [27], assays for ET-1-induced mitogenic effects in this study were performed by incubating the PC-3 cells in culture medium containing 2% SVF. The commercial assay kit, consisting of MTS (inner salt) and PMS (an electron coupling reagent), was then used to estimate cell growth. One-hundred percent reflected the number of viable cells after incubation in control medium without drugs for 4 days.

Measurement of [Ca²⁺]_i

PC-3 and LNCaP cells were grown on glass coverslips for Ca²⁺ imaging experiments. (Ca²⁺)_i was measured using fura-2-loaded cells, as previously described [19]. Briefly, cells were loaded with 2 μM fura-2/AM (fura-2 acetoxymethyl ester) (Calbiochem, Meudon, France) in HBSS solution (Hank's Balanced Salt solution) containing (in mM): 142 NaCl, 5.6 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 0.34 Na₂HPO₄, 0.44 KH₂PO₄, 4.2 NaHCO₃, 10 HEPES, and 5.6 glucose, at room temperature for 45 min. All recordings were carried out at room temperature. The cells were continuously perfused with the HBSS

solution and chemicals were added via the perfusion system. The flow rate of the whole-chamber perfusion system was set to 1ml/min and chamber volume was 500 μl.

Statistical analysis

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

Results

Expression of ETAR and ETBR in human prostate cancer cells

The RT-PCR technique was used to study the mRNA expression of ETAR and ETBR in human PCa cell lines (LNCaP, PC-3) and primary cultured human prostate cancer epithelial (PrEC) cells from tissue specimens. The specific primers for ETAR and ETBR allowed to amplify the PCR products of the expected sizes for ETAR (328 pb) and ETBR (351 bp) from the cDNA of all cell lines and primary cultured epithelial cells (PrEC) (Figure 1A). The identity of the amplicons was verified by cloning and sequencing and corresponded to the cDNA of the human ortholog of these receptors.

Effects of ET-1 on human prostate cancer cells proliferation

The effects of ET-1 were studied on the proliferation rates of prostate cancer cell line PC-3 and PrEC. After 4 days of incubation, ET-1 induced significant and dose-dependent increase in cell proliferation at the concentrations tested (0,001-100 nM) reaching the maximal effect at 100 nM for PC-3 cells (Figure 1B) cells. To define the ET-1 receptors involved in the action of ET-1 on the proliferation of PC-3 cells, highly selective ETAR and ETBR antagonists were used. In these experiments, the ET-1 (100 nM)-induced cell proliferation was abolished by BQ123 (1 μ M), a highly selective ETAR antagonist, but not by BQ788 (1 μ M), a highly selective ETBR antagonist (Figure 1C).

In the same manner, we also studied the involvement of a phospholipase C (PLC) in the ET-1 induced cell proliferation in PC-3 cells. As shown on Figure 1D, we observed that ET-1 (100 nM)-induced cell proliferation was reduced by 75% in the presence of the specific PLC inhibitor U73122 used at 10 μ M, but not by its inactive analogue U73433 (10 μ M). However, the inhibition of the proliferation induced by U73122 is not completed suggesting the involvement of other transduction mechanisms like as CD-38 pathway as described in smooth muscle cells [28]. Taking together, these experiments showed that the ET-1 induces cell proliferation in human PCa cells by activating the ETAR ET-1 receptor involving the PLC activation (ETAR /PLC pathway).

The role of $[Ca^{2+}]_i$ in ET-1-induced Cell proliferation

Responses regulated by ET-1 have been associated with increases in $[Ca^{2+}]_i$, either by influx of calcium or release of intracellular calcium stores (for review, see [29]). In order to study the involvement calcium in the ET-1-induced cell proliferation, the cells are treated with BAPTA to chelate the intracellular free calcium. For this, the cells were incubated with BAPTA/AcetoMethyl ester (BAPTA/AM) 30 min before the addition of ET-1 (100 nM). The proliferation rates were estimated 4 days after the treatments.

As shown in Figure 1E, in these experiments, the ET-1-induced cell proliferation was inhibited in the presence of the calcium chelator suggesting the involvement of the intracellular free calcium in the effects of ET-1 in PC-3 cell line. These data also suggest that ET-1 induces calcium signaling in the human PCa cells. These results indicated also that the increase in free cytosolic calcium concentration is implicated in the mitogenic effect of ET-1 on PC-3 cells.

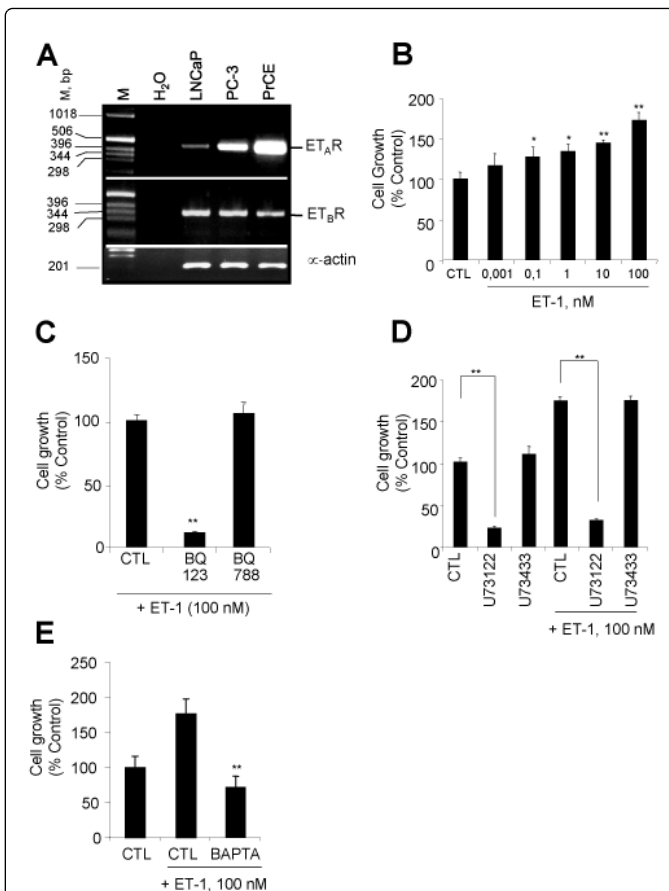


Figure 1: The effects of ET-1 on the cell proliferation in prostate cancer cells. (A) RT-PCR analysis of ETAR and ETBR expression in androgen-sensitive (LNCaP), androgen-insensitive (PC-3), and primary cultured human prostate cancer epithelial (PrCE) cells. The amplified cDNA fragments with respective specific primers are 328-bp for ETAR and 351-bp for ETBR. (B) ET-1 stimulated a dose-dependent cell growth in PC-3 cells. Cells in 96-well plates were rendered quiescent in RPMI 1640 medium with 2% FCS. Quiescent monolayer cells were stimulated with ET-1 at the indicated concentrations and then cultured for a further 4 days. (C) ET-1-induced cell proliferation was blocked by ETAR antagonist BQ123. ET-1 (100 nM) was added to quiescent cells or to quiescent cells pre-incubated for 10 min at 37°C with BQ123 (1 μ M) or BQ788 (1 μ M) then cultured for a further 4 days before MTS assay. (D) ET-1-induced cell proliferation was significantly reduced by U73122 (5 μ M), a specific inhibitor of phospholipase C (PLC) then cultured for a further 4 days before MTS assay. ET-1 (100 nM) was added to quiescent cells or to quiescent cells preincubated for 10 min at 37°C with U73122 or with the inactive U73122 analogue U73433. (E) ET-1-induced cell proliferation was blocked by pre-incubation of the cells with BAPTA/AM (10 μ M), a membrane permeant form of BAPTA, a calcium-chelating molecule. RT-PCR experiments were confirmed in at least 4 different cell cultures and a representative figure is presented. Cell growth studies were performed in 96-well plates (8 wells/per condition) and results are shown as the mean \pm SE. Experiments were repeated four times in independent cell cultures and a representative figure is presented for each cell type. Results are presented as the percentage of corresponding controls (CTL). *P<0.05; **P<0.001 compared with their respective controls.

We therefore studied the effects of ET-1 on free ($[Ca^{2+}]_i$) in PC-3 cell line and in PrEC by calcium imaging using Fura-2-as a calcium probe. As shown in Figure 2, ET-1 (100 nM) induced the $[Ca^{2+}]_i$ response in PC-3 (Figure 2A) and in PrEC (Figure 2B).

Origin of ET-1-induced calcium response in prostate cancer cells

To explore the origin of the calcium response induced by ET-1 in prostate cancer cells, following experiments were performed. As illustrated in Figures 2C and 2D, application of ET-1 (100 nM) in calcium deprived medium ($0Ca^{2+}$) induced a calcium rise originating from the release from internal stores and the subsequent capacitative calcium entry (CCE) in the same medium containing 2 mM of calcium ($2Ca^{2+}$) in both PC3 cells (Figure 2C) and in PrEC (Figure 2D). In these experiments, the ET-1-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ was blocked by ETAR-selective receptor antagonist BQ123 (1 μ M), but not by the ETBR-selective receptor antagonist BQ788 (1 μ M) (Figure 2E). These data indicate that the ETAR expressed in the human prostate cancer cells are functional and are linked to the intracellular Ca^{2+} signaling pathway, probably through the activation of the phosphoinositol/ Ca^{2+} pathway. According to these data, the main pathway involved in the ET-1-induced calcium increase in PCa cells is the calcium entry following the opening of the membrane channels. We thus further investigated the ion channels involved in the calcium entry induced by ET-1 in PC-3 PCa cells.

Determination of the ion channels involved in the ET-1-induced CCE

Calcium entry involves the functionality of calcium channels and the potassium channels modulating the membrane potential and thereby the driving force for the calcium entry through the Voltage-independent calcium permeable channels. In a previous work [19], we showed that the Ca^{2+} -activated K^+ channels (IKCa1) are involved in the thapsigargin-induced CCE in prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. In the present work, we studied the involvement of calcium-activated K^+ channels in the CCE-induced by ET-1. In the same manner, in our previous studies, we showed that TRPC1, TRPV6 and the Orai1/STIM1 complex were involved in the thapsigargin-induced CCE in prostate cancer cells [19,30-32].

First by using RT-PCR technique, we confirmed the expression of the calcium-activated potassium (IKCa1, BKCa and SK3) and calcium channels and their partners (TRPC1, TRPV6, Orai1 and STIM1) in prostate cancer cell lines (LNCaP, PC-3) and in PrEC cells from tissue specimens. Analysis of RT-PCR products revealed the amplification of a single fragment of the expected size for IKCa1 (867 pb) and BKCa (1600 bp), SK3 (440 bp), TRPC1 (595 bp), TRPV6 (255 bp), Orai1 (406 bp) and STIM1 (435 bp) from the cDNA of all cell lines and hPCE cells (Figures 3A and 3B). In order to assess the involvement of these ion channels in the CCE induced by ET-1 (100 nM), we used either the siRNA technology to down-regulate IKCa1 and BKCa or the pharmacological tools to inhibit the IKCa1 (TRAM-34, 10 μ M), the BKCa (Paxilline, 10 μ M) potassium channels or the calcium channels involved in SOCE (SKF96365, 10 μ M) in PC-3 cells.

The down-regulation of the ion channels mRNA and proteins are verified by RT-PCR and western blotting following the treatments of these cells by the specific siRNA used in the present study (data not shown). The cells were treated with ion channels targeting siRNA (20 nM) for 48 h and then, calcium imaging experiments were performed

using the protocol described in Figures 2C-2E. As the IKCa1 and BKCa channels were predominately expressed calcium-activated potassium channels, only their effects in ET-1-induced calcium signaling was investigated here. In these experiments, the pic amplitude of the ET-1-induced calcium mobilization and SOC were quantified and compared between different conditions. As shown in Figures 3C and 3D, treatments of the cells with siIKCa1 or siBKCa (20 nM for 48 h) did not modify significantly the ET-1-induced calcium release from intracellular stores whereas the amplitude of the CCE was decreased by $20 \pm 4,5\%$ vs. CTL (n=140) for siIKCa1 (Figures 3C and 3E).

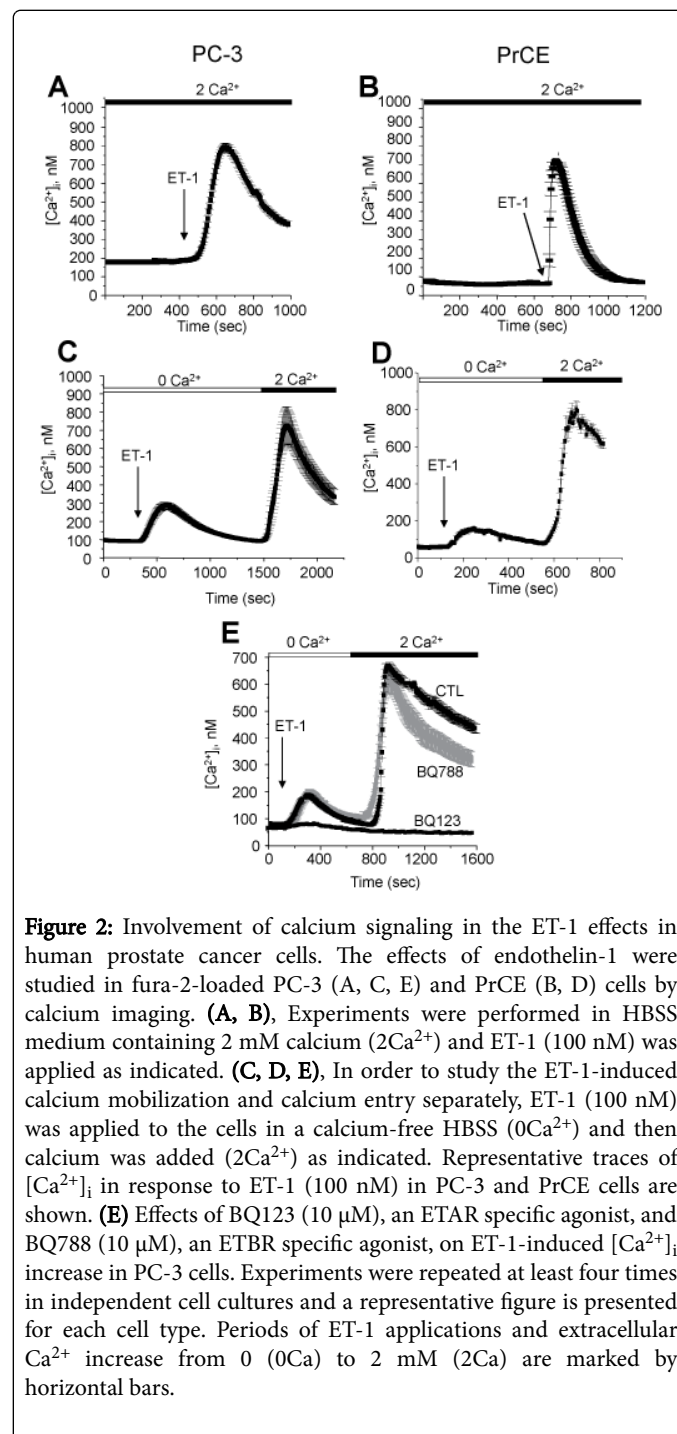


Figure 2: Involvement of calcium signaling in the ET-1 effects in human prostate cancer cells. The effects of endothelin-1 were studied in fura-2-loaded PC-3 (A, C, E) and PrEC (B, D) cells by calcium imaging. (A, B), Experiments were performed in HBSS medium containing 2 mM calcium ($2Ca^{2+}$) and ET-1 (100 nM) was applied as indicated. (C, D, E), In order to study the ET-1-induced calcium mobilization and calcium entry separately, ET-1 (100 nM) was applied to the cells in a calcium-free HBSS ($0Ca^{2+}$) and then calcium was added ($2Ca^{2+}$) as indicated. Representative traces of $[Ca^{2+}]_i$ in response to ET-1 (100 nM) in PC-3 and PrEC cells are shown. (E) Effects of BQ123 (10 μ M), an ETAR specific agonist, and BQ788 (10 μ M), an ETBR specific agonist, on ET-1-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in PC-3 cells. Experiments were repeated at least four times in independent cell cultures and a representative figure is presented for each cell type. Periods of ET-1 applications and extracellular Ca^{2+} increase from 0 ($0Ca$) to 2 mM ($2Ca$) are marked by horizontal bars.

Similar results were also obtained with siBKCa, where the ET-1-induced calcium release from intracellular stores was not significantly modified whereas the amplitude of the CCE was decreased by $70 \pm 6,5\%$ vs. CTL (n=110) (Figures 3D and 3F). However, in siIKCa1-transfected cells, the second phase of the CCE amplitude was inhibited by $39 \pm 8\%$ vs. CTL (n=140), suggesting the involvement of the IKCa1 in first and second phase of the ET-1-induced CCE in PC-3 cells.

These results suggest that IKCa1 and BKCa channels regulate the CCE induced by ET-1 in PC-3 cells. These observations were also confirmed by the use of the pharmacological inhibitors, TRAM-34 (10 μ M) for IKCa1 and paxilline (10 μ M) for BKCa channels. Next, the co-implication of IKCa1 and BKCa channels in the ET-induced CCE was studied by using the pharmacological inhibitors, TRAM-34 (10 μ M) for IKCa1 and paxilline (10 μ M) for BKCa, channels. These experiments were performed on the cells treated either by siControl (siCTL) or siIKCa1 or siBKCa. After siRNA treatments for one potassium channel type, the ET-1-induced calcium entry was elicited to evaluate the contribution of each potassium channel (IKCa1 or BKCa) in ET-1-induced CCE. Then, the inhibitor of the other calcium-activated channel was applied on the remaining CCE to evaluate the contribution of the channel (Figure 3D). These experiments showed that both IKCa1 and BKCa were involved in the ET-1-induced CCE in these cells (Figure 3D).

Identification of Ca²⁺ channels involved in ET-1-induced CCE

We previously showed that IKCa1 regulate the cell prostate cancer cell proliferation by association with a calcium channel of the TRP family, the TRPV6 [19]. We previously also showed that TRPV6, TRPC1 and Orai1/STIM1 complex could be implicated in CCE in human prostate cancer cell lines [19,30-32]. In order to assess the involvement of these channels in the calcium entry induced by ET-1, we used the siRNA technology to down-regulate TRPC1, TRPV6 and Orai1 expression in PC-3 cells. The use of these siRNA were first validated for their effects on the down-regulation of the TRPV6, TRPC1 and Orai1 expression in prostate cancer cells whereas non-targeting siRNA (siCTL) had no effect on their expression (Figures 4A-4C).

As shown in Figure 5, the siTRPV6 (20 nM) or the siTRPC1 (20 nM) alone for 48h induced a moderate inhibition of the ET-induced CCE in PC-3 cells (Figures 5A and 5B and insets) whereas the combined treatments of the cells by both siTRPV6 and siTRPC1 (10 nM each) reduced by about 50% of the ET-induced CCE PC-3 (Figure 5C and inset) cells (n=135). In these experiments, the ET-1-induced calcium release from intracellular stores was not significantly modified. The increased inhibition rate of the ET-induced CCE by the combined siTRPV6 and siTRPC1 can result from the homo- and heterotetrameric associations of these channels to form the CCE channels. As TRPC1/TRPV6 channels are involved in only about 50% of the ET-induced CCE, the remaining 50% of the CCE involves another channel probably Orai1 protein which has been proposed to form SOCE channels in prostate cancer cells [32,33].

Involvement of the ion channels in ET-1-induced cell proliferation

After the identification of the potassium (IKCa1 and SK3) and calcium (TRPC1, TRPV6 and Orai1) channels in ET-induced CCE, we

studied the involvement of these ion channels in ET-induced cell growth in human PCa cells.

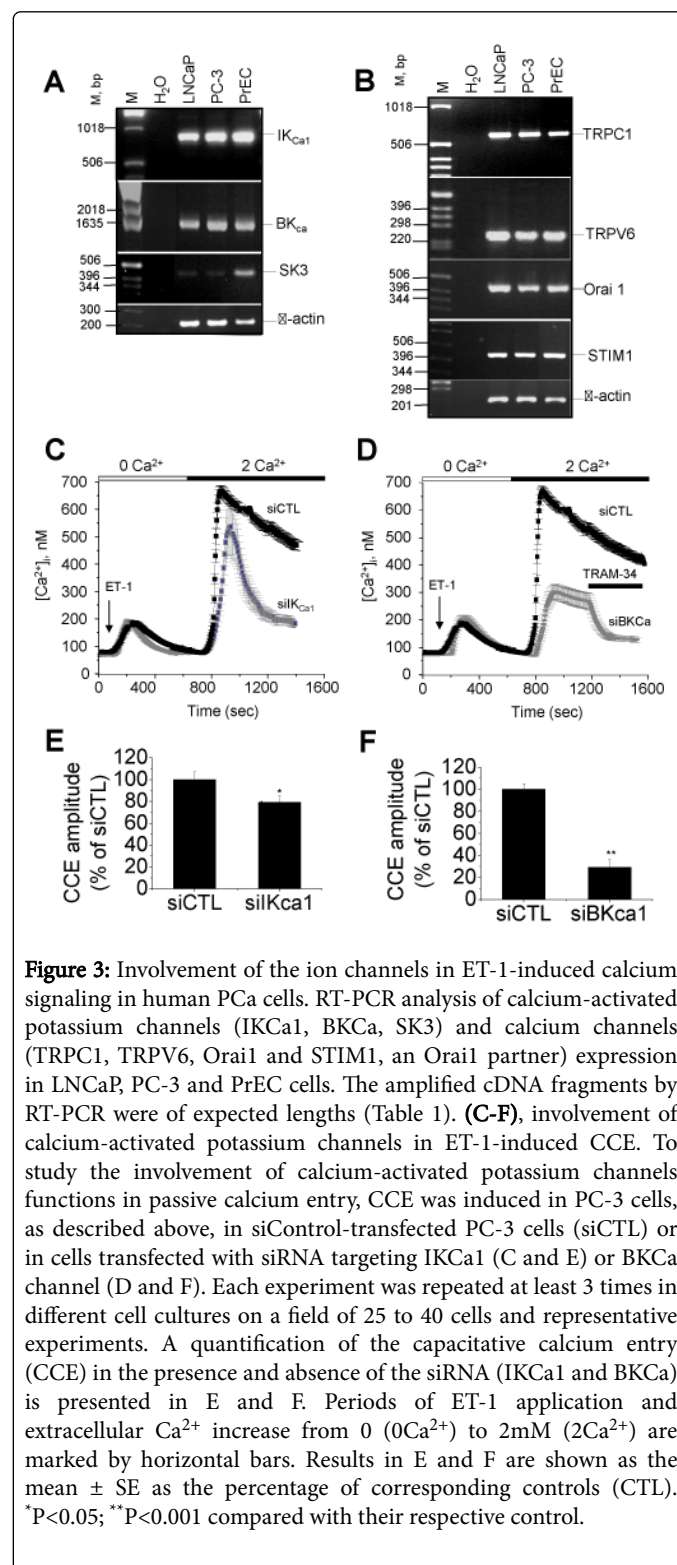


Figure 3: Involvement of the ion channels in ET-1-induced calcium signaling in human PCa cells. RT-PCR analysis of calcium-activated potassium channels (IKCa1, BKCa, SK3) and calcium channels (TRPC1, TRPV6, Orai1 and STIM1, an Orai1 partner) expression in LNCaP, PC-3 and PrEC cells. The amplified cDNA fragments by RT-PCR were of expected lengths (Table 1). (C-F), involvement of calcium-activated potassium channels in ET-1-induced CCE. To study the involvement of calcium-activated potassium channels functions in passive calcium entry, CCE was induced in PC-3 cells, as described above, in siControl-transfected PC-3 cells (siCTL) or in cells transfected with siRNA targeting IKCa1 (C and E) or BKCa channel (D and F). Each experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures on a field of 25 to 40 cells and representative experiments. A quantification of the capacitative calcium entry (CCE) in the presence and absence of the siRNA (IKCa1 and BKCa) is presented in E and F. Periods of ET-1 application and extracellular Ca²⁺ increase from 0 (0Ca²⁺) to 2mM (2Ca²⁺) are marked by horizontal bars. Results in E and F are shown as the mean \pm SE as the percentage of corresponding controls (CTL). *P<0.05; **P<0.001 compared with their respective control.

For these experiments, we used pharmacological tools to inhibit the IKCa1 (TRAM-34, 10 μ M), the BKCa (Paxilline, 10 μ M) potassium channels or the calcium channels involved in SOCE (SKF96365, 10 μ M). First the experiments were performed on PC-3 showed that

TRAM-34 (10 μ M) and SKF96365 (10 μ M) inhibited the basal cell growth by 42% and 63% respectively, suggesting the involvement of IKCa1 and SOC channels in basal cell growth (Figure 6A). In these experiments, the BKCa channel inhibitor (Paxilline) failed to affect the basal cell growth in PC-3 cells. When the ET-1 was added in the culture medium in the presence of the different inhibitors, we observed that the ET-induced cell growth in PC-3 cells was inhibited by IKCa1 (TRAM-34), the BKCa (Paxilline) potassium channels and by the inhibitor of the calcium channels involved in CCE (SKF96365) (Figure 6A). These experiments suggest that the identified potassium (IKCa1 and BKCa) and calcium (TRPC1, TRPV6 and Orai1) channels form a functional complex to increase the driving force for the calcium entry (IKCa1 and BKCa) via the calcium channels (TRPC1, TRPV6 and Orai1).

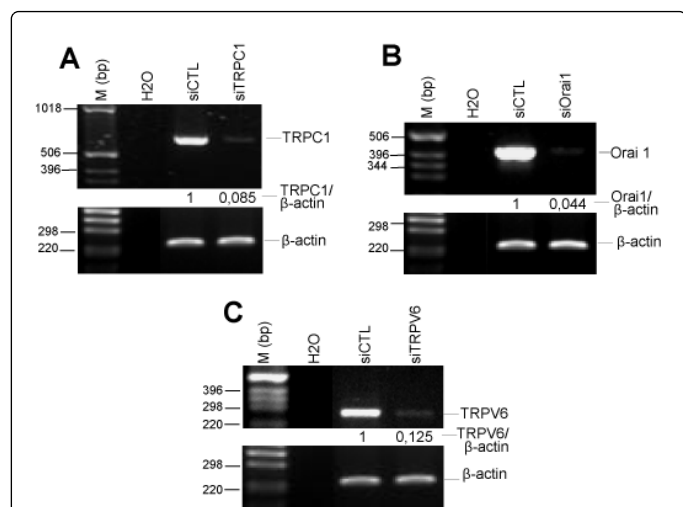


Figure 4: Knock-down of calcium channels in siRNA-transfected PC-3 cells. Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed to study the expression of TRPC1 (A), Orai1 (B) and TRPV6 (C) mRNA using specific primers in prostate cancer epithelial cells PC-3. siRNA down-regulation efficacy for each ion channel was assessed by RT-PCR after siRNA treatments (20 nM, 48 h). To show the efficacy of the siRNA to down-regulate the ion channels intact mRNA levels, the expression rate in each sample is normalized by densitometry using β -actin expression as an internal standard. To address the participation of Orai1 channels in the remaining 50% of the CCE not inhibited by the siTRPV6 and siTRPC1 treatments, cells were treated with siOrai1 alone (20 nM, 48 h) or in combination with siTRPV6 and siTRPC1. As shown in Figure 5D and inset, in siOrai-1 (20 nM, 48 h)-treated cells, the amplitude of the CCE was decreased by $50 \pm 7\%$ vs. CTL (n=151) in PC-3 cells (Figure 6). These data suggest that 50% of the CCE induced by ET-1 in PC-3 involve the functionality of Orai-1 channel. Taken together, these results suggest that in PC-3 cells, the TRPC1, TRPV6 and Orai1 are involved in the ET-1-induced CCE by forming homo- or multi-tetramers. These different possibilities of ion channels complex formations in PC-3 cells need further investigations.

Similar experiments were performed in primary cultured PCA epithelial cells PrEC. As shown in (Figure 6B), ET-1 induced a dose-dependent cell growth which was inhibited by the inhibitor of the calcium channels involved in CCE (SKF96365).

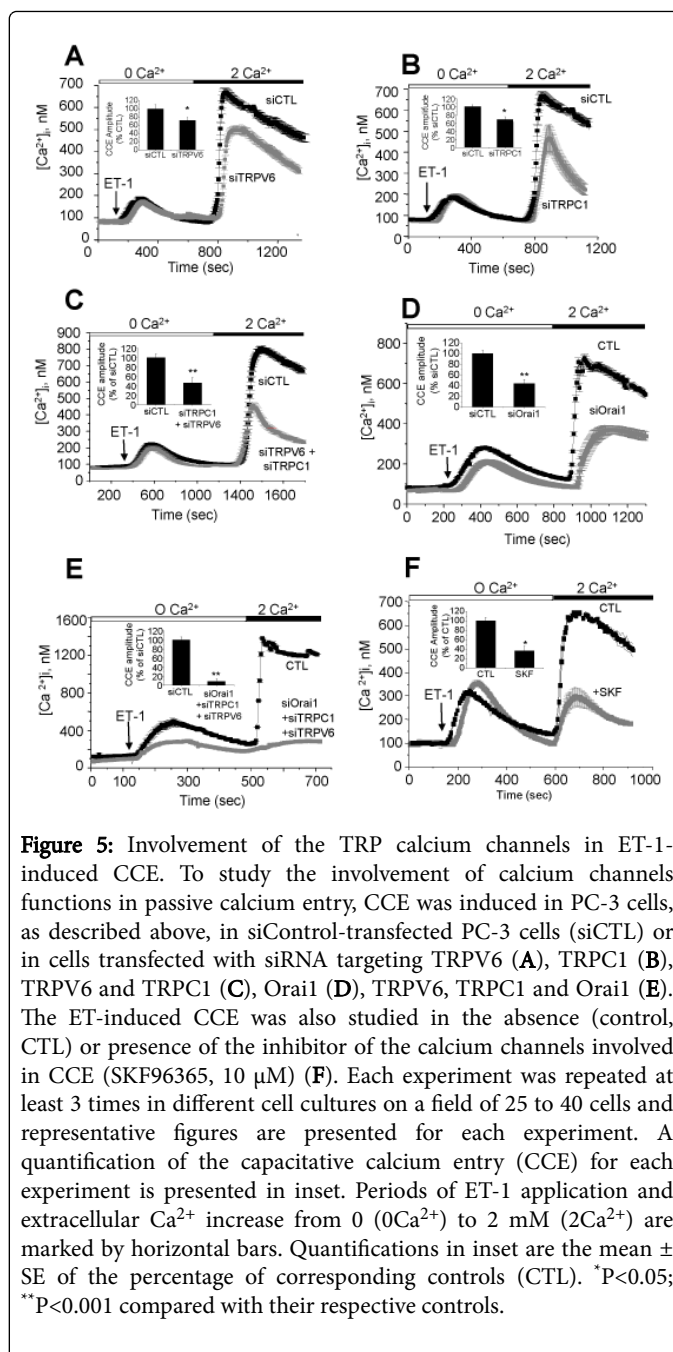


Figure 5: Involvement of the TRP calcium channels in ET-1-induced CCE. To study the involvement of calcium channels functions in passive calcium entry, CCE was induced in PC-3 cells, as described above, in siControl-transfected PC-3 cells (siCTL) or in cells transfected with siRNA targeting TRPV6 (A), TRPC1 (B), TRPV6 and TRPC1 (C), Orai1 (D), TRPV6, TRPC1 and Orai1 (E). The ET-induced CCE was also studied in the absence (control, CTL) or presence of the inhibitor of the calcium channels involved in CCE (SKF96365, 10 μ M) (F). Each experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures on a field of 25 to 40 cells and representative figures are presented for each experiment. A quantification of the capacitative calcium entry (CCE) for each experiment is presented in inset. Periods of ET-1 application and extracellular Ca^{2+} increase from 0 ($0Ca^{2+}$) to 2 mM ($2Ca^{2+}$) are marked by horizontal bars. Quantifications in inset are the mean \pm SE of the percentage of corresponding controls (CTL). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ compared with their respective controls.

One of the way by which Ca^{2+} may act to affect cell proliferation is the activation of NFAT transcription factor. The well-known calcium-sensitive phosphatase calcineurin is a CaM- Ca^{2+} -activated phosphatase, activated by an increase of $[Ca^{2+}]_i$. After activation, the phosphatase dephosphorylates the NFAT transcription factor and induces its translocation in the nucleus to activate the gene transcription. A number of activated-NFAT transcription factor are known to favour the cell proliferation by inducing the transcription of genes involved in cell growth. To explore the involvement of Ca^{2+} and the calcineurin/NFAT pathway in ET-1-induced prostate cancer cell proliferation, we used calcineurin inhibitors, FK506 and Cyclosporin A. When the prostate cancer cells were treated by FK506 (10 μ M), the

cell proliferation induced by ET-1 was completely blocked in PC-3 cells (Figure 6A) and in PrEC cells (Figure 6B).

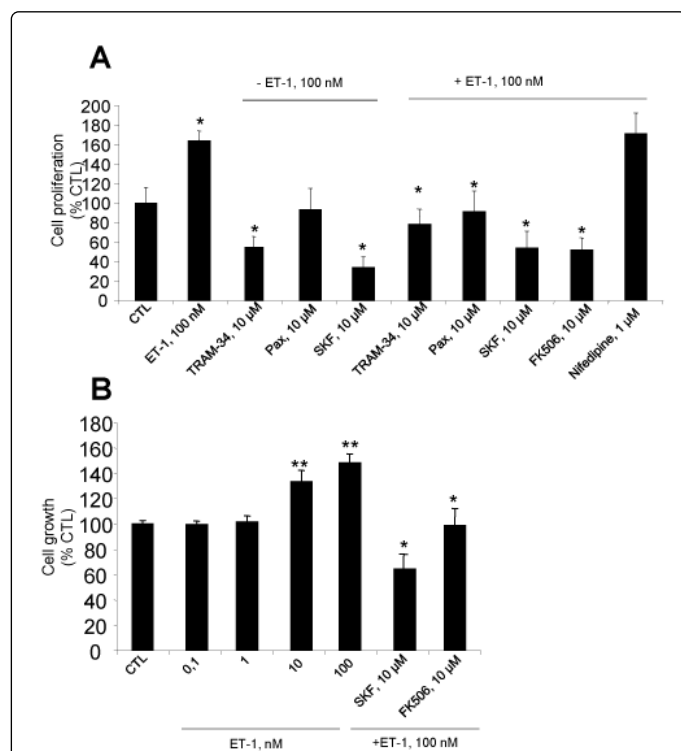


Figure 6: Involvement of potassium and calcium channels in ET-1-induced cell growth in PCa cells. (A) Involvement of the ion channels in ET-1-stimulated cell growth was studied by using TRAM-34 (10 μM), P axilline (10 μM), inhibitors of IKCa1 and BKCa respectively, SKF96365 (10 μM), an inhibitor of the calcium channels involved in CCE and Nifedipine, (1 μM), an inhibitor of voltage-gated calcium channels. In these experiments, an inhibitor of Calcineurin (FK506, 10 μM) was used to study the involvement of calcium-activated Calcineurin/NFAT pathway in ET-induced cell growth. Experiments were performed in 96-well plates (8 wells/per condition) and results are shown as the mean ± SE. Experiments were repeated four times in independent PC-3 cell cultures and a representative figure is presented. Results are presented as the percentage of medium alone control (CTL). *P<0.05; **P<0.001 compared with their appropriate controls (inhibitors alone and ET-1 conditions are compared to medium alone (CTL), inhibitors in the presence of ET-1 are compared to ET-1 alone). (B), involvement of calcium in RT-induced cell growth in primary cultured prostate cancer cells (PrEC). ET-1 a dose-dependent cell growth in PrEC. The ET-1 induced cell growth was inhibited by SKF96365 (10 μM), an inhibitor of the calcium channels involved in CCE and FK506 (10 μM), showing the involvement of calcium entry and Calcineurin/NFAT pathway in ET-induced cell growth in PrEC. Experiments were performed as described above and results are shown as the mean ± SE. Experiments were repeated four times in independent primary cell cultures and a representative figure is presented. Results are presented as the percentage of medium alone control (CTL). *P<0.05; **P<0.001 compared with their appropriate controls (ET-1 conditions are compared to medium alone (CTL), inhibitors in the presence of ET-1 are compared to ET-1 alone).

Similar results were obtained in PC-3 cells by using the cyclosporine A (data not shown). These data suggest that the increase in free cytosolic calcium concentration is implicated in the mitogenic effect of ET-1 by activating the Ca²⁺/Calcineurin/NFAT pathway (Figure 7).

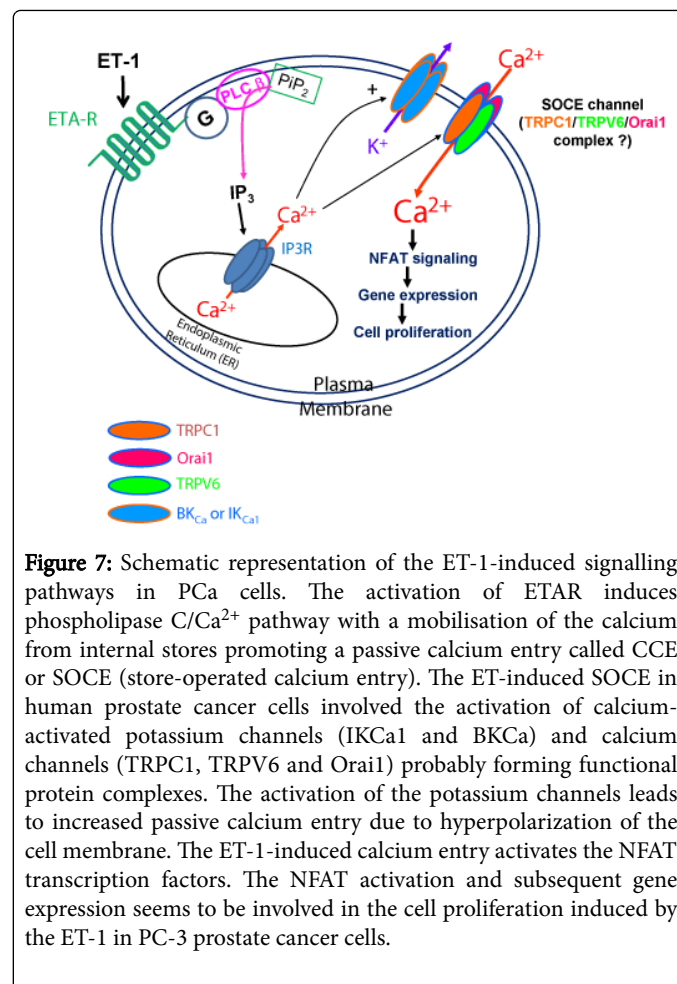


Figure 7: Schematic representation of the ET-1-induced signaling pathways in PCa cells. The activation of ETAR induces phospholipase C/Ca²⁺ pathway with a mobilisation of the calcium from internal stores promoting a passive calcium entry called CCE or SOCE (store-operated calcium entry). The ET-induced SOCE in human prostate cancer cells involved the activation of calcium-activated potassium channels (IKCa1 and BKCa) and calcium channels (TRPC1, TRPV6 and Orai1) probably forming functional protein complexes. The activation of the potassium channels leads to increased passive calcium entry due to hyperpolarization of the cell membrane. The ET-1-induced calcium entry activates the NFAT transcription factors. The NFAT activation and subsequent gene expression seems to be involved in the cell proliferation induced by the ET-1 in PC-3 prostate cancer cells.

Discussion

The ET-1 axis has recently been identified as contributing to prostate cancer progression by inducing cell proliferation [34], apoptosis protection, angiogenesis, and invasiveness. ET-1 has been also shown to be mitogenic and to act as an autocrine or paracrine regulator of growth in many tumor cells [2,35] and anti-apoptotic in prostate cancer [36]. The ETAR is thus actually considered as a new therapeutic target in drug design for the prostate cancers treatments. Ion channels play important roles in several cellular functions such as excitability, contraction, cell cycle progression and metabolism and the link between ion channels and disease has received widespread attention in the last decade. The activation of the ET-1 axis was shown to involve the intracellular Ca²⁺ signalling pathways implicating calcium and potassium channels [4,8,32]. However, the cell signalling involved in the ET-1 transduction pathways remain unknown in human prostate cancer cells.

In the present work, we studied for the first time the effects of ET-1 on proliferation of the human prostate cells and the mechanisms by which activation of ETRs may promote the growth of these cells. We show that the application of ET-1 caused a dose-dependent cell

proliferation and an increase in intracellular free Ca^{2+} concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) via a mobilisation of the internal calcium stores and by a capacitative calcium entry (CCE) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells. These effects of ET-1 were completely abolished by BQ123, a selective ETAR antagonist, but not by BQ788, a selective ETBR antagonist. By use of the siRNA targeting calcium-activated (IKCa1 and BKCa) potassium channels and calcium channels (TRPC1, TRPV6, Orai1), we showed that these ion channels play an important role in calcium entry induced by ET-1 in PCa cells. These results suggest that these ion channels evidenced here may provide potential targets to block the ET axis in prostate cancers.

Among the Ca^{2+} -activated K^+ channels family, BKCa and IKCa1 may contribute to cell proliferation and migration. We have recently showed that the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IKCa1) is implicated in prostate cancer cell proliferation. Moreover, a recent study has shown that the maxi-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (BKCa channels) may play an important role in the progression of human cancer [37]. These results indicate that BKCa channels play an important role in regulating proliferation of human ovarian cancer cells and may induce apoptosis through induction of p21Cip1 expression in a p53-dependent manner.

The ET-1 axis has recently been identified as contributing to prostate cancer progression by inducing cell proliferation [34], apoptosis protection, angiogenesis, and invasiveness, indicating that the pharmacologic inhibition of the ETR signaling pathways may constitute interesting new targets in PCa treatments. ET-1 has been shown to be mitogenic and to act as an autocrine or paracrine regulator of growth in many tumor cells [2,35]. As PCa cells are shown to secrete ET-1, this factor may exert its mitogenic effect in these cells through autocrine mechanisms. A criterion for autocrine growth regulation is an inhibition of spontaneous growth by selective receptor antagonists that specifically block the biological action of the endogenous growth-promoting ligand. Data obtained in this study do support such a view. The results of the present study showed that spontaneous proliferation of unstimulated PC-3 cells was inhibited by the ETAR antagonist BQ123, but not by ETBR antagonist BQ788, suggesting that ET-1 is an autocrine growth factor involved in the regulation of prostate cancer cell proliferation. ET-1 and ETAR not only influence cell proliferation directly but also act synergistically with polypeptide growth factors that are relevant to cancer progression, such as EGF and its receptors [38-40]. ET-1 is known to exert its action through activation of ETAR and ETBR, both of which are expressed in many tumor cells. The mitogenic contributions of the ET receptor subtypes are different in different types of tumors. Several groups have demonstrated that in epithelial tumors *in vitro*, the ET-1-induced mitogenic effect is mediated via the ETAR and in nonepithelial tumors *in vitro* ETBR is involved in this process [17,35,39,41]. The present study showed that even though both ETAR and ETBR are found in LNCaP and PC-3 cells, the mitogenic effect and calcium signaling of ET-1 these cells were mediated predominantly by ETAR. This is evident from the fact that the proliferation and increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by ET-1 (100 nM) could be blocked by BQ123, a selective ETAR antagonist, but not by BQ788, a selective ETBR antagonist. These results are consistent with previous studies showing that the major function of ETAR is linked to mitogenic signal transduction [35] and [2]. However, the specific function of ETBR expressed in prostate cancer cells remains unknown. It has been proposed in lung cancer that ETBR exerts a variety of compensatory activities, including ET-1 clearance, inhibition of ET-1 secretion, and activation of signal transduction pathways that

feedback-regulate the effects of ET-1 [42]. Moreover, a previous study showed that the ETAR-mediated mitogenic and proliferative effect of ET-1 could be enhanced by methylation-induced inactivation of ETBR, leading to the loss of its unique negative regulatory functions [5]. Further investigation is needed to explore the biological role of ETBR in prostate cancer. $[Ca^{2+}]_i$ has been shown to be an intracellular secondary messenger that mediates ET-1-induced mitogenic actions in a variety of cell including endothelial cells and vascular smooth muscle cells [43]. However, little is known about the role of $[Ca^{2+}]_i$ in ET-1-induced mitogenic effects in tumor cells, and no information is yet available in prostate cancer cells. To obtain direct evidence, we first determined the effect of ET-1 on $[Ca^{2+}]_i$ and then explored its role in the ET-1-induced mitogenic effects in PC-3 and primary-cultured PCa epithelial cells. The $[Ca^{2+}]_i$ response typically consisted of a spike phase followed by a prolonged plateau phase and was blocked by the ETA-selective receptor antagonist BQ123, which further indicates that the ETAR expressed by human prostate cancer cells is a functional receptor that is linked to the intracellular Ca^{2+} signalling pathway. Data from this study are consistent with the previous observations in human ovarian carcinoma cells [17,44], human cervix (HeLa) and larynx (Hep-2) cells [7]. In such cells, the functional activity of the ETAR was indicated by the ability of ET-1 to induce dose-dependent increases in $[Ca^{2+}]_i$ which are inhibited by the specific ETAR antagonist, BQ123. It is well established that the elevation of $[Ca^{2+}]_i$ induced by ET-1 and ETAR mainly results from Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores via the PLC/phosphoinositol/ Ca^{2+} pathway. To further determine the role of $[Ca^{2+}]_i$ in ET-1-induced proliferation of LNCaP and PC-3 cells and to identify possible alternative Ca^{2+} pathways, we investigated two different mechanisms by using a PLC inhibitor (U73122) and potassium and calcium channel blockers. The ET-1-induced cell proliferation (Figure 1) and increases of $[Ca^{2+}]_i$ at 100 nM (data not shown) were significantly reduced by U73122, the specific inhibitor of PLC, but not by U73433, its inactive analogue.

Chelating intracellular Ca^{2+} reduced the ET-1-induced mitogenic effects PC-3 and PrCE cells. These data indicate that the ET-1 induced elevation of $[Ca^{2+}]_i$ and that the Ca^{2+} release from intracellular stores via activation of the phospholipase C/phosphoinositol/ Ca^{2+} pathway [1]. The $[Ca^{2+}]_i$ plays an important role in the ET-1-induced cell proliferation. The results of the present study are compatible with the importance of Ca^{2+} signalling and related responses in the ET-1-induced mitogenesis in vascular smooth muscle cells [43] and the human ovarian carcinoma cells [17]. Taken together with the findings presented above, we provide the first evidence that $[Ca^{2+}]_i$ plays an important role in the ET-1-induced cell proliferation in prostate cancer cells. Number of studies has shown that the ET-1 effects on cell proliferation of osteoblasts involve the activation of the calcineurin/NFAT pathways leading to the nuclear translocation of NFAT1, [45]. Our results obtained by using an inhibitor of the Calcineurin (FK506) suggest the involvement of the calcineurin/NFAT pathways in ET-1-induced cell growth in human prostate cancer cells.

Since it was reported that intracellular downstream effectors for direct ET-1-induced proliferative action, including PKC, EGF, insulin-like growth factor-1 and mitogen-activated protein kinase (MAPK), have been identified to various degrees in a number of cancers [38,46,47], it is likely that the molecular mechanisms that underlie this activity are varied in different tumors. Further studies are required to explore whether the Ca^{2+} -independent signalling pathway is involved in this process.

Increased ETAR expression is also seen in both primary and metastatic prostate cancer, correlating positively with advancing tumor stage and grade. The results of this study showed that mRNA of ETAR and ETBR are expressed in the human prostate cancer cells LNCaP and PC-3. We are finding in this study that ET-1 increase $[Ca^{2+}]_i$ in the prostate cancer cells androgeno-dependent LNCaP and androgeno-independent PC-3 and that the $[Ca^{2+}]_i$ plays an important role in the mitogenic effect of ET-1 in prostate cancer cells.

This increase of the $[Ca^{2+}]_i$ is inhibited by the agonist of the ETAR (BQ123) demonstrating that this mechanism passes by the activation of ETAR. We have studied the capacitive calcium entry (CCE) induced by the ET-1. However we observe a CCE whose amplitude is 3 times superior at the increase of calcium that one observes in condition $2Ca^{2+}$. However, when the cells are placed in a medium without calcium, we observed an increase in the amplitude of the calcium response corresponding to the mobilization from internal stores and to the CCE. These observations could be due to the fact that the calcium channels implied in this CCE in response to ET-1 are translocated to the plasma membrane when the cells are incubated in a without calcium. In the present studies, using the pharmacological tools and the siRNA technology, we identified the calcium-activated potassium channels and the calcium channels involved in CCE induced by ET-1 in prostate cancer cells. As the calcium entry appear to be a pathway involved in the effects of the ET-1 on the prostate cancer cells, these channels could constitute the targets in the development of the therapeutic strategies targeting the ET-1 axis in prostate cancer.

ET-1 production by prostate cancer cells is down-regulated by androgens and up-regulated by factors involved in tumour progression indicating a role for this peptide in the biology of prostate cancer [48]. The ET-1 is overexpressed with prostate cancer evolution so this peptide can promote cancer proliferation. Overexpression of the ETAR has been found in a number of human cancer cell lines. Activation of the ETAR by endothelin-1 (ET-1) promotes cell proliferation and survival in these tumours, whereas activation of the ETBR results in an opposing effect. Therefore, blockade of ETAR may have antitumor effects, while sparing ETBR-mediated effects such as induction of apoptosis and clearance of ET-1. However, a study showed that the inhibition of the ETBR, and not the ETAR, inhibited the growth of the cancerous cells of skin [49]. Actually, the ET-1 axis is considered as a therapeutic target in cancer. The discovery of the ET-1 axis components and their function in human cancer has propelled the development a number of different approaches to target them. One of the most promising approaches is represented by the use of potent and selective ETAR, ETBR, or mixed ETAR/ETBR antagonists, which enhance tumor perfusion, thus potentiating the therapeutic efficacy of anticancer agents. The critical role of ET-1 axis and the therapeutic relevance of ET-1 receptor antagonists in a range of malignancies have led to a new generation of molecularly targeted therapies for cancer. Clinical testing of atrasentan, ETAR antagonist, has demonstrated benefit in prostate-specific antigen (PSA) progression, markers of bone turnover, and decreases pain in men with prostate cancer, but has not demonstrated significant improvement in survival or time to cancer progression [14]. The ET-1 axis has recently been identified as contributing of lot of cancer as prostate cancer [34]. The endothelin-converting enzyme (ECE-1) is overexpressed in prostate cancer [50]. In the noncancerous prostate gland, ET-1 is produced by epithelial cells, the highest concentration of ET-1 being found in the seminal fluid. In prostate cancer, key components of the ET-1 clearance pathway, such as ETBR, are diminished, resulting in an increase in local ET-1 concentrations. Increased ETAR expression is also seen in both

primary and metastatic prostate cancer, correlating positively with advancing tumor stage and grade. Actually, Atrasentan is a potent, oral, selective endothelin-A (ETA) receptor antagonist that has clinical activity in patients with hormone-refractory prostate cancer (HRPC). The authors of this study report the results from a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of atrasentan in patients with non-metastatic HRPC [15].

Accumulating data have shown that increases in intracellular free Ca^{2+} play a major role in many cellular processes. The deregulation of Ca^{2+} signalling is a feature of a variety of diseases, and modulators of Ca^{2+} signalling are used to treat conditions as diverse as hypertension to pain. The Ca^{2+} signal also plays a role in processes important in cancer, such as proliferation and migration. Many studies in cancer have identified alterations in the expression of proteins involved in the movement of Ca^{2+} across the plasma membrane and subcellular organelles. In some cases, these Ca^{2+} channels or pumps are potential therapeutic targets for specific cancer subtypes or correlate with prognosis [51]. A remodelling of calcium homeostasis can occur in cancer cells. Although alterations in Ca^{2+} signalling may not be a requirement for the initiation of cancer, the consequences of altered calcium transport in cancer cells may be significant and contribute to tumor progression. Characterizing such changes may help to identify new therapeutic targets. The influx of calcium across the plasma membrane into the cell is a key trigger or regulator of cellular processes relevant to tumor progression, including proliferation, migration, and apoptosis. Ca^{2+} -permeable ion channels of almost every class have now been associated with aspects of tumor progression [52]. During carcinogenesis, Ca^{2+} signalling of some malignant cells is significantly remodelled in a way that compromises normal physiological functions at the same time enabling them to overwhelm normal cells by giving them unconditional advantages for uncontrolled multiplication, evasion of programmed cell death, adaptation to oxygen and nutrients sparse conditions, invasion and spreading beyond the primary tumour site [52]. Nevertheless, as malignant remodelling of Ca^{2+} signalling helps to sustain cancer hallmarks, learning its intimate mechanisms and identifying the molecular players involved poses an opportunity for therapeutic halting the progression of certain hallmarks or even reversing them.

Several mechanisms are shown to be involved in the regulation of ion channels expression in cancer: tumor Hypoxia [53,54], Promoter methylation [55,56], REST (repressor element 1-silencing transcription factor) transcription factor expression [57,58], Androgen [21] and Estrogen Receptor transcription activity [59] and the function of p53 protein in cancer. In the latter context, the authors [60] showed that ion channel genes are differentially expressed with a change in p53 mutation status, ER status, and tumor histological grade of breast cancer. In these studies, five ion channel genes were upregulated in p53 mutant tumors, including *KCNE3*, *KCNN4*, and *MCOLN2*; while 17 ion channel genes were downregulated, including *ANO1*, *KCNMA1*, and *TPCNI*. In the same context, Cheong et al. reported that the gene encoding K(Ca)3.1 calcium activated potassium channel (*KCNN4*) contains a functional repressor element 1-silencing transcription factor (REST or NRSF) binding site and is repressed by REST. These authors showed also that the expression of REST declines when there is cellular proliferation, showing an inverse relationship with functional *KCNN4*. Taken together, these data suggest that the ion channels genes expression is multifactor-dependent and in addition it might be tumor dependent. Recent data showed that the histone methyltransferase G9a also plays a role in the regulation of K(+) channel associated genes [56]. The histone methyltransferase G9a is shown to maintain DNA

methylation via interacting with DNA methyltransferases (DNMTs) [61]. Interestingly, aberrant expression of histone methyltransferase G9a have been found in many malignant carcinomas, including prostate cancer, B cell chronic lymphocytic leukemia, colon cancer, hepatocellular and lung cancer [62] which could be a plausible pathway involved in the overexpression of potassium channels in prostate cancer. The overexpression of the potassium and calcium channels in cancer presents an advantage for cancer cells to modulate the cancer cells membrane potential to promote calcium entry via voltage-independent calcium channels.

Capacitative Calcium Entry (CCE), also named Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), is critical for Ca^{2+} signaling in non-excitabile cells and involved in the transduction pathways of activated receptors to hormones, neurotransmitter and growth factors. Responses regulated by ET-1 have been associated with increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, either by influx of calcium or release of intracellular calcium stores. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is tightly regulated by a multitude of ion channels and exchangers that control influx, efflux, sequestration, and release of calcium [63,64]. However, the involvement of calcium signaling and ion channels in the effects of ET-1 on prostate cancer cells has not been investigated. In the present study, we showed that the activation of the ETAR induced a mobilization of the calcium from internal stores and a passive calcium entry (CCE). We also showed the Ca^{2+} dependency of ET-1-induced proliferation in PCa cells by using the intracellular Ca^{2+} -chelator BAPTA (10 μM) (Figure 1E) where BAPTA abolished ET-1 induced proliferation suggesting an important role played by the ET-1-increased cytosolic calcium increase. Our investigations showed clearly that the ET-induced CCE in human prostate cancer cells involved the activation of calcium-activated potassium channels (IKCa1 and BKCa) and calcium channels (TRPC1, TRPV6 and Orai1). The involvement of these potassium and calcium channels under ET-1 might be due to the formation of a functional complex involved in the calcium entry induced by ET-1. In this complex, by modulating the membrane potential, the functionality of the potassium channels induce an increase in driving force for the calcium entry via the calcium channels. In this context, in a previous work, we showed the expression and functionality of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (IKCa1) in human PCa as well as their involvement in PCa cells proliferation. In this work, the activation of IKCa1 hyperpolarized membrane potential and, by promoting the driving force for calcium, induced calcium entry through TRPV6, a cation channel of the TRP (Transient Receptor Potential) family [19]. In the present study, the activation of ETAR induced a CCE involving these potassium and calcium channels (IKCa1 and TRPV6) participating in the formation of a functional complex activated by the G-protein-coupled receptor (GPCR). In the present study, The ET-1-induced CCE involved also the BKCa potassium channel. The activation of the IKCa1 and BKCa potassium channels by ET-1 receptors activation was previously shown. In porcine coronary artery smooth muscle cells, it has been demonstrated that the activation of ETAR induced an increase in the open probability of BKCa channel [65]. In the same manner, The ET-1 induced the activation of BKCa potassium channels and a calcium entry in HUVEC endothelial cells [66]. In these studies, activation of BKCa by ET-1 induced a capacitative Ca^{2+} influx which plays an important role in ET-1-mediated endothelial cell proliferation. The IKCa1 potassium channel activation by ET-1 has been also shown in astrocytes [67,68]. Similar to our present data, Peng et al. [68] have shown that, by activating ETAR, ET-1 induced the activation of BKCa and IKCa1 by increasing intracellular Ca^{2+} concentration, in human pulmonary vasculature.

However, the mechanism of the ET-1-induced activation of BKCa and IKCa1 potassium channels in these cells systems are not known. One of the most plausible explanations would be the activation of the Ca^{2+} -activated potassium channels by the release of the calcium from internal stores induced by ET-1 as shown in the present study. Store-operated Ca^{2+} entry involved in the development of CCE is a critical Ca^{2+} influx pathway and represents the major Ca^{2+} influx mechanism in non-excitabile cells [69]. The pathway involves the activation of Ca^{2+} influx upon intracellular Ca^{2+} store depletion [69]. The canonical components of store-operated Ca^{2+} entry are the calcium influx channel Orai1 and the endoplasmic Ca^{2+} depletion sensor STIM1 (stromal interaction molecule 1) [70]. This pathway has rapidly become one of the Ca^{2+} influx pathways most studied in cancer. In the present study, our data suggest that 50% of the CCE induced by ET-1 in PC-3 cells involve the functionality of Orai1 channels. The recruitment by ET-1 of the calcium channels involved in CCE has been also the subject of several studies in different cell systems. Ohba et al. were among the first to demonstrate a potential role for Orai1/STIM1 in mediating cardiac hypertrophy [71]. They demonstrated that in neonatal cardiomyocytes ET-1 induced activation of CCE, NFAT nuclear translocation, and cardiomyocyte hypertrophy; importantly, however, all were attenuated following knockdown of STIM1, a protein partner of Orai1. Similar to their earlier study [72], they also found that TRPC1 expression was upregulated in response to ET-1; interestingly, this increase was also attenuated following knockdown of STIM1. Despite the important role of Orai1/STIM1 in CCE, several published data show that the latter proteins are able to form functional complexes with other channel proteins. TRPC channels, including TRPC1, TRPC3, TRPC4, have been proposed as possible candidate channels for these protein complexes. TRPC1 is the best characterized channel in this regard and reported to contribute to endogenous SOCE in many cells types. TRPC1-mediated Ca^{2+} entry and cation current in cells stimulated with agonist or thapsigargin were inhibited by low $[\text{Gd}^{3+}]$ and 10-20 μM 2APB (conditions that block SOCE). Importantly, STIM1 also associates with and gates TRPC1 via electrostatic interaction between STIM1 and TRPC1. Further, store depletion induces dynamic recruitment of a TRPC1/STIM1/Orai1 complex and knockdown of Orai1 completely abrogates TRPC1 function. Despite these findings, there has been much debate regarding the activation of TRPC1 by store depletion as well as the role of Orai1 and STIM1 in SOC channel function [73].

In a published work, Lee et al. [74] studied the interaction between STIM1 and Orai1 and the channels of the TRPC family. They reported that the STIM1 Orai1-activating region domain of STIM1 interacts with the TRPC channel coiled coil domains (CCDs) and that this interaction is essential for opening the channels by STIM1. In this work, they also showed that cell stimulation enhanced the formation of Trpc1-Stim1-Trpc3 complexes. These data suggest also that the Orai1/TRPC1/STIM1 complexes would be able to bind to other calcium channels (TRPV6) to form functional molecular complexes. In this context, Schind et al. [75] showed that TRPV6 exhibited substantial colocalization and *in vivo* interaction with TRPC1 in HEK293 cells.

All these data suggest that in PCa cells, a molecular complex exist or could be formed by Orai1/STIM1/TRPC1/TRPV6 under ET-1 treatment to promote a calcium entry in these cells. But this aspect needs further investigations. In addition, this calcium channel complex could be associated with the calcium-activated potassium channels (IKCa1 and BKCa) as we showed in our previous studies [19] concerning the formation of a IKCa1/TRPV6 involved in the PCa cells proliferation. Similar associations were also shown for TRPC1 and

BKCa calcium and potassium channels. TRPC1 was shown to physically associate with BKCa in vascular smooth muscle cells (VS.MCs) and that Ca^{2+} influx through TRPC1 activates BKCa to induce membrane hyperpolarization. The hyperpolarizing effect of TRPC1-BKCa coupling could serve to reduce agonist-induced membrane depolarization, thereby preventing excessive contraction of VS.MCs to contractile agonists. Interestingly, Orai1 was also shown to interact with BKCa [76]. In the latter work, the authors showed that Orai1 physically associates with BKCa to form a signaling complex in the rat mesenteric artery smooth muscle. Ca^{2+} influx via Orai1 stimulates BKCa, leading to membrane hyperpolarization. Taken together our data presented here suggest the formation in prostate cancer cells of an ion channel molecular complex formed of several calcium-permeable (TRPC1, TRPV6 and Orai1) and potassium channels to promote a calcium entry and cell proliferation in ET-1-stimulated cells.

In summary, we showed that the ETAR and ETBR are expressed in the human prostate cancer cells and ET-1 enhances the proliferation of PC-3 and primary-cultured PCa epithelial cells (PrCE) cells through activation of ETAR. The activation of this receptor induced phosphoinositol/ Ca^{2+} pathway with a mobilisation of the calcium from internal stores and a passive calcium entry (CCE). The ET-induced CCE in human prostate cancer cells involved the activation of calcium-activated potassium channels (IKCa1 and BKCa) and calcium channels (TRPC1, TRPV6 and Orai1) (Figure 7). Interestingly, intracellular calcium and the identified ion channels mediated the ET-1-induced cell growth. As the ions channels described here are expressed in prostate cancer, the present data raise the intriguing possibility that they may be considered as a novel therapeutic target for the treatments of prostate cancer.

Acknowledgments

We would like to thank E Richard for the technical assistance in images analysis by confocal microscopy and A Desmons (INSERM U1192, Université de Lille) for the technical assistance.

Financial support

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Région Nord Pas-de-Calais, Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. H. Lallet-Daher was supported by the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). S. Derouiche was supported by the Région Nord Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

References

1. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT (1996) Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 28: 251-265.

2. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 110-116.
3. Nelson J, Carducci M (1999) The role of the endothelin axis in prostate cancer. *Prostate* 41: 126-130.
4. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, et al. (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* 1: 944-949.
5. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Oppenorth TJ, et al. (1996) Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *below Cancer Res* 56: 663-668.
6. Kusuvara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzuki A, et al. (1990) Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* 50: 3257-3261.
7. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, et al. (1991) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest* 87: 1867-1871.
8. Bagnato A, Rosanò L (2008) The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1443-1451.
9. Masaki T (2000) The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: S3-S5.
10. Le Brun G, Moldovan F, Aubin P, Ropiquet F, Cussenot O, et al. (1996) Identification of endothelin receptors in normal and hyperplastic human prostate tissues. *Prostate* 28: 379-384.
11. Nelson JB, Lee WH, Nguyen SH, Jarrard DF, Brooks JD, et al. (1997) Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res* 57: 35-37.
12. Nelson J, Carducci M, B Z, J B, R J P, et al. (2001) The endothelin-A receptor antagonist atrasentan improves time to clinical progression in hormone refractory prostate cancer patients: a randomized, double-blind, multi-national study. *Journal of Urology* 168.
13. Nelson J, Carducci M, Padley R (2002) The Endothelin-A Receptor Antagonist Atrasentan (ABT-627) Reduces Skeletal Remodeling Activity in Man with Advanced, Hormone Refractory Prostate Cancer. *American Society of Clinical Oncology, San Francisco, CA*: 12.
14. Jimeno A, Carducci M (2006) Atrasentan: a rationally designed targeted therapy for cancer. *Drugs Today (Barc)* 42: 299-312.
15. Nelson JB, Love W, Chin JL, Saad F, Schulman CC, et al. (2008) Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 113: 2478-2487.
16. Plant TD, Zöllner C, Kepura F, Mousa SS, Eichhorst J, et al. (2007) Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Mol Pain* 3: 35.
17. Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D, et al. (1995) Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1: 1059-1066.
18. Lee JG, Zheng R, McCafferty-Cepero JM, Burnstein KL, Nanus DM, et al. (2009) Endothelin-1 enhances the expression of the androgen receptor via activation of the c-myc pathway in prostate cancer cells. *Mol Carcinog* 48: 141-149.
19. Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackiere F, et al. (2009) Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* 28: 1792-1806.
20. Gackière F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P (2006) A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* 39: 357-366.
21. Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crepin A, Delcourt P, et al. (2005) Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* 12: 367-382.
22. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
23. Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H, et al. (1999) Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone

- detected through intracellular Ca^{2+} responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology* 140: 4874-4885.
24. Vanoverberghe K, Mariot P, Vanden Abeele F, Delcourt P, Parys JB, et al. (2003) Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium* 34: 75-85.
25. Douglas SA, Meek TD, Ohlstein EH (1994) Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. *Trends Pharmacol Sci* 15: 313-316.
26. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, et al. (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4892-4896.
27. Simonson MS, Herman WH (1993) Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem* 268: 9347-9357.
28. White TA, Kannan MS, Walseth TF (2003) Intracellular calcium signaling through the cADPR pathway is agonist specific in porcine airway smooth muscle. *FASEB J* 17: 482-484.
29. Tykocki NR, Watts SW (2010) The interdependence of endothelin-1 and calcium: a review. *Clin Sci (Lond)* 119: 361-372.
30. Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2003) Store-operated Ca^{2+} current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca^{2+} transporter type 1. *J Biol Chem* 278: 15381-15389.
31. 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.
32. Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphaël M, Vandenbergh M, et al. (2010) Orail contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 1: e75.
33. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, et al. (2007) Orail proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4682-4687.
34. Kopetz ES, Nelson JB, Carducci MA (2002) Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. *Invest New Drugs* 20: 173-182.
35. Grant K, Loizidou M, Taylor I (2003) Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer* 88: 163-166.
36. Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR (2005) Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia* 7: 631-637.
37. Han X, Xi L, Wang H, Huang X, Ma X, et al. (2008) The potassium ion channel opener NS1619 inhibits proliferation and induces apoptosis in A2780 ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 205-209.
38. Grant K, Knowles J, Dawas K, Burnstock G, Taylor I, et al. (2007) Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines. *Br J Surg* 94: 106-112.
39. Rosano GM, Gebara O, Sheiban I, Silvestri A, Wajngarten M, et al. (2007) Acute administration of 17beta-estradiol reduces endothelin-1 release during pacing-induced ischemia. *Int J Cardiol* 116: 34-39.
40. Jia RP, Jiang YF, Xu LW, Wang SK, Wang ZZ, et al. (2008) [Epidermal growth factor up-regulates the mRNA expression of endothelin-1 and its receptors in prostate cancer PC-3 cell lines]. See comment in PubMed Commons below *Zhonghua Nan Ke Xue* 14: 15-19.
41. Bagnato A, Rosano L, Di Castro V, Albini A, Salani D, et al. (2001) Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *Am J Pathol* 158: 841-847.
42. Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M, et al. (1994) Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 113: 336-338.
43. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, et al. (1988) Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 238: 249-252.
44. Bagnato A, Venuti A, Di Castro V, Marcante ML (1995) Identification of the ETA receptor subtype that mediates endothelin induced autocrine proliferation of normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 80-86.
45. Van Sant C, Wang G, Anderson MG, Trask OJ, Lesniewski R, et al. (2007) Endothelin signaling in osteoblasts: global genome view and implication of the calcineurin/NFAT pathway. *Mol Cancer Ther* 6: 253-261.
46. Vacca F, Bagnato A, Catt KJ, Tecce R (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 60: 5310-5317.
47. Pirtskhalaishvili G, Nelson JB (2000) Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate* 44: 77-87.
48. Granchi S, Brocchi S, Bonaccorsi L, Baldi E, Vinci MC, et al. (2001) Endothelin-1 production by prostate cancer cell lines is up-regulated by factors involved in cancer progression and down-regulated by androgens. *Prostate* 49: 267-277.
49. Rosano L, Spinella F, Genovesi G, Di Castro V, Natali PG, et al. (2004) Endothelin-B receptor blockade inhibits molecular effectors of melanoma cell progression. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1: S136-139.
50. Dawson LA, Maitland NJ, Berry P, Turner AJ, Usmani BA (2006) Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 in human prostate cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 1106-1110.
51. Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ (2012) Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* 287: 31666-31673.
52. Prevarskaya N, Ouadid-Ahidouch H, Skryma R, Shuba Y (2014) Remodelling of Ca^{2+} transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130097.
53. Resnik E, Herron J, Fu R, Ivy DD, Cornfield DN (2006) Oxygen tension modulates the expression of pulmonary vascular BKCa channel alpha- and beta-subunits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L761-761L768.
54. Ahn YT, Kim YM, Adams E, Lyu SC, Alvira CM, et al. (2012) Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates KCNMB1 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302: 352-359.
55. Ryland KE, Hawkins AG, Weisenberger DJ, Punj V, Borinstein SC, et al. (2016) Promoter Methylation Analysis Reveals That KCNA5 Ion Channel Silencing Supports Ewing Sarcoma Cell Proliferation. *Mol Cancer Res* 14: 26-34.
56. Laumet G, Garriga J, Chen SR, Zhang Y, Li DP, et al. (2015) G9a is essential for epigenetic silencing of K(+) channel genes in acute-to-chronic pain transition. *Nat Neurosci* 18: 1746-1755.
57. Takano M, Kinoshita H, Shioya T, Itoh M, Nakao K, et al. (2010) Pathophysiological remodeling of mouse cardiac myocytes expressing dominant negative mutant of neuron restrictive silencing factor. *Circ J* 74: 2712-2719.
58. Cheong A, Bingham AJ, Li J, Kumar B, Sukumar P, et al. (2005) Downregulated REST transcription factor is a switch enabling critical potassium channel expression and cell proliferation. *Mol Cell* 20: 45-52.
59. Greaves E, Grieve K, Horne AW, Saunders PT (2014) Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 99: E1738-1743.
60. Ko JH, Ko EA, Gu W, Lim I, Bang H, et al. (2013) Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. *Mol Cancer* 12: 106.
61. Zhang Y, Chen SR, Laumet G, Chen H, Pan HL (2016) Nerve Injury Diminishes Opioid Analgesia through Lysine Methyltransferase-mediated Transcriptional Repression of mu-Opioid Receptors in Primary Sensory Neurons. *J Biol Chem* 291: 8475-8485.

62. Huang J, Dorsey J, Chuikov S, Pérez-Burgos L, Zhang X, et al. (2010) G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 285: 9636-9641.
63. Parekh AB (2008) Ca²⁺ microdomains near plasma membrane Ca²⁺ channels: impact on cell function. *J Physiol* 586: 3043-3054.
64. Leung FP, Yung LM, Yao X, Laher I, Huang Y (2008) Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 153: 846-857.
65. Hu S, Kim HS, Savage P, Jeng AY (1997) Activation of BK(Ca) channel via endothelin ET(A) receptors in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 324: 277-282.
66. Kuhlmann CR, Most AK, Li F, Münz BM, Schaefer CA, et al. (2005) Endothelin-1-induced proliferation of human endothelial cells depends on activation of K⁺ channels and Ca⁺ influx. *Acta Physiol Scand* 183: 161-169.
67. Supattapone S, Ashley CC (1991) Endothelin Opens Potassium Channels in Glial Cells. *Eur J Neurosci* 3: 349-355.
68. Peng W, Michael JR, Hoidal JR, Karwande SV, Farrukh IS (1998) ET-1 modulates KCa-channel activity and arterial tension in normoxic and hypoxic human pulmonary vasculature. *Am J Physiol* 275: L729-739.
69. Campbell GR, Campbell JH (1985) Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 42: 139-162.
70. Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Abdullaev IF, Bisailon JM, et al. (2009) Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J* 23: 2425-2437.
71. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Sato T, Ono K, et al. (2009) Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 172-176.
72. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Takahashi Y, Iino K, et al. (2007) Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 42: 498-507.
73. Cheng KT, Ong HL, Liu X, Ambudkar IS (2011) Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca⁽²⁺⁾ entry activated by store depletion. *Adv Exp Med Biol* 704: 435-449.
74. Lee KP, Choi S, Hong JH, Ahuja M, Graham S, et al. (2014) Molecular determinants mediating gating of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *J Biol Chem* 289: 6372-6382.
75. Schindl R, Fritsch R, Jardin I, Frischauf I, Kahr H, et al. (2012) Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 287: 35612-35620.
76. Chen M, Li J, Jiang F, Fu J, Xia X, et al. (2016) Orai1 forms a signal complex with BKCa channel in mesenteric artery smooth muscle cells. *Physiol Rep* 4.

Bibliographie

- Abdul, M. and N. Hoosein (2002). "Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer." *Cancer Lett* **186**(1): 99-105.
- Abrahamsson, P. A. (1999). "Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate." *Endocr Relat Cancer* **6**(4): 503-519.
- Acloque, H., M. S. Adams, K. Fishwick, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." *J Clin Invest* **119**(6): 1438-1449.
- Adelman, J. P., J. Maylie and P. Sah (2012). "Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: form and function." *Annu Rev Physiol* **74**: 245-269.
- Akl, H., G. Monaco, R. La Rovere, et al. (2013). "IP3R2 levels dictate the apoptotic sensitivity of diffuse large B-cell lymphoma cells to an IP3R-derived peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2." *Cell Death Dis* **4**: e632.
- Akopian, A. N., N. B. Ruparel, A. Patwardhan, et al. (2008). "Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation." *J Neurosci* **28**(5): 1064-1075.
- Albarran, L., J. J. Lopez, N. Dionisio, et al. (2013). "Transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) modulates store-operated Ca(2+) entry by regulation of STIM1-Orai1 association." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 3025-3034.
- Alenmyr, L., A. Herrmann, E. D. Hogestatt, et al. (2011). "TRPV1 and TRPA1 stimulation induces MUC5B secretion in the human nasal airway in vivo." *Clin Physiol Funct Imaging* **31**(6): 435-444.
- Alonso, M. T. and J. Garcia-Sancho (2011). "Nuclear Ca(2+) signalling." *Cell Calcium* **49**(5): 280-289.
- Amaral, T. M., D. Macedo, I. Fernandes, et al. (2012). "Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment." *Prostate Cancer* **2012**: 327253.
- Ammon, J., J. H. Karstens and P. Rathert (1977). "[TNM-system orientated radiological therapy in prostatic carcinoma (author's transl)]." *Urologe A* **16**(2): 73-82.
- Anand, U., W. R. Otto, P. Facer, et al. (2008). "TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons." *Neurosci Lett* **438**(2): 221-227.
- Anderson, P. R., A. L. Hanlon, A. Patchefsky, et al. (1998). "Perineural invasion and Gleason 7-10 tumors predict increased failure in prostate cancer patients with pretreatment PSA <10 ng/ml treated with conformal external beam radiation therapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **41**(5): 1087-1092.
- Andersson, D. A., C. Gentry, L. Alenmyr, et al. (2011). "TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol." *Nat Commun* **2**: 551.
- Andersson, D. A., C. Gentry, E. Light, et al. (2013). "Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1." *PLoS One* **8**(10): e77986.
- Andersson, D. A., C. Gentry, S. Moss, et al. (2008). "Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress." *J Neurosci* **28**(10): 2485-2494.
- Andreadi, C., R. G. Britton, K. R. Patel, et al. (2014). "Resveratrol-sulfates provide an intracellular reservoir for generation of parent resveratrol, which induces autophagy in cancer cells." *Autophagy* **10**(3): 524-525.
- Angleton, J. K., A. J. Cochilla, G. Kilic, et al. (1999). "Regulation of dense core release from neuroendocrine cells revealed by imaging single exocytic events." *Nat Neurosci* **2**(5): 440-446.
- Ao, M., B. M. Brewer, L. Yang, et al. (2015). "Stretching fibroblasts remodels fibronectin and alters cancer cell migration." *Sci Rep* **5**: 8334.
- Armandari, I., A. R. Hamid, G. Verhaegh, et al. (2014). "Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy." *Prostate Int* **2**(3): 105-113.
- Arnold, J. T., B. A. Lessey, M. Seppala, et al. (2002). "Effect of normal endometrial stroma on growth and differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells." *Cancer Res* **62**(1): 79-88.
- Aroeira, L. S., A. Aguilera, J. A. Sanchez-Tomero, et al. (2007). "Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions." *J Am Soc Nephrol* **18**(7): 2004-2013.
- Atoyan, R., D. Shander and N. V. Botchkareva (2009). "Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin." *J Invest Dermatol* **129**(9): 2312-2315.

- Attar, R. M., C. H. Takimoto and M. M. Gottardis (2009). "Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes." Clin Cancer Res **15**(10): 3251-3255.
- Augustine, G. J. (2001). "How does calcium trigger neurotransmitter release?" Curr Opin Neurobiol **11**(3): 320-326.
- Aumuller, G., M. Leonhardt, M. Janssen, et al. (1999). "Neurogenic origin of human prostate endocrine cells." Urology **53**(5): 1041-1048.
- Aumuller, G., M. Leonhardt, H. Renneberg, et al. (2001). "Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells." Prostate **46**(2): 108-115.
- Ayala, A. G., J. Y. Ro, R. Babaian, et al. (1989). "The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma." Am J Surg Pathol **13**(1): 21-27.
- Aziz, M. H., M. Nihal, V. X. Fu, et al. (2006). "Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins." Mol Cancer Ther **5**(5): 1335-1341.
- Azmi, A. S., B. Bao and F. H. Sarkar (2013). "Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review." Cancer Metastasis Rev **32**(3-4): 623-642.
- Baca, S. C., D. Prandi, M. S. Lawrence, et al. (2013). "Punctuated evolution of prostate cancer genomes." Cell **153**(3): 666-677.
- Bair, E. L., M. L. Chen, K. McDaniel, et al. (2005). "Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration." Neoplasia **7**(4): 380-389.
- Bandell, M., G. M. Story, S. W. Hwang, et al. (2004). "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin." Neuron **41**(6): 849-857.
- Bang, Y. J., F. Pirnia, W. G. Fang, 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**(12): 5330-5334.
- Barbieri, C. E., S. C. Baca, M. S. Lawrence, et al. (2012). "Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer." Nat Genet **44**(6): 685-689.
- Barclay, J. W., A. Morgan and R. D. Burgoyne (2005). "Calcium-dependent regulation of exocytosis." Cell Calcium **38**(3-4): 343-353.
- Barclay, W. W., R. D. Woodruff, M. C. Hall, et al. (2005). "A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." Endocrinology **146**(1): 13-18.
- Barker, N., R. A. Ridgway, J. H. van Es, et al. (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." Nature **457**(7229): 608-611.
- Barron, D. A. and D. R. Rowley (2012). "The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression." Endocr Relat Cancer **19**(6): R187-204.
- Barsky, S. H., G. P. Siegal, F. Jannotta, et al. (1983). "Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts." Lab Invest **49**(2): 140-147.
- Bautista, D. M., S. E. Jordt, T. Nikai, et al. (2006). "TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents." Cell **124**(6): 1269-1282.
- Bautista, D. M., P. Movahed, A. Hinman, et al. (2005). "Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12248-12252.
- Bavik, C., I. Coleman, J. P. Dean, et al. (2006). "The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms." Cancer Res **66**(2): 794-802.
- Beaumont, V., A. Llobet and L. Lagnado (2005). "Expansion of calcium microdomains regulates fast exocytosis at a ribbon synapse." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10700-10705.
- Bello-DeOcampo, D. and D. J. Tindall (2003). "TGF-beta1/Smad signaling in prostate cancer." Curr Drug Targets **4**(3): 197-207.
- Benitez, D. A., E. Pozo-Guisado, A. Alvarez-Barrientos, et al. (2007). "Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines." J Androl **28**(2): 282-293.
- Bennett, D. L., M. D. Bootman, M. J. Berridge, et al. (1998). "Ca²⁺ entry into PC12 cells initiated by ryanodine receptors or inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." Biochem J **329** (Pt 2): 349-357.
- Bergfeld, S. A. and Y. A. DeClerck (2010). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 249-261.

- Berggren, P. O., S. N. Yang, M. Murakami, et al. (2004). "Removal of Ca²⁺ channel beta3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis." *Cell* **119**(2): 273-284.
- Berna-Erro, A., A. Braun, R. Kraft, et al. (2009). "STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death." *Sci Signal* **2**(93): ra67.
- Bernardo, M. E., F. Locatelli and W. E. Fibbe (2009). "Mesenchymal stromal cells." *Ann N Y Acad Sci* **1176**: 101-117.
- Berridge, M. J. (1996). "Microdomains and elemental events in calcium signalling." *Cell Calcium* **20**(2): 95-96.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and P. Lipp (1998). "Calcium--a life and death signal." *Nature* **395**(6703): 645-648.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 517-529.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 11-21.
- Berruti, A., A. Mosca, F. Porpiglia, et al. (2007). "Chromogranin A expression in patients with hormone naive prostate cancer predicts the development of hormone refractory disease." *J Urol* **178**(3 Pt 1): 838-843; quiz 1129.
- Berruti, A., A. Mosca, M. Tucci, et al. (2005). "Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease." *Endocr Relat Cancer* **12**(1): 109-117.
- Berry, P. A., N. J. Maitland and A. T. Collins (2008). "Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells." *Mol Cell Endocrinol* **288**(1-2): 30-37.
- Bethel, C. R., D. Faith, X. Li, et al. (2006). "Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion." *Cancer Res* **66**(22): 10683-10690.
- Bhowmick, N. A., A. Chytil, D. Plieth, et al. (2004). "TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia." *Science* **303**(5659): 848-851.
- Bhowmick, N. A. and H. L. Moses (2005). "Tumor-stroma interactions." *Curr Opin Genet Dev* **15**(1): 97-101.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson and H. L. Moses (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." *Nature* **432**(7015): 332-337.
- Birnbaumer, L., E. Yildirim and J. Abramowitz (2003). "A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives." *Cell Calcium* **33**(5-6): 419-432.
- Birnie, R., S. D. Bryce, C. Roome, et al. (2008). "Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions." *Genome Biol* **9**(5): R83.
- Bisailon, J. M., R. K. Motiani, J. C. Gonzalez-Cobos, et al. (2010). "Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration." *Am J Physiol Cell Physiol* **298**(5): C993-1005.
- Boccon-Gibod, L., J. L. Davin, C. Coulange, et al. (2010). "Les nouvelles perspectives de prise en charge du cancer de la prostate." *Prog Urol* **20**(7): 491-497.
- Boehning, D., R. L. Patterson and S. H. Snyder (2004). "Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1,4,5-trisphosphate." *Cell Cycle* **3**(3): 252-254.
- Bonkhoff, H. (1996). "Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: a stem cell concept for the development of prostate cancer." *Eur Urol* **30**(2): 201-205.
- Bonkhoff, H. (1998). "Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status." *Prostate Suppl* **8**: 18-22.
- Bonkhoff, H. (2001). "Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status." *Ann Oncol* **12 Suppl 2**: S141-144.
- Bonkhoff, H., U. Stein, G. Aumuller, et al. (1996). "Differential expression of 5 alpha-reductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas." *Prostate* **29**(4): 261-267.
- Bonkhoff, H., U. Stein and K. Remberger (1994). "Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers." *Hum Pathol* **25**(1): 42-46.
- Bonkhoff, H., U. Stein and K. Remberger (1994). "The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate." *Prostate* **24**(3): 114-118.

- Bostwick, D. G., L. Liu, M. K. Brawer, et al. (2004). "High-grade prostatic intraepithelial neoplasia." Rev Urol **6**(4): 171-179.
- Brandman, O., J. Liou, W. S. Park, et al. (2007). "STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels." Cell **131**(7): 1327-1339.
- Brawer, M. K., D. M. Peehl, T. A. Stamey, et al. (1985). "Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate." Cancer Res **45**(8): 3663-3667.
- Bremnes, R. M., R. Veve, E. Gabrielson, et al. (2002). "High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **20**(10): 2417-2428.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-820.
- Brumback, A. C., J. L. Lieber, J. K. Angleson, et al. (2004). "Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis." Methods **33**(4): 287-294.
- Brundage, R. A., K. E. Fogarty, R. A. Tuft, et al. (1991). "Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils." Science **254**(5032): 703-706.
- Buchthal, B., D. Lau, U. Weiss, et al. (2012). "Nuclear calcium signaling controls methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) phosphorylation on serine 421 following synaptic activity." J Biol Chem **287**(37): 30967-30974.
- Burger, P. E., X. Xiong, S. Coetzee, et al. (2005). "Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(20): 7180-7185.
- Burgoyne, R. D. (1995). "Mechanisms of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells." J Physiol Pharmacol **46**(3): 273-283.
- Bussemakers, M. J., A. van Bokhoven, G. W. Verhaegh, et al. (1999). "DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer." Cancer Res **59**(23): 5975-5979.
- Bussolino, F., M. F. Di Renzo, M. Ziche, et al. (1992). "Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth." J Cell Biol **119**(3): 629-641.
- Cano, P., A. Godoy, R. Escamilla, et al. (2007). "Stromal-epithelial cell interactions and androgen receptor-coregulator recruitment is altered in the tissue microenvironment of prostate cancer." Cancer Res **67**(2): 511-519.
- Cao, D. S., L. Zhong, T. H. Hsieh, et al. (2012). "Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells." PLoS One **7**(5): e38005.
- Capiod, T. (2011). "Cell proliferation, calcium influx and calcium channels." Biochimie **93**(12): 2075-2079.
- Capiod, T. (2013). "The need for calcium channels in cell proliferation." Recent Pat Anticancer Drug Discov **8**(1): 4-17.
- Capiod, T. (2016). "Extracellular Calcium Has Multiple Targets to Control Cell Proliferation." Adv Exp Med Biol **898**: 133-156.
- Carmeliet, P. and M. Tessier-Lavigne (2005). "Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring." Nature **436**(7048): 193-200.
- Carpenter, S. L., J. Goldman, A. K. Sherman, et al. (2016). "Clinical variables and Staphylococcus aureus virulence factors associated with venous thromboembolism in children." Thromb Res **138**: 69-73.
- Carrion, A. M., W. A. Link, F. Ledo, et al. (1999). "DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor." Nature **398**(6722): 80-84.
- Casey, S. C., A. Amedei, K. Aquilano, et al. (2015). "Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment." Semin Cancer Biol **35** Suppl: S199-223.
- Castells, M., B. Thibault, J. P. Delord, et al. (2012). "Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death." Int J Mol Sci **13**(8): 9545-9571.
- Cat, B., D. Stuhlmann, H. Steinbrenner, et al. (2006). "Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species." J Cell Sci **119**(Pt 13): 2727-2738.
- Cato, A. C., A. Nestl and S. Mink (2002). "Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways." Sci STKE **2002**(138): re9.

- Chandra, A. and N. Angle (2005). "Vascular endothelial growth factor stimulates a novel calcium-signaling pathway in vascular smooth muscle cells." Surgery **138**(4): 780-787.
- Chang, C., A. Saltzman, S. Yeh, et al. (1995). "Androgen receptor: an overview." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **5**(2): 97-125.
- Chang, K. H., R. Li, M. Papari-Zareei, et al. (2011). "Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13728-13733.
- Chang, S. M. and L. W. Chung (1989). "Interaction between prostatic fibroblast and epithelial cells in culture: role of androgen." Endocrinology **125**(5): 2719-2727.
- Chanmee, T., P. Ontong, K. Konno, et al. (2014). "Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment." Cancers (Basel) **6**(3): 1670-1690.
- Chantome, A., M. Potier-Cartereau, L. Clarysse, et al. (2013). "Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orail1 complex in human cancer cell migration and bone metastases." Cancer Res **73**(15): 4852-4861.
- Chen, J., S. K. Joshi, S. DiDomenico, et al. (2011). "Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation." Pain **152**(5): 1165-1172.
- Chen, Y., C. Yang and Z. J. Wang (2011). "Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain." Neuroscience **193**: 440-451.
- Chen, Y. F., W. T. Chiu, Y. T. Chen, et al. (2011). "Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15225-15230.
- Cheng, H. and T. Force (2010). "Why do kinase inhibitors cause cardiotoxicity and what can be done about it?" Prog Cardiovasc Dis **53**(2): 114-120.
- Cheng, L., R. Montironi, D. G. Bostwick, et al. (2012). "Staging of prostate cancer." Histopathology **60**(1): 87-117.
- Cheng, L., S. Y. Song, T. G. Pretlow, et al. (1998). "Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with prostate cancer." J Natl Cancer Inst **90**(3): 233-237.
- Cheng, L., S. Zhang, C. J. Sweeney, et al. (2004). "Androgen withdrawal inhibits tumor growth and is associated with decrease in angiogenesis and VEGF expression in androgen-independent CWR22Rv1 human prostate cancer model." Anticancer Res **24**(4): 2135-2140.
- Chin, D. and A. R. Means (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." Trends Cell Biol **10**(8): 322-328.
- Chiquet-Ehrismann, R. (1993). "Tenascin and other adhesion-modulating proteins in cancer." Semin Cancer Biol **4**(5): 301-310.
- Cho, J. A., H. Park, E. H. Lim, et al. (2012). "Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells." Int J Oncol **40**(1): 130-138.
- Choi, S., Y. Kim, H. Park, et al. (2009). "Syndecan-2 overexpression regulates adhesion and migration through cooperation with integrin alpha2." Biochem Biophys Res Commun **384**(2): 231-235.
- Choi, S. I., S. Yoo, J. Y. Lim, et al. (2014). "Are sensory TRP channels biological alarms for lipid peroxidation?" Int J Mol Sci **15**(9): 16430-16457.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Christiansen, J. J., S. A. Rajasekaran, P. Moy, et al. (2003). "Polarity of prostate specific membrane antigen, prostate stem cell antigen, and prostate specific antigen in prostate tissue and in a cultured epithelial cell line." Prostate **55**(1): 9-19.
- Clevers, H. (2011). "The cancer stem cell: premises, promises and challenges." Nat Med **17**(3): 313-319.
- Cochilla, A. J., J. K. Angleson and W. J. Betz (1999). "Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence." Annu Rev Neurosci **22**: 1-10.
- Cohen, D. W., R. Simak, W. R. Fair, et al. (1994). "Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues." J Urol **152**(6 Pt 1): 2120-2124.
- Cohen, R. J., B. A. Shannon, J. E. McNeal, et al. (2005). "Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution?" J Urol **173**(6): 1969-1974.

- Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* **65**(23): 10946-10951.
- Collins, A. T., F. K. Habib, N. J. Maitland, et al. (2001). "Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression." *J Cell Sci* **114**(Pt 21): 3865-3872.
- Colombel, M., F. Symmans, S. Gil, et al. (1993). "Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers." *Am J Pathol* **143**(2): 390-400.
- Cooper, M. and H. Pinkus (1977). "Intrauterine transplantation of rat basal cell carcinoma as a model for reconversion of malignant to benign growth." *Cancer Res* **37**(8 Pt 1): 2544-2552.
- Copeland, K. W., A. A. Boezio, E. Cheung, et al. (2014). "Development of novel azabenzofuran TRPA1 antagonists as in vivo tools." *Bioorg Med Chem Lett* **24**(15): 3464-3468.
- Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, et al. (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* **6**(12): 2853-2868.
- Corcoran, C., S. Rani, K. O'Brien, et al. (2012). "Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes." *PLoS One* **7**(12): e50999.
- Cordero-Morales, J. F., E. O. Gracheva and D. Julius (2011). "Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(46): E1184-1191.
- Coulon, V. and J. M. Blanchard (2001). "Flux calciques et expression génique." *Médecine/sciences* **17**: 969-978.
- Courjaret, R. and K. Machaca (2012). "STIM and Orai in cellular proliferation and division." *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 331-341.
- Cox, M. E., P. D. Deeble, S. Lakhani, et al. (1999). "Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression." *Cancer Res* **59**(15): 3821-3830.
- Culig, Z., A. Hobisch, M. V. Cronauer, et al. (1994). "Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor." *Cancer Res* **54**(20): 5474-5478.
- Culig, Z. and M. Pühr (2012). "Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer." *Mol Cell Endocrinol* **360**(1-2): 52-58.
- Culig, Z., H. Steiner, G. Bartsch, et al. (2005). "Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth." *J Cell Biochem* **95**(3): 497-505.
- Cunha, G. R., A. A. Donjacour, P. S. Cooke, et al. (1987). "The endocrinology and developmental biology of the prostate." *Endocr Rev* **8**(3): 338-362.
- Cunha, G. R., S. W. Hayward and Y. Z. Wang (2002). "Role of stroma in carcinogenesis of the prostate." *Differentiation* **70**(9-10): 473-485.
- Cunha, G. R., S. W. Hayward, Y. Z. Wang, et al. (2003). "Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate." *Int J Cancer* **107**(1): 1-10.
- D'Amico, A. V., R. Whittington, S. B. Malkowicz, et al. (1998). "Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer." *JAMA* **280**(11): 969-974.
- Dai, Y., S. Wang, M. Tominaga, et al. (2007). "Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain." *J Clin Invest* **117**(7): 1979-1987.
- Daniel, P., G. Filiz, D. V. Brown, et al. (2014). "Selective CREB-dependent cyclin expression mediated by the PI3K and MAPK pathways supports glioma cell proliferation." *Oncogenesis* **3**: e108.
- Danielpour, D. (2005). "Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate." *Eur J Cancer* **41**(6): 846-857.
- Davies, L. C., S. J. Jenkins, J. E. Allen, et al. (2013). "Tissue-resident macrophages." *Nat Immunol* **14**(10): 986-995.
- Davis, F. M., I. Azimi, R. A. Faville, et al. (2014). "Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent." *Oncogene* **33**(18): 2307-2316.
- Dawson, L. A., N. J. Maitland, A. J. Turner, et al. (2004). "Stromal-epithelial interactions influence prostate cancer cell invasion by altering the balance of metalloproteinase expression." *Br J Cancer* **90**(8): 1577-1582.

- de Bono, J. S., C. J. Logothetis, A. Molina, et al. (2011). "Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer." *N Engl J Med* **364**(21): 1995-2005.
- de Kok, J. B., G. W. Verhaegh, R. W. Roelofs, et al. (2002). "DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors." *Cancer Res* **62**(9): 2695-2698.
- De Marzo, A., E. Platz, S. Sutcliffe, et al. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 256-269.
- De Marzo, A. M., V. L. Marchi, J. I. Epstein, et al. (1999). "Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis." *Am J Pathol* **155**(6): 1985-1992.
- De Marzo, A. M., A. K. Meeker, J. I. Epstein, et al. (1998). "Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells." *Am J Pathol* **153**(3): 911-919.
- de Vries, K. J., A. Geijtenbeek, E. C. Brian, et al. (2000). "Dynamics of munc18-1 phosphorylation/dephosphorylation in rat brain nerve terminals." *Eur J Neurosci* **12**(1): 385-390.
- DeCosse, J. J., C. Gossens, J. F. Kuzma, et al. (1975). "Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro." *J Natl Cancer Inst* **54**(4): 913-922.
- Deeble, P. D., M. E. Cox, H. F. Frierson, Jr., et al. (2007). "Androgen-independent growth and tumorigenesis of prostate cancer cells are enhanced by the presence of PKA-differentiated neuroendocrine cells." *Cancer Res* **67**(8): 3663-3672.
- Deeble, P. D., D. J. Murphy, S. J. Parsons, et al. (2001). "Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8471-8482.
- Deering-Rice, C. E., D. Shapiro, E. G. Romero, et al. (2015). "Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin-1 by Insoluble Particulate Material and Association with Asthma." *Am J Respir Cell Mol Biol* **53**(6): 893-901.
- Deng, X., B. D. Elzey, J. M. Poulson, et al. (2011). "Ionizing radiation induces neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells in vitro, in vivo and in prostate cancer patients." *Am J Cancer Res* **1**(7): 834-844.
- Deng, X., H. Liu, J. Huang, et al. (2008). "Ionizing radiation induces prostate cancer neuroendocrine differentiation through interplay of CREB and ATF2: implications for disease progression." *Cancer Res* **68**(23): 9663-9670.
- Derouiche, S., M. Warnier, P. Mariot, et al. (2013). "Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling." *Springerplus* **2**(1): 54.
- Desmouliere, A., C. Chaponnier and G. Gabbiani (2005). "Tissue repair, contraction, and the myofibroblast." *Wound Repair Regen* **13**(1): 7-12.
- di Sant'Agnese, P. A. (2001). "Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update on recent developments." *Ann Oncol* **12 Suppl 2**: S135-140.
- Dillin, A., D. K. Crawford and C. Kenyon (2002). "Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*." *Science* **298**(5594): 830-834.
- Dirat, B., L. Bochet, M. Dabek, et al. (2011). "Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion." *Cancer Res* **71**(7): 2455-2465.
- Dirat, B., L. Bochet, G. Escourrou, et al. (2010). "Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes?" *Endocr Dev* **19**: 45-52.
- Djavan, B., M. Waldert, C. Seitz, et al. (2001). "Insulin-like growth factors and prostate cancer." *World J Urol* **19**(4): 225-233.
- Dlugosz, A. A. and S. H. Yuspa (1993). "Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C." *J Cell Biol* **120**(1): 217-225.
- Doerner, J. F., G. Gisselmann, H. Hatt, et al. (2007). "Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions." *J Biol Chem* **282**(18): 13180-13189.
- Dolmetsch, R. E., K. Xu and R. S. Lewis (1998). "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression." *Nature* **392**(6679): 933-936.
- Dolovich, J., N. Back and C. E. Arbesman (1970). "Kinin-like activity in nasal secretions of allergic patients." *Int Arch Allergy Appl Immunol* **38**(4): 337-344.
- Dong, X., L. Wang, K. Taniguchi, et al. (2003). "Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk." *Am J Hum Genet* **72**(2): 270-280.

- Duan, W., M. Y. Gabril, M. Moussa, et al. (2005). "Knockin of SV40 Tag oncogene in a mouse adenocarcinoma of the prostate model demonstrates advantageous features over the transgenic model." *Oncogene* **24**(9): 1510-1524.
- Dubois, C., F. Vanden Abeele, V. Lehen'kyi, et al. (2014). "Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer." *Cancer Cell* **26**(1): 19-32.
- Dulhunty, A. F., P. R. Junankar, K. R. Eager, et al. (1996). "Ion channels in the sarcoplasmic reticulum of striated muscle." *Acta Physiol Scand* **156**(3): 375-385.
- Duluc, C., S. Moatassim-Billah, M. Chalabi-Dchar, et al. (2015). "Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance." *EMBO Mol Med* **7**(6): 735-753.
- Dunn, J. F., B. C. Nisula and D. Rodbard (1981). "Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma." *J Clin Endocrinol Metab* **53**(1): 58-68.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." *N Engl J Med* **315**(26): 1650-1659.
- Dvorak, H. F., L. F. Brown, M. Detmar, et al. (1995). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis." *Am J Pathol* **146**(5): 1029-1039.
- Dwyer, R. M., S. M. Potter-Beirne, K. A. Harrington, et al. (2007). "Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells." *Clin Cancer Res* **13**(17): 5020-5027.
- Eberhardt, M. J., M. R. Filipovic, A. Leffler, et al. (2012). "Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies." *J Biol Chem* **287**(34): 28291-28306.
- Eccles, S. A. and D. R. Welch (2007). "Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies." *Lancet* **369**(9574): 1742-1757.
- Egan, A., Y. Dong, H. Zhang, et al. (2014). "Castration-resistant prostate cancer: adaptive responses in the androgen axis." *Cancer Treat Rev* **40**(3): 426-433.
- Egan, T. J., M. A. Acuna, M. Zenobi-Wong, et al. (2016). "Effects of N-Glycosylation of the human cation channel TRPA1 on agonist-sensitivity." *Biosci Rep*.
- Eid, S. R., E. D. Crown, E. L. Moore, et al. (2008). "HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity." *Mol Pain* **4**: 48.
- Eisenberger, M. A., B. A. Blumenstein, E. D. Crawford, et al. (1998). "Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer." *N Engl J Med* **339**(15): 1036-1042.
- El-Alfy, M., G. Pelletier, L. S. Hermo, et al. (2000). "Unique features of the basal cells of human prostate epithelium." *Microsc Res Tech* **51**(5): 436-446.
- El Boustany, C., M. Katsogiannou, P. Delcourt, et al. (2010). "Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells." *Cell Calcium* **47**(4): 350-359.
- Eminaga, O., R. Hinkelammert, M. Abbas, et al. (2013). "High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and topographical distribution in 1,374 prostatectomy specimens: existence of HGPIN near prostate cancer." *Prostate* **73**(10): 1115-1122.
- Endo, M., M. Tanaka and Y. Ogawa (1970). "Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres." *Nature* **228**(5266): 34-36.
- Eylenstein, A., S. Schmidt, S. Gu, et al. (2012). "Transcription factor NF-kappaB regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions." *J Biol Chem* **287**(4): 2719-2730.
- Eyman, D., M. Damodarasamy, S. R. Plymate, et al. (2009). "CCL5 secreted by senescent aged fibroblasts induces proliferation of prostate epithelial cells and expression of genes that modulate angiogenesis." *J Cell Physiol* **220**(2): 376-381.
- Fajardo, O., V. Mesguer, C. Belmonte, et al. (2008). "TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines." *Channels (Austin)* **2**(6): 429-438.
- Farnsworth, W. E. (1999). "Prostate stroma: physiology." *Prostate* **38**(1): 60-72.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-767.
- Feldman, B. J. and D. Feldman (2001). "The development of androgen-independent prostate cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(1): 34-45.

- Feng, B. and L. Chen (2009). "Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator?" Cancer Biother Radiopharm **24**(6): 717-721.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, et al. (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." Eur J Cancer **49**(6): 1374-1403.
- Fernandez-Chacon, R., A. Konigstorfer, S. H. Gerber, et al. (2001). "Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability." Nature **410**(6824): 41-49.
- Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.
- Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, et al. (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature **441**(7090): 179-185.
- Fitzpatrick, J. M. and R. de Wit (2014). "Taxane mechanisms of action: potential implications for treatment sequencing in metastatic castration-resistant prostate cancer." Eur Urol **65**(6): 1198-1204.
- Fixemer, T., U. Wissenbach, V. Flockerzi, et al. (2003). "Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression." Oncogene **22**(49): 7858-7861.
- Fleshner, N. E. and N. Lawrentschuk (2009). "Risk of developing prostate cancer in the future: overview of prognostic biomarkers." Urology **73**(5 Suppl): S21-27.
- Flourakis, M., V. Lehen'kyi, B. Beck, et al. (2010). "Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells." Cell Death Dis **1**: e75.
- Folkman, J. (2006). "Angiogenesis." Annu Rev Med **57**: 1-18.
- Fram, S. T., C. M. Wells and G. E. Jones (2011). "HGF-induced DU145 cell scatter assay." Methods Mol Biol **769**: 31-40.
- Franco, O. E. and S. W. Hayward (2012). "Targeting the tumor stroma as a novel therapeutic approach for prostate cancer." Adv Pharmacol **65**: 267-313.
- Franco, O. E., A. K. Shaw, D. W. Strand, et al. (2010). "Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis." Semin Cell Dev Biol **21**(1): 33-39.
- Franks, L. M. (1953). "Benign nodular hyperplasia of the prostate; a review." Ann R Coll Surg Engl **14**(2): 92-106.
- Fujita, Y., T. Sasaki, K. Fukui, et al. (1996). "Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin." J Biol Chem **271**(13): 7265-7268.
- Fukami, K., S. Inanobe, K. Kanemaru, et al. (2010). "Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance." Prog Lipid Res **49**(4): 429-437.
- Fukumori, T., N. Oka, Y. Takenaka, et al. (2006). "Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer." Cancer Res **66**(6): 3114-3119.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2004). "Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol." Oncogene **23**(40): 6702-6711.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2004). "Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol." Cancer Res **64**(1): 337-346.
- Gabbiani, G. (2003). "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases." J Pathol **200**(4): 500-503.
- Gackiere, F., G. Bidaux, P. Delcourt, et al. (2008). "CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells." J Biol Chem **283**(15): 10162-10173.
- Gackiere, F., G. Bidaux, P. Lory, et al. (2006). "A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry?" Cell Calcium **39**(4): 357-366.
- Gackiere, F., M. Warnier, M. Katsogiannou, et al. (2013). "Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth." Biol Open **2**(9): 941-951.
- Gajewska, M. and T. Motyl (2004). "IGF-binding proteins mediate TGF-beta 1-induced apoptosis in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **139**(1-3): 65-75.
- Galluzzi, L., J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, et al. (2015). "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015." Cell Death Differ **22**(1): 58-73.

- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.
- Garnier, D., N. Magnus, T. H. Lee, et al. (2012). "Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor." J Biol Chem **287**(52): 43565-43572.
- Gaudet, R. (2008). "A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond." Mol Biosyst **4**(5): 372-379.
- Ge, R., Y. Tai, Y. Sun, et al. (2009). "Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis." Cancer Lett **283**(1): 43-51.
- Geck, P., J. Szelei, J. Jimenez, et al. (1997). "Expression of novel genes linked to the androgen-induced, proliferative shutoff in prostate cancer cells." J Steroid Biochem Mol Biol **63**(4-6): 211-218.
- Gehm, B. D., J. M. McAndrews, P. Y. Chien, et al. (1997). "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 14138-14143.
- Gettman, M. T., A. Pacelli, J. Slezak, et al. (1999). "Role of microvessel density in predicting recurrence in pathologic Stage T3 prostatic adenocarcinoma." Urology **54**(3): 479-485.
- Ghanshani, S., H. Wulff, M. J. Miller, et al. (2000). "Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences." J Biol Chem **275**(47): 37137-37149.
- Giancippoli, A., M. Novara, A. de Luca, et al. (2006). "Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells." Biophys J **90**(5): 1830-1841.
- Giannoni, E., F. Bianchini, L. Masieri, et al. (2010). "Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness." Cancer Res **70**(17): 6945-6956.
- Gillenwater, J. Y., J. T. Grayhack, S. S. Howards, et al. (2001). Adult and Pediatric Urology, Lippincott Williams & Wilkins.
- Gillis, J. L., L. A. Selth, M. M. Centenera, et al. (2013). "Constitutively-active androgen receptor variants function independently of the HSP90 chaperone but do not confer resistance to HSP90 inhibitors." Oncotarget **4**(5): 691-704.
- Giovannelli, L., V. Pitozzi, M. Jacomelli, et al. (2011). "Protective effects of resveratrol against senescence-associated changes in cultured human fibroblasts." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **66**(1): 9-18.
- Gkika, D., M. Flourakis, L. Lemonnier, et al. (2010). "PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating TRPM8 activity and plasma membrane expression." Oncogene **29**(32): 4611-4616.
- Gkika, D. and N. Prevarskaya (2011). "TRP channels in prostate cancer: the good, the bad and the ugly?" Asian J Androl **13**(5): 673-676.
- Gkonos, P. J., A. Krongrad and B. A. Roos (1995). "Neuroendocrine peptides in the prostate." Urol Res **23**(2): 81-87.
- Gleason, D. F. (1966). "Classification of prostatic carcinomas." Cancer Chemother Rep **50**(3): 125-128.
- Gleave, M., J. T. Hsieh, C. A. Gao, et al. (1991). "Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts." Cancer Res **51**(14): 3753-3761.
- Gleave, M. E., J. T. Hsieh, A. C. von Eschenbach, et al. (1992). "Prostate and bone fibroblasts induce human prostate cancer growth in vivo: implications for bidirectional tumor-stromal cell interaction in prostate carcinoma growth and metastasis." J Urol **147**(4): 1151-1159.
- Gmyrek, G. A., M. Walburg, C. P. Webb, et al. (2001). "Normal and malignant prostate epithelial cells differ in their response to hepatocyte growth factor/scatter factor." Am J Pathol **159**(2): 579-590.
- Godoy, A., V. P. Montecinos, D. R. Gray, et al. (2011). "Androgen deprivation induces rapid involution and recovery of human prostate vasculature." Am J Physiol Endocrinol Metab **300**(2): E263-275.
- Godoy, A., A. Watts, P. Sotomayor, et al. (2008). "Androgen receptor is causally involved in the homeostasis of the human prostate endothelial cell." Endocrinology **149**(6): 2959-2969.

- Goldstein, A. S., D. A. Lawson, D. Cheng, et al. (2008). "Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20882-20887.
- Gollapudi, K., C. Galet, T. Grogan, et al. (2013). "Association between tumor-associated macrophage infiltration, high grade prostate cancer, and biochemical recurrence after radical prostatectomy." Am J Cancer Res **3**(5): 523-529.
- Goncalves, B. F., S. G. Campos, C. F. Costa, et al. (2015). "Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: an approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition." Acta Histochem **117**(1): 4-13.
- Gong, J., J. Lee, H. Akio, et al. (2007). "Attenuation of apoptosis by chromogranin A-induced Akt and survivin pathways in prostate cancer cells." Endocrinology **148**(9): 4489-4499.
- Gordon, S. and A. Mantovani (2011). "Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes." Eur J Immunol **41**(9): 2470-2472.
- Grange, C., M. Tapparo, F. Collino, et al. (2011). "Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche." Cancer Res **71**(15): 5346-5356.
- Gratzke, C., T. Streng, E. Waldkirch, et al. (2009). "Transient receptor potential A1 (TRPA1) activity in the human urethra--evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region." Eur Urol **55**(3): 696-704.
- Gratzke, C., P. Weinhold, O. Reich, et al. (2010). "Transient receptor potential A1 and cannabinoid receptor activity in human normal and hyperplastic prostate: relation to nerves and interstitial cells." Eur Urol **57**(5): 902-910.
- Greene, D. R., J. M. Fitzpatrick and P. T. Scardino (1995). "Anatomy of the prostate and distribution of early prostate cancer." Semin Surg Oncol **11**(1): 9-22.
- Gregory, C. W., R. T. Johnson, Jr., J. L. Mohler, et al. (2001). "Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen." Cancer Res **61**(7): 2892-2898.
- Grimberg, A. and P. Cohen (2000). "Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis." J Cell Physiol **183**(1): 1-9.
- Grisanzio, C. and S. Signoretti (2008). "p63 in prostate biology and pathology." J Cell Biochem **103**(5): 1354-1368.
- Grossfeld, G. D., S. W. Hayward, T. D. Tlsty, et al. (1998). "The role of stroma in prostatic carcinogenesis." Endocrine-Related Cancer **5**: 253-270.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.
- Grytli, H. H., M. W. Fagerland, S. D. Fossa, et al. (2014). "Association between use of beta-blockers and prostate cancer-specific survival: a cohort study of 3561 prostate cancer patients with high-risk or metastatic disease." Eur Urol **65**(3): 635-641.
- Grytli, H. H., M. W. Fagerland, S. D. Fossa, et al. (2013). "Use of beta-blockers is associated with prostate cancer-specific survival in prostate cancer patients on androgen deprivation therapy." Prostate **73**(3): 250-260.
- Gueguinou, M., T. Harnois, D. Crottes, et al. (2016). "SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin." Oncotarget **7**(24): 36168-36184.
- Guo, Z., W. P. Benten, J. Krucken, et al. (2002). "Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages." J Biol Chem **277**(33): 29600-29607.
- Gupta, A., P. I. Karakiewicz, C. G. Roehrborn, et al. (2008). "Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer." Clin Cancer Res **14**(22): 7385-7390.
- Gustavsson, H., K. Welen and J. E. Damber (2005). "Transition of an androgen-dependent human prostate cancer cell line into an androgen-independent subline is associated with increased angiogenesis." Prostate **62**(4): 364-373.
- Gustavsson, N., B. Wu and W. Han (2012). "Calcium sensing in exocytosis." Adv Exp Med Biol **740**: 731-757.
- Gwack, Y., S. Srikanth, S. Feske, et al. (2007). "Biochemical and functional characterization of Orai proteins." J Biol Chem **282**(22): 16232-16243.

- Haese, A., A. de la Taille, H. van Poppel, et al. (2008). "Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy." *Eur Urol* **54**(5): 1081-1088.
- Haffner, M. C., T. Mosbrugger, D. M. Esopi, et al. (2013). "Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer." *J Clin Invest* **123**(11): 4918-4922.
- Haffner, M. C., C. Weier, M. M. Xu, et al. (2016). "Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization." *J Pathol* **238**(1): 31-41.
- Hagglof, C. and A. Bergh (2012). "The stroma-a key regulator in prostate function and malignancy." *Cancers (Basel)* **4**(2): 531-548.
- Hahn, K., R. DeBiasio and D. L. Taylor (1992). "Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells." *Nature* **359**(6397): 736-738.
- Halin, S., P. Hammarsten, P. Wikstrom, et al. (2007). "Androgen-insensitive prostate cancer cells transiently respond to castration treatment when growing in an androgen-dependent prostate environment." *Prostate* **67**(4): 370-377.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**(3): 353-364.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hanson, J. A., J. W. Gillespie, A. Grover, et al. (2006). "Gene promoter methylation in prostate tumor-associated stromal cells." *J Natl Cancer Inst* **98**(4): 255-261.
- Hardingham, G. E., S. Chawla, C. M. Johnson, et al. (1997). "Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression." *Nature* **385**(6613): 260-265.
- Harkonen, P. L. and S. I. Makela (2004). "Role of estrogens in development of prostate cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**(4): 297-305.
- Harrington, J. A. and R. J. Jones (2011). "Management of metastatic castration-resistant prostate cancer after first-line docetaxel." *Eur J Cancer* **47**(14): 2133-2142.
- Haviv, I., K. Polyak, W. Qiu, et al. (2009). "Origin of carcinoma associated fibroblasts." *Cell Cycle* **8**(4): 589-595.
- Hay, C. W. and I. J. McEwan (2012). "The impact of point mutations in the human androgen receptor: classification of mutations on the basis of transcriptional activity." *PLoS One* **7**(3): e32514.
- Hayashi, N. and G. R. Cunha (1991). "Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the Dunning prostatic adenocarcinoma." *Cancer Res* **51**(18): 4924-4930.
- Hayashi, N., G. R. Cunha and Y. C. Wong (1990). "Influence of male genital tract mesenchymes on differentiation of Dunning prostatic adenocarcinoma." *Cancer Res* **50**(15): 4747-4754.
- Hayward, S. W., R. Del Buono, N. Deshpande, et al. (1992). "A functional model of adult human prostate epithelium. The role of androgens and stroma in architectural organization and the maintenance of differentiated secretory function." *J Cell Sci* **102** (Pt 2): 361-372.
- Hefetz-Sela, S. and P. E. Scherer (2013). "Adipocytes: impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention." *Pharmacol Ther* **138**(2): 197-210.
- Heldin, C. H., U. Eriksson and A. Ostman (2002). "New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens." *Arch Biochem Biophys* **398**(2): 284-290.
- Hemmerlein, B., R. M. Weseloh, F. Mello de Queiroz, et al. (2006). "Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours." *Mol Cancer* **5**: 41.
- Hessels, D., F. P. Smit, G. W. Verhaegh, et al. (2007). "Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer." *Clin Cancer Res* **13**(17): 5103-5108.
- Hilfiker, S., V. A. Pieribone, A. J. Czernik, et al. (1999). "Synapsins as regulators of neurotransmitter release." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1381): 269-279.
- Hinman, A., H. H. Chuang, D. M. Bautista, et al. (2006). "TRP channel activation by reversible covalent modification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(51): 19564-19568.
- Hirano, D., Y. Okada, S. Minei, et al. (2004). "Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy." *Eur Urol* **45**(5): 586-592; discussion 592.
- Hockenbery, D. M., M. Zutter, W. Hickey, et al. (1991). "BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 6961-6965.
- Hosein, A. N., M. Wu, S. L. Arcand, et al. (2010). "Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations." *Cancer Res* **70**(14): 5770-5777.

- Hotte, S. J. and F. Saad (2010). "Current management of castrate-resistant prostate cancer." Curr Oncol **17 Suppl 2**: S72-79.
- Hu, H., M. Bandell, M. J. Petrus, et al. (2009). "Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels." Nat Chem Biol **5**(3): 183-190.
- Hu, J., K. Qin, Y. Zhang, et al. (2011). "Downregulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca²⁺ influx in breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **411**(4): 786-791.
- Hu, K., J. Carroll, S. Fedorovich, et al. (2002). "Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion." Nature **415**(6872): 646-650.
- Hu, M. and K. Polyak (2008). "Microenvironmental regulation of cancer development." Curr Opin Genet Dev **18**(1): 27-34.
- Hu, S., H. S. Kim, P. Savage, et al. (1997). "Activation of BK(Ca) channel via endothelin ET(A) receptors in porcine coronary artery smooth muscle cells." Eur J Pharmacol **324**(2-3): 277-282.
- Huang, J., J. L. Yao, P. A. di Sant'Agnese, et al. (2006). "Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer." Prostate **66**(13): 1399-1406.
- Humphrey, P. A., S. Halabi, J. Picus, et al. (2006). "Prognostic significance of plasma scatter factor/hepatocyte growth factor levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 150005/9480." Clin Genitourin Cancer **4**(4): 269-274.
- Huss, W. J., D. R. Gray, E. S. Werdin, et al. (2004). "Evidence of pluripotent human prostate stem cells in a human prostate primary xenograft model." Prostate **60**(2): 77-90.
- Hussain, A. R., S. O. Ahmed, M. Ahmed, et al. (2012). "Cross-talk between NFκB and the PI3-kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis." PLoS One **7**(6): e39945.
- Huttner, W. B., H. H. Gerdes and P. Rosa (1991). "The granin (chromogranin/secretogranin) family." Trends Biochem Sci **16**(1): 27-30.
- Ichikawa, J. and R. Inoue (2014). "TRPC6 regulates cell cycle progression by modulating membrane potential in bone marrow stromal cells." Br J Pharmacol **171**(23): 5280-5294.
- Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, et al. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **194**(6): 847-853.
- Ikura, M. (1996). "Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins." Trends Biochem Sci **21**(1): 14-17.
- Isaacs, J. T. and D. S. Coffey (1989). "Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia." Prostate Suppl **2**: 33-50.
- Isaacs, J. T. and W. B. Isaacs (2004). "Androgen receptor outwits prostate cancer drugs." Nat Med **10**(1): 26-27.
- Jackson, M. W., J. S. Roberts, S. E. Heckford, et al. (2002). "A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer." Cancer Res **62**(3): 854-859.
- Jager, H., T. Dreker, A. Buck, et al. (2004). "Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro." Mol Pharmacol **65**(3): 630-638.
- Jain, A., A. Lam, I. Vivanco, et al. (2002). "Identification of an androgen-dependent enhancer within the prostate stem cell antigen gene." Mol Endocrinol **16**(10): 2323-2337.
- Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, et al. (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science **275**(5297): 218-220.
- Jaquemar, D., T. Schenker and B. Trueb (1999). "An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts." J Biol Chem **274**(11): 7325-7333.
- Jazirehi, A. R. and B. Bonavida (2004). "Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis." Mol Cancer Ther **3**(1): 71-84.
- Jennbacken, K., H. Gustavsson, T. Tesan, et al. (2009). "The prostatic environment suppresses growth of androgen-independent prostate cancer xenografts: an effect influenced by testosterone." Prostate **69**(11): 1164-1175.

- Jennbacken, K., C. Vallbo, W. Wang, et al. (2005). "Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis." *Prostate* **65**(2): 110-116.
- Jordt, S. E., D. M. Bautista, H. H. Chuang, et al. (2004). "Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1." *Nature* **427**(6971): 260-265.
- Joseph, I. B., J. B. Nelson, S. R. Denmeade, et al. (1997). "Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue." *Clin Cancer Res* **3**(12 Pt 1): 2507-2511.
- Josson, S., Y. Matsuoka, L. W. Chung, et al. (2010). "Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis." *Semin Cell Dev Biol* **21**(1): 26-32.
- Jun, H. T., J. Sun, K. Rex, et al. (2007). "AMG 102, a fully human anti-hepatocyte growth factor/scatter factor neutralizing antibody, enhances the efficacy of temozolomide or docetaxel in U-87 MG cells and xenografts." *Clin Cancer Res* **13**(22 Pt 1): 6735-6742.
- Kahn, B., J. Collazo and N. Kyprianou (2014). "Androgen receptor as a driver of therapeutic resistance in advanced prostate cancer." *Int J Biol Sci* **10**(6): 588-595.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* **119**(6): 1420-1428.
- Kang, B. J., M. Jeun, G. H. Jang, et al. (2015). "Diagnosis of prostate cancer via nanotechnological approach." *Int J Nanomedicine* **10**: 6555-6569.
- Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, et al. (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." *N Engl J Med* **363**(5): 411-422.
- Karashima, Y., N. Damann, J. Prenen, et al. (2007). "Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1." *J Neurosci* **27**(37): 9874-9884.
- Karlou, M., V. Tzelepi and E. Efsthathiou (2010). "Therapeutic targeting of the prostate cancer microenvironment." *Nat Rev Urol* **7**(9): 494-509.
- Katz, D. (1969). "The Release of Neural Transmitter Substances." *Liverpool University Press*.
- Kimbro, K. S. and J. W. Simons (2006). "Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer." *Endocr Relat Cancer* **13**(3): 739-749.
- King, S. R., P. R. Manna, T. Ishii, et al. (2002). "An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain." *J Neurosci* **22**(24): 10613-10620.
- Kojima, Y., A. Acar, E. N. Eaton, et al. (2010). "Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(46): 20009-20014.
- Komuro, H. and P. Rakic (1993). "Modulation of neuronal migration by NMDA receptors." *Science* **260**(5104): 95-97.
- Kondratska, K., A. Kondratskyi, M. Yassine, et al. (2014). "Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma." *Biochim Biophys Acta* **1843**(10): 2263-2269.
- Kong, D., Z. Wang, S. H. Sarkar, et al. (2008). "Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells." *Stem Cells* **26**(6): 1425-1435.
- Kono, T., A. Kaneko, Y. Omiya, et al. (2013). "Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **304**(4): G428-436.
- Koochekpour, S. (2010). "Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer." *Asian J Androl* **12**(5): 639-657.
- Kopetz, E. S., J. B. Nelson and M. A. Carducci (2002). "Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer." *Invest New Drugs* **20**(2): 173-182.
- Kopp, R. F., C. A. Leech and M. W. Roe (2014). "Resveratrol Interferes with Fura-2 Intracellular Calcium Measurements." *J Fluoresc* **24**(2): 279-284.
- Korpai, M., J. M. Korn, X. Gao, et al. (2013). "An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (enzalutamide)." *Cancer Discov* **3**(9): 1030-1043.
- Krauss, D. J., M. Amin, B. Stone, et al. (2014). "Chromogranin A staining as a prognostic variable in newly diagnosed Gleason score 7-10 prostate cancer treated with definitive radiotherapy." *Prostate* **74**(5): 520-527.

- Kremeyer, B., F. Lopera, J. J. Cox, et al. (2010). "A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome." *Neuron* **66**(5): 671-680.
- Krongrad, A., H. Lai and S. Lai (1997). "Survival after radical prostatectomy." *JAMA* **278**(1): 44-46.
- Kuang, D. M., Q. Zhao, C. Peng, et al. (2009). "Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1." *J Exp Med* **206**(6): 1327-1337.
- Kunzelmann, K. (2005). "Ion channels and cancer." *J Membr Biol* **205**(3): 159-173.
- Kurita, T., Y. Z. Wang, A. A. Donjacour, et al. (2001). "Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system." *Cell Death Differ* **8**(2): 192-200.
- Kwabi-Addo, B., M. Ozen and M. Ittmann (2004). "The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer." *Endocr Relat Cancer* **11**(4): 709-724.
- Kwan, K. Y., A. J. Allchorne, M. A. Vollrath, et al. (2006). "TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction." *Neuron* **50**(2): 277-289.
- Kyprianou, N. and J. T. Isaacs (1989). "Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death." *Mol Endocrinol* **3**(10): 1515-1522.
- Lacampagne, A., W. J. Lederer, M. F. Schneider, et al. (1996). "Repriming and activation alter the frequency of stereotyped discrete Ca²⁺ release events in frog skeletal muscle." *J Physiol* **497** (Pt 3): 581-588.
- Lallet-Daher, H., M. Roudbaraki, A. Bavencoffe, et al. (2009). "Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry." *Oncogene* **28**(15): 1792-1806.
- Lang, F., M. Foller, K. S. Lang, et al. (2005). "Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death." *J Membr Biol* **205**(3): 147-157.
- Lang, S. H., M. Stower and N. J. Maitland (2000). "In vitro modelling of epithelial and stromal interactions in non-malignant and malignant prostates." *Br J Cancer* **82**(4): 990-997.
- Laurent, V., A. Guerard, C. Mazerolles, et al. (2016). "Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity." *Nat Commun* **7**: 10230.
- Lawson, D. A., L. Xin, R. U. Lukacs, et al. (2007). "Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1): 181-186.
- Leamy, A. W., P. Shukla, M. A. McAlexander, et al. (2011). "Curcumin ((E,E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) activates and desensitizes the nociceptor ion channel TRPA1." *Neurosci Lett* **503**(3): 157-162.
- Lee, G., K. Abdi, Y. Jiang, et al. (2006). "Nanospring behaviour of ankyrin repeats." *Nature* **440**(7081): 246-249.
- Lee, K. J., W. Wang, R. Padaki, et al. (2014). "Mouse monoclonal antibodies to transient receptor potential ankyrin 1 act as antagonists of multiple modes of channel activation." *J Pharmacol Exp Ther* **350**(2): 223-231.
- Lee, S. O., J. Y. Chun, N. Nadiminty, et al. (2007). "Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression." *Prostate* **67**(7): 764-773.
- Lefstin, J. A. and K. R. Yamamoto (1998). "Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators." *Nature* **392**(6679): 885-888.
- Lehen'kyi, V., M. Flourakis, R. Skryma, et al. (2007). "TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways." *Oncogene* **26**(52): 7380-7385.
- Leon, C. G., J. A. Locke, H. H. Adomat, et al. (2010). "Alterations in cholesterol regulation contribute to the production of intratumoral androgens during progression to castration-resistant prostate cancer in a mouse xenograft model." *Prostate* **70**(4): 390-400.
- Leong, K. G., B. E. Wang, L. Johnson, et al. (2008). "Generation of a prostate from a single adult stem cell." *Nature* **456**(7223): 804-808.
- Leongamornlert, D., N. Mahmud, M. Tymrakiewicz, et al. (2012). "Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk." *Br J Cancer* **106**(10): 1697-1701.
- Li, J., R. M. Cubbon, L. A. Wilson, et al. (2011). "Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation." *Circ Res* **108**(10): 1190-1198.
- Li, Q., C. S. Zhang and Y. Zhang (2016). "Molecular aspects of prostate cancer with neuroendocrine differentiation." *Chin J Cancer Res* **28**(1): 122-129.

- Li, X., V. Placencio, J. M. Iturregui, et al. (2008). "Prostate tumor progression is mediated by a paracrine TGF-beta/Wnt3a signaling axis." *Oncogene* **27**(56): 7118-7130.
- Li, Y., Y. Guo, J. Tang, et al. (2014). "New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **46**(8): 629-640.
- Li, Y., C. X. Li, H. Ye, et al. (2008). "Decrease in stromal androgen receptor associates with androgen-independent disease and promotes prostate cancer cell proliferation and invasion." *J Cell Mol Med* **12**(6B): 2790-2798.
- Liang, J., H. Bi and W. Ji (2010). "Involvement of TRPA1 in ET-1-induced pain-like behavior in mice." *Neuroreport* **21**(3): 201-205.
- Lieu, T., G. Jayaweera, P. Zhao, et al. (2014). "The bile acid receptor TGR5 activates the TRPA1 channel to induce itch in mice." *Gastroenterology* **147**(6): 1417-1428.
- Lin, C., L. Wang, H. Wang, et al. (2013). "Tanshinone IIA inhibits breast cancer stem cells growth in vitro and in vivo through attenuation of IL-6/STAT3/NF-kB signaling pathways." *J Cell Biochem* **114**(9): 2061-2070.
- Lin, H. Y., A. Shih, F. B. Davis, et al. (2002). "Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line." *J Urol* **168**(2): 748-755.
- Ling, M. T., K. W. Chan and C. K. Choo (2001). "Androgen induces differentiation of a human papillomavirus 16 E6/E7 immortalized prostate epithelial cell line." *J Endocrinol* **170**(1): 287-296.
- Linja, M. J., K. J. Savinainen, O. R. Saramaki, et al. (2001). "Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* **61**(9): 3550-3555.
- Liotta, L. A. and E. C. Kohn (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." *Nature* **411**(6835): 375-379.
- Liou, J., M. L. Kim, W. D. Heo, et al. (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." *Curr Biol* **15**(13): 1235-1241.
- Lis, A., C. Peinelt, A. Beck, et al. (2007). "CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties." *Curr Biol* **17**(9): 794-800.
- Liu, A. Y., L. D. True, L. LaTray, et al. (1997). "Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10705-10710.
- Liu, H., P. Moy, S. Kim, et al. (1997). "Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium." *Cancer Res* **57**(17): 3629-3634.
- Liu, J., Y. Chen, S. Shuai, et al. (2014). "TRPM8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating EMT via activating AKT/GSK-3beta pathway." *Tumour Biol* **35**(9): 8969-8977.
- Liu, X., K. T. Cheng, B. C. Bandyopadhyay, et al. (2007). "Attenuation of store-operated Ca²⁺ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(44): 17542-17547.
- Liu, X., W. Wang, B. B. Singh, et al. (2000). "Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells." *J Biol Chem* **275**(5): 3403-3411.
- Long, R. M., C. Morrissey, J. M. Fitzpatrick, et al. (2005). "Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies." *Clin Sci (Lond)* **108**(1): 1-11.
- Lowsley, O. S. (1915). "The Prostate Gland in Old Age." *Ann Surg* **62**(6): 716-737.
- Lu, K., C. Liu, T. Tao, et al. (2015). "MicroRNA-19a regulates proliferation and apoptosis of castration-resistant prostate cancer cells by targeting BTG1." *FEBS Lett* **589**(13): 1485-1490.
- Macpherson, L. J., A. E. Dubin, M. J. Evans, et al. (2007). "Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines." *Nature* **445**(7127): 541-545.
- Maemura, M., Y. Iino, T. Yokoe, et al. (1998). "Serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with metastatic breast cancer." *Cancer Lett* **126**(2): 215-220.
- Magnon, C., S. J. Hall, J. Lin, et al. (2013). "Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression." *Science* **341**(6142): 1236361.
- Malinowska, K., H. Neuwirt, I. T. Cavarretta, et al. (2009). "Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor." *Endocr Relat Cancer* **16**(1): 155-169.
- Mansvelder, H. D. and K. S. Kits (2000). "All classes of calcium channel couple with equal efficiency to exocytosis in rat melanotropes, inducing linear stimulus-secretion coupling." *J Physiol* **526 Pt 2**: 327-339.
- Mariot, P., N. Prevarskaya, M. M. Roudbaraki, et al. (2000). "Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells." *Prostate* **43**(3): 205-214.

- Mariot, P., K. Vanoverberghe, N. Lalevee, et al. (2002). "Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells." *J Biol Chem* **277**(13): 10824-10833.
- Marks, L. S., Y. Fradet, I. L. Deras, et al. (2007). "PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy." *Urology* **69**(3): 532-535.
- Marks, P. W. and F. R. Maxfield (1990). "Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils." *J Cell Biol* **110**(1): 43-52.
- Martikainen, P., N. Kyprianou and J. T. Isaacs (1990). "Effect of transforming growth factor-beta 1 on proliferation and death of rat prostatic cells." *Endocrinology* **127**(6): 2963-2968.
- Martin, S. K., M. Kamelgarn and N. Kyprianou (2014). "Cytoskeleton targeting value in prostate cancer treatment." *Am J Clin Exp Urol* **2**(1): 15-26.
- Martineau, I., E. Lacoste and G. Gagnon (2004). "Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation." *Biomaterials* **25**(18): 4489-4502.
- Maru, N., M. Otori, M. W. Kattan, et al. (2001). "Prognostic significance of the diameter of perineural invasion in radical prostatectomy specimens." *Hum Pathol* **32**(8): 828-833.
- Masai, M., H. Sumiya, S. Akimoto, et al. (1990). "Immunohistochemical study of androgen receptor in benign hyperplastic and cancerous human prostates." *Prostate* **17**(4): 293-300.
- Materazzi, S., C. Fusi, S. Benemei, et al. (2012). "TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism." *Pflugers Arch* **463**(4): 561-569.
- Matta, J. A., P. M. Cornett, R. L. Miyares, et al. (2008). "General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(25): 8784-8789.
- McDonnell, T. J., P. Troncoso, S. M. Brisbay, et al. (1992). "Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer." *Cancer Res* **52**(24): 6940-6944.
- McManus, O. B. (1991). "Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium." *J Bioenerg Biomembr* **23**(4): 537-560.
- McNamara, C. R., J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista, et al. (2007). "TRPA1 mediates formalin-induced pain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(33): 13525-13530.
- McNeal, J. E. (1968). "Regional morphology and pathology of the prostate." *Am J Clin Pathol* **49**(3): 347-357.
- McNeal, J. E. (1981). "The zonal anatomy of the prostate." *Prostate* **2**(1): 35-49.
- McNeal, J. E. (1988). "Normal histology of the prostate." *Am J Surg Pathol* **12**(8): 619-633.
- McNeal, J. E., E. A. Redwine, F. S. Freiha, et al. (1988). "Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread." *Am J Surg Pathol* **12**(12): 897-906.
- McVary, K. T., A. Razzaq, C. Lee, et al. (1994). "Growth of the rat prostate gland is facilitated by the autonomic nervous system." *Biol Reprod* **51**(1): 99-107.
- Mearini, E., C. Antognelli, C. Del Buono, et al. (2009). "The combination of urine DD3(PCA3) mRNA and PSA mRNA as molecular markers of prostate cancer." *Biomarkers* **14**(4): 235-243.
- Medici, D., E. D. Hay and B. R. Olsen (2008). "Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3." *Mol Biol Cell* **19**(11): 4875-4887.
- Meeker, A. K., J. L. Hicks, E. A. Platz, et al. (2002). "Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis." *Cancer Res* **62**(22): 6405-6409.
- Mellstrom, B., M. Savignac, R. Gomez-Villafuertes, et al. (2008). "Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models." *Physiol Rev* **88**(2): 421-449.
- Mercer, J. C., W. I. Dehaven, J. T. Smyth, et al. (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." *J Biol Chem* **281**(34): 24979-24990.
- Merkle, D. and R. Hoffmann (2011). "Roles of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the progression of prostate cancer: cross-talk with the androgen receptor." *Cell Signal* **23**(3): 507-515.
- Micke, P. and A. Ostman (2004). "Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy?" *Lung Cancer* **45 Suppl 2**: S163-175.

- Miksits, M., K. Wlcek, M. Svoboda, et al. (2009). "Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells." *Planta Med* **75**(11): 1227-1230.
- Missiaen, L., H. De Smedt, G. Droogmans, et al. (1992). "Calcium ion homeostasis in smooth muscle." *Pharmacol Ther* **56**(2): 191-231.
- Mitchell, S. H., P. E. Murtha, S. Zhang, et al. (2000). "An androgen response element mediates LNCaP cell dependent androgen induction of the hK2 gene." *Mol Cell Endocrinol* **168**(1-2): 89-99.
- Moatassim-Billah, S., C. Duluc, R. Samain, et al. (2016). "Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230: Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts." *Oncotarget*.
- Molloy, T. and L. J. Van 't Veer (2008). "Recent advances in metastasis research." *Curr Opin Genet Dev* **18**(1): 35-41.
- Monaco, G., E. Decrock, H. Akl, et al. (2012). "Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl." *Cell Death Differ* **19**(2): 295-309.
- Monet, M., D. Gkika, V. Lehen'kyi, et al. (2009). "Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation." *Biochim Biophys Acta* **1793**(3): 528-539.
- Monet, M., V. Lehen'kyi, F. Gackiere, et al. (2010). "Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance." *Cancer Res* **70**(3): 1225-1235.
- Moore, S., M. Kuhrik, N. Kuhrik, et al. (1992). "Screening for prostate cancer: PSA blood test, rectal examination, and ultrasound." *Urol Nurs* **12**(3): 106-107.
- Moran, M. M., M. A. McAlexander, T. Biro, et al. (2011). "Transient receptor potential channels as therapeutic targets." *Nat Rev Drug Discov* **10**(8): 601-620.
- Morgan, K., L. R. Sadofsky and A. H. Morice (2015). "Genetic variants affecting human TRPA1 or TRPM8 structure can be classified in vitro as 'well expressed', 'poorly expressed' or 'salvageable'." *Biosci Rep* **35**(5).
- Mosca, A., A. Berruti, L. Russo, et al. (2005). "The neuroendocrine phenotype in prostate cancer: basic and clinical aspects." *J Endocrinol Invest* **28**(11 Suppl International): 141-145.
- Muir, C., L. W. Chung, D. D. Carson, et al. (2006). "Hypoxia increases VEGF-A production by prostate cancer and bone marrow stromal cells and initiates paracrine activation of bone marrow endothelial cells." *Clin Exp Metastasis* **23**(1): 75-86.
- Mukhopadhyay, I., P. Gomes, S. Aranake, et al. (2011). "Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells." *J Recept Signal Transduct Res* **31**(5): 350-358.
- Munaron, L., S. Antoniotti, A. Fiorio Pla, et al. (2004). "Blocking Ca²⁺ entry: a way to control cell proliferation." *Curr Med Chem* **11**(12): 1533-1543.
- Munaron, L., S. Antoniotti and D. Lovisolo (2004). "Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms?" *J Cell Mol Med* **8**(2): 161-168.
- Munaron, L., T. Genova, D. Avanzato, et al. (2013). "Targeting calcium channels to block tumor vascularization." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **8**(1): 27-37.
- Murphy, D. G., M. Kerger, H. Crowe, et al. (2009). "Operative details and oncological and functional outcome of robotic-assisted laparoscopic radical prostatectomy: 400 cases with a minimum of 12 months follow-up." *Eur Urol* **55**(6): 1358-1366.
- Nagata, K., A. Duggan, G. Kumar, et al. (2005). "Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing." *J Neurosci* **25**(16): 4052-4061.
- Nagatomo, K. and Y. Kubo (2008). "Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(45): 17373-17378.
- Nagle, R. B., M. K. Brawer, J. Kittelson, et al. (1991). "Phenotypic relationships of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma." *Am J Pathol* **138**(1): 119-128.
- Nakayama, K., M. Nakayama, M. Iwabuchi, et al. (2008). "Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients." *Am J Nephrol* **28**(6): 871-878.
- Nalli, M., G. Ortar, A. S. Moriello, et al. (2016). "TRPA1 channels as targets for resveratrol and related stilbenoids." *Bioorg Med Chem Lett* **26**(3): 899-902.
- Nassini, R., M. Gees, S. Harrison, et al. (2011). "Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation." *Pain* **152**(7): 1621-1631.
- Nassini, R., S. Materazzi, E. Andre, et al. (2010). "Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes

- neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents." FASEB J **24**(12): 4904-4916.
- Nassini, R., P. Pedretti, N. Moretto, et al. (2012). "Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation." PLoS One **7**(8): e42454.
- Neher, E. and R. S. Zucker (1993). "Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells." Neuron **10**(1): 21-30.
- Nelles, J. L., W. Y. Hu and G. S. Prins (2011). "Estrogen action and prostate cancer." Expert Rev Endocrinol Metab **6**(3): 437-451.
- Nelson, E. C., A. J. Cambio, J. C. Yang, et al. (2007). "Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis **10**(1): 6-14.
- Nelson, J., A. Bagnato, B. Battistini, et al. (2003). "The endothelin axis: emerging role in cancer." Nat Rev Cancer **3**(2): 110-116.
- Nelson, J. and M. Carducci (1999). "The role of the endothelin axis in prostate cancer." Prostate J. **1**: 126-130.
- Nelson, J. B., K. Chan-Tack, S. P. Hedican, et al. (1996). "Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer." Cancer Res **56**(4): 663-668.
- Nelson, J. B., S. P. Hedican, D. J. George, et al. (1995). "Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate." Nat Med **1**(9): 944-949.
- Nelson, M. T., H. Cheng, M. Rubart, et al. (1995). "Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks." Science **270**(5236): 633-637.
- Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." J Biol Chem **270**(48): 28495-28498.
- Nickerson, T., H. Huynh and M. Pollak (1997). "Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **237**(3): 690-693.
- Nilius, B., G. Owsianik, T. Voets, et al. (2007). "Transient receptor potential cation channels in disease." Physiol Rev **87**(1): 165-217.
- Nilius, B., J. Prenen and G. Owsianik (2011). "Irritating channels: the case of TRPA1." J Physiol **589**(Pt 7): 1543-1549.
- Nishiyama, M., A. Hoshino, L. Tsai, et al. (2003). "Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning." Nature **423**(6943): 990-995.
- Niu, Y. N. and S. J. Xia (2009). "Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer." Asian J Androl **11**(1): 28-35.
- Noren, D. P., W. H. Chou, S. H. Lee, et al. (2016). "Endothelial cells decode VEGF-mediated Ca²⁺ signaling patterns to produce distinct functional responses." Sci Signal **9**(416): ra20.
- Norrish, A. E., L. R. Ferguson, M. G. Knize, et al. (1999). "Heterocyclic amine content of cooked meat and risk of prostate cancer." J Natl Cancer Inst **91**(23): 2038-2044.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.
- Nozawa, K., E. Kawabata-Shoda, H. Doihara, et al. (2009). "TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3408-3413.
- O'Sullivan, R. J. and J. Karlseder (2010). "Telomeres: protecting chromosomes against genome instability." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 171-181.
- Obata, K., H. Katsura, T. Mizushima, et al. (2005). "TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury." J Clin Invest **115**(9): 2393-2401.
- Okada, H., T. Inoue, H. Suzuki, et al. (2000). "Epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells in vitro and in vivo." Nephrol Dial Transplant **15 Suppl 6**: 44-46.
- Okada, H., A. Tsubura, A. Okamura, et al. (1992). "Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **421**(2): 157-161.
- Okumura, Y., M. Narukawa, Y. Iwasaki, et al. (2010). "Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components." Biosci Biotechnol Biochem **74**(5): 1068-1072.
- Olapade-Olaopa, E. O., E. H. MacKay, N. A. Taub, et al. (1999). "Malignant transformation of human prostatic epithelium is associated with the loss of androgen receptor immunoreactivity in the surrounding stroma." Clin Cancer Res **5**(3): 569-576.
- Olson, E. R., J. E. Naugle, X. Zhang, et al. (2005). "Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(3): H1131-1138.

- Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, S. W. Hayward, et al. (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." *Cancer Res* **59**(19): 5002-5011.
- Oosterhoff, J. K., J. A. Grootegoed and L. J. Blok (2005). "Expression profiling of androgen-dependent and -independent LNCaP cells: EGF versus androgen signalling." *Endocr Relat Cancer* **12**(1): 135-148.
- Orihuela-Campos, R. C., N. Tamaki, R. Mukai, et al. (2015). "Biological impacts of resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine on oxidative stress in human gingival fibroblasts." *J Clin Biochem Nutr* **56**(3): 220-227.
- Ornstein, D. K., M. Cinquanta, S. Weiler, et al. (2001). "Expression studies and mutational analysis of the androgen regulated homeobox gene NKX3.1 in benign and malignant prostate epithelium." *J Urol* **165**(4): 1329-1334.
- Orr, B., A. C. Riddick, G. D. Stewart, et al. (2012). "Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate." *Oncogene* **31**(9): 1130-1142.
- Ouadid-Ahidouch, H., X. Le Bourhis, M. Roudbaraki, et al. (2001). "Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a hetero-a-gogo K⁺ channel." *Receptors Channels* **7**(5): 345-356.
- Ouadid-Ahidouch, H., M. Roudbaraki, A. Ahidouch, et al. (2004). "Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **316**(1): 244-251.
- Ouchi, N., J. L. Parker, J. J. Lugus, et al. (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." *Nat Rev Immunol* **11**(2): 85-97.
- Oulidi, A., A. Bokhobza, D. Gkika, et al. (2013). "TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of prostate and urothelial cancer cell adhesion, migration and invasion." *PLoS One* **8**(5): e64885.
- Ousset, M., A. Van Keymeulen, G. Bouvencourt, et al. (2012). "Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development." *Nat Cell Biol* **14**(11): 1131-1138.
- Packer, J. R. and N. J. Maitland (2016). "The molecular and cellular origin of human prostate cancer." *Biochim Biophys Acta* **1863**(6 Pt A): 1238-1260.
- Palumbo, A., Jr., O. Da Costa Nde, M. H. Bonamino, et al. (2015). "Genetic instability in the tumor microenvironment: a new look at an old neighbor." *Mol Cancer* **14**: 145.
- Pardo, L. A., D. del Camino, A. Sanchez, et al. (1999). "Oncogenic potential of EAG K(+) channels." *EMBO J* **18**(20): 5540-5547.
- Pardo, L. M. and C. M. van Duijn (2005). "In search of genes involved in neurodegenerative disorders." *Mutat Res* **592**(1-2): 89-101.
- Parekh, A. B. and R. Penner (1997). "Store depletion and calcium influx." *Physiol Rev* **77**(4): 901-930.
- Parimi, V., R. Goyal, K. Poropatich, et al. (2014). "Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review." *Am J Clin Exp Urol* **2**(4): 273-285.
- Park, C. Y., A. Shcheglovitov and R. Dolmetsch (2010). "The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels." *Science* **330**(6000): 101-105.
- Park, J., T. S. Morley, M. Kim, et al. (2014). "Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence." *Nat Rev Endocrinol* **10**(8): 455-465.
- Park, J. Y., Y. Huang and T. A. Sellers (2009). "Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and prostate cancer risk." *Methods Mol Biol* **471**: 361-385.
- Parker, A. S., D. D. Thiel, E. Bergstralh, et al. (2013). "Obese men have more advanced and more aggressive prostate cancer at time of surgery than non-obese men after adjusting for screening PSA level and age: results from two independent nested case-control studies." *Prostate Cancer Prostatic Dis* **16**(4): 352-356.
- Parvez, S., A. Beck, C. Peinelt, et al. (2008). "STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation." *FASEB J* **22**(3): 752-761.
- Patton, A. M., J. Kassis, H. Doong, et al. (2003). "Calcium as a molecular target in angiogenesis." *Curr Pharm Des* **9**(7): 543-551.
- Paudel, R. C., S. Kiviluoto, J. B. Parys, et al. (2014). "Resveratrol is not compatible with a Fura-2-based assay for measuring intracellular Ca(2+)(+) signaling." *Biochem Biophys Res Commun* **450**(4): 1626-1630.
- Peehl, D. M. and R. G. Sellers (1997). "Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells." *Exp Cell Res* **232**(2): 208-215.

- Peel, S. E., B. Liu and I. P. Hall (2008). "ORAI and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells." Am J Respir Cell Mol Biol **38**(6): 744-749.
- Peinado, H., D. Olmeda and A. Cano (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" Nat Rev Cancer **7**(6): 415-428.
- Peinelt, C., M. Vig, D. L. Koomoa, et al. (2006). "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)." Nat Cell Biol **8**(7): 771-773.
- Pepe, P. and F. Aragona (2011). "PCA3 score vs PSA free/total accuracy in prostate cancer diagnosis at repeat saturation biopsy." Anticancer Res **31**(12): 4445-4449.
- Perner, S., J. M. Mosquera, F. Demichelis, et al. (2007). "TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion." Am J Surg Pathol **31**(6): 882-888.
- Pessah, I. N., A. L. Waterhouse and J. E. Casida (1985). "The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle." Biochem Biophys Res Commun **128**(1): 449-456.
- Petrylak, D. P. (2002). "Chemotherapy for androgen-independent prostate cancer." Semin Urol Oncol **20**(3 Suppl 1): 31-35.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1977). "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells." Nature **265**(5589): 69-72.
- Pisters, L. L., P. Troncoso, H. E. Zhau, et al. (1995). "c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues." J Urol **154**(1): 293-298.
- Placencio, V. R., A. R. Sharif-Afshar, X. Li, et al. (2008). "Stromal transforming growth factor-beta signaling mediates prostatic response to androgen ablation by paracrine Wnt activity." Cancer Res **68**(12): 4709-4718.
- Pollak, M., W. Beamer and J. C. Zhang (1998). "Insulin-like growth factors and prostate cancer." Cancer Metastasis Rev **17**(4): 383-390.
- Poole, D. P., J. C. Pelayo, F. Cattaruzza, et al. (2011). "Transient receptor potential ankyrin 1 is expressed by inhibitory motoneurons of the mouse intestine." Gastroenterology **141**(2): 565-575, 575 e561-564.
- Popovic, A., A. Demirovic, B. Spajic, et al. (2010). "Expression and prognostic role of syndecan-2 in prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis **13**(1): 78-82.
- Porter, V. A., A. D. Bonev, H. J. Knot, et al. (1998). "Frequency modulation of Ca²⁺ sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides." Am J Physiol **274**(5 Pt 1): C1346-1355.
- Potten, C. S. and L. G. Lajtha (1982). "Stem cells versus stem lines." Ann N Y Acad Sci **397**: 49-61.
- Povysil, C., R. Kana, P. Dunder, et al. (2008). "Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human normal, osteoarthrotic, and transplanted articular cartilage." Pathol Res Pract **204**(12): 883-890.
- Prensner, J. R., M. A. Rubin, J. T. Wei, et al. (2012). "Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers." Sci Transl Med **4**(127): 127rv123.
- Prevarskaya, N., R. Skryma, G. Bidaux, et al. (2007). "Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells." Cell Death Differ **14**(7): 1295-1304.
- Prevarskaya, N., R. Skryma and Y. Shuba (2010). "Ion channels and the hallmarks of cancer." Trends Mol Med **16**(3): 107-121.
- Prevarskaya, N., R. Skryma and Y. Shuba (2011). "Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors." Nat Rev Cancer **11**(8): 609-618.
- Prevarskaya, N., R. Skryma, P. Vacher, et al. (1994). "Early effects of PRL on ion conductances in CHO cells expressing PRL receptor." Am J Physiol **267**(2 Pt 1): C554-562.
- Prevarskaya, N. B., R. N. Skryma, P. Vacher, et al. (1995). "Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and JAK2 tyrosine kinase." J Biol Chem **270**(41): 24292-24299.
- Price, D. T., X. Rudner, G. A. Michelotti, et al. (2000). "Immortalization of a human prostate stromal cell line using a recombinant retroviral approach." J Urol **164**(6): 2145-2150.
- Prinzato, P. and M. Rondini (2005). "Hormonotherapy of advanced prostate cancer." Ann Oncol **16** Suppl 4: iv80-84.
- Pupa, S. M., S. Menard, S. Forti, et al. (2002). "New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression." J Cell Physiol **192**(3): 259-267.
- Purhonen, A. K., L. M. Louhivuori, K. Kiehn, et al. (2008). "TRPA1 channel activation induces cholecystokinin release via extracellular calcium." FEBS Lett **582**(2): 229-232.
- Putney, J. W. (2011). "Origins of the concept of store-operated calcium entry." Front Biosci (Schol Ed) **3**: 980-984.

- Putney, J. W. (2012). "Calcium signaling: deciphering the calcium-NFAT pathway." *Curr Biol* **22**(3): R87-89.
- Putney, J. W., Jr., L. M. Broad, F. J. Braun, et al. (2001). "Mechanisms of capacitative calcium entry." *J Cell Sci* **114**(Pt 12): 2223-2229.
- Putzi, M. J. and A. M. De Marzo (2000). "Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Urology* **56**(5): 828-832.
- Qian, X., M. Francis, V. Solodushko, et al. (2013). "Recruitment of dynamic endothelial Ca²⁺ signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries." *Microcirculation* **20**(2): 138-148.
- Qiu, Y., D. Robinson, T. G. Pretlow, et al. (1998). "Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3644-3649.
- Radisky, D. C., P. A. Kenny and M. J. Bissell (2007). "Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?" *J Cell Biochem* **101**(4): 830-839.
- Rampino, T., M. Gregorini, C. Guidetti, et al. (2007). "KCNA1 and TRPC6 ion channels and NHE1 exchanger operate the biological outcome of HGF/scatter factor in renal tubular cells." *Growth Factors* **25**(6): 382-391.
- Rana, S., K. Malinowska and M. Zoller (2013). "Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells." *Neoplasia* **15**(3): 281-295.
- Raphael, M., V. Lehen'kyi, M. Vandenberghe, et al. (2014). "TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orail-mediated mechanism and controls cancer cell survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(37): E3870-3879.
- Rech, J. C., W. A. Eckert, M. P. Maher, et al. (2010). "Recent advances in the biology and medicinal chemistry of TRPA1." *Future Med Chem* **2**(5): 843-858.
- Richardson, G. D., C. N. Robson, S. H. Lang, et al. (2004). "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." *J Cell Sci* **117**(Pt 16): 3539-3545.
- Rittenhouse, H. G., J. A. Finlay, S. D. Mikolajczyk, et al. (1998). "Human Kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate." *Crit Rev Clin Lab Sci* **35**(4): 275-368.
- Robertson, J. D., S. Orrenius and B. Zhivotovsky (2000). "Review: nuclear events in apoptosis." *J Struct Biol* **129**(2-3): 346-358.
- Roderick, H. L. and S. J. Cook (2008). "Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival." *Nat Rev Cancer* **8**(5): 361-375.
- Rodriguez-Canales, J., J. C. Hanson, M. A. Tangrea, et al. (2007). "Identification of a unique epigenetic sub-microenvironment in prostate cancer." *J Pathol* **211**(4): 410-419.
- Rong, Y. P., G. Bultynck, A. S. Aromolaran, et al. (2009). "The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(34): 14397-14402.
- Roninson, I. B. (2003). "Tumor cell senescence in cancer treatment." *Cancer Res* **63**(11): 2705-2715.
- Rooney, L., A. Vidal, A. M. D'Souza, et al. (2014). "Discovery, optimization, and biological evaluation of 5-(2-(trifluoromethyl)phenyl)indazoles as a novel class of transient receptor potential A1 (TRPA1) antagonists." *J Med Chem* **57**(12): 5129-5140.
- Rosner, W. (1991). "Plasma steroid-binding proteins." *Endocrinol Metab Clin North Am* **20**(4): 697-720.
- Roudbaraki, M., A. Lorsignol, L. Langouche, et al. (1999). "Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage." *Endocrinology* **140**(10): 4874-4885.
- Rowley, D. and D. A. Barron (2012). "The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression." *Endocr Relat Cancer*.
- Rozengurt, E. (1992). "Growth factors and cell proliferation." *Curr Opin Cell Biol* **4**(2): 161-165.
- Rucci, N. and A. Angelucci (2014). "Prostate cancer and bone: the elective affinities." *Biomed Res Int* **2014**: 167035.
- Ruska, K. M., J. Sauvageot and J. I. Epstein (1998). "Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy." *Am J Surg Pathol* **22**(9): 1073-1077.

- Sadofsky, L. R., A. N. Boa, S. A. Maher, et al. (2011). "TRPA1 is activated by direct addition of cysteine residues to the N-hydroxysuccinyl esters of acrylic and cinnamic acids." *Pharmacol Res* **63**(1): 30-36.
- Saijo, K., I. Mecklenbrauker, A. Santana, et al. (2002). "Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha." *J Exp Med* **195**(12): 1647-1652.
- Sakurai, T. and M. Kudo (2011). "Signaling pathways governing tumor angiogenesis." *Oncology* **81 Suppl 1**: 24-29.
- Salomon, L., D. Azria, C. Bastide, et al. (2010). "[Recommendations Onco-Urology 2010: Prostate cancer]." *Prog Urol* **20 Suppl 4**: S217-251.
- Sampson, N., R. Koziel, C. Zenzmaier, et al. (2011). "ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma." *Mol Endocrinol* **25**(3): 503-515.
- Sanda, M. G., T. H. Beaty, R. E. Stutzman, et al. (1994). "GENETIC SUSCEPTIBILITY OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA." *Journal of Urology* **152**(1): 115-119.
- Santamaria, L., R. Martin, J. J. Martin, et al. (2002). "Stereologic estimation of the number of neuroendocrine cells in normal human prostate detected by immunohistochemistry." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **10**(3): 275-281.
- Saraon, P., K. Jarvi and E. P. Diamandis (2011). "Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence." *Clin Chem* **57**(10): 1366-1375.
- Sarkar, O., A. Assadian, H. Frank, et al. (2010). "Hereditary and acquired thrombophilic disorders complicating vascular access in haemodialysis: O. Sarkar et al." *NDT Plus* **3**(4): 393-396.
- Schaff, U. Y., N. Dixit, E. Procyk, et al. (2010). "Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow." *Blood* **115**(3): 657-666.
- Schmechel, D., P. J. Marangos and M. Brightman (1978). "Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells." *Nature* **276**(5690): 834-836.
- Schuller, H. M., H. A. Al-Wadei, M. F. Ullah, et al. (2012). "Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention." *Carcinogenesis* **33**(1): 191-196.
- Schuur, E. R., G. A. Henderson, L. A. Kmetec, et al. (1996). "Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer." *J Biol Chem* **271**(12): 7043-7051.
- Schwab, A., A. Fabian, P. J. Hanley, et al. (2012). "Role of ion channels and transporters in cell migration." *Physiol Rev* **92**(4): 1865-1913.
- Schwab, A. and C. Stock (2014). "Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**(1638): 20130102.
- Schweizer, L., C. A. Rizzo, T. E. Spires, et al. (2008). "The androgen receptor can signal through Wnt/beta-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens." *BMC Cell Biol* **9**: 4.
- Sciarra, A., G. Mariotti, V. Gentile, et al. (2003). "Neuroendocrine differentiation in human prostate tissue: is it detectable and treatable?" *BJU Int* **91**(5): 438-445.
- Segal, N. H., R. J. Cohen, Z. Haffeejee, et al. (1994). "BCL-2 proto-oncogene expression in prostate cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell." *Arch Pathol Lab Med* **118**(6): 616-618.
- Selvaraj, S., Y. Sun, P. Sukumaran, et al. (2016). "Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway." *Mol Carcinog* **55**(5): 818-831.
- Séronie-Vivien, S. and J. J. Rambeaud (2006). "Biologie de la transition des cancers de la prostate vers l'hormono-résistance : mécanismes et implications thérapeutiques." *Progrès en Urologie* **16**: 675-680.
- Shabsigh, A., D. T. Chang, D. F. Heitjan, et al. (1998). "Rapid reduction in blood flow to the rat ventral prostate gland after castration: preliminary evidence that androgens influence prostate size by regulating blood flow to the prostate gland and prostatic endothelial cell survival." *Prostate* **36**(3): 201-206.
- Shabsigh, A., B. Lee and R. Buttyan (1999). "Unique morphological aspects of the rat ventral prostate gland revealed by vascular corrosion casting." *Prostate* **39**(4): 240-245.
- Shafi, A. A., A. E. Yen and N. L. Weigel (2013). "Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer." *Pharmacol Ther* **140**(3): 223-238.

- Shaikh Ibrahim, Z., A. Lindstrom, J. Ellinger, et al. (2012). "Genes differentially expressed in the peripheral zone compared to the transitional zone of the normal human prostate and their potential regulation by ETS factors." *Mol Med Rep* **5**(1): 32-36.
- Shao, Z. M., M. Nguyen and S. H. Barsky (2000). "Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated." *Oncogene* **19**(38): 4337-4345.
- Sharma, N. and A. A. Adjei (2011). "In the clinic: ongoing clinical trials evaluating c-MET-inhibiting drugs." *Ther Adv Med Oncol* **3**(1 Suppl): S37-50.
- Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010). "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes Dev* **24**(18): 1967-2000.
- Sheridan, P. J., J. M. Buchanan, V. C. Anselmo, et al. (1979). "Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors." *Nature* **282**(5739): 579-582.
- Sherwood, E. R., L. A. Berg, N. J. Mitchell, et al. (1990). "Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate." *J Urol* **143**(1): 167-171.
- Sherwood, E. R., G. Theyer, G. Steiner, et al. (1991). "Differential expression of specific cytokeratin polypeptides in the basal and luminal epithelia of the human prostate." *Prostate* **18**(4): 303-314.
- Shi, X., J. Gipp, M. Dries, et al. (2014). "Prostate progenitor cells proliferate in response to castration." *Stem Cell Res* **13**(1): 154-163.
- Shichiri, M., Y. Hirata, T. Nakajima, et al. (1991). "Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines." *J Clin Invest* **87**(5): 1867-1871.
- Shih, A., S. Zhang, H. J. Cao, et al. (2004). "Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- α ." *Mol Cancer Ther* **3**(11): 1355-1364.
- Shinohara, D. B., A. M. Vaghasia, S. H. Yu, et al. (2013). "A mouse model of chronic prostatic inflammation using a human prostate cancer-derived isolate of *Propionibacterium acnes*." *Prostate* **73**(9): 1007-1015.
- Shojaei, F., J. H. Lee, B. H. Simmons, et al. (2010). "HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors." *Cancer Res* **70**(24): 10090-10100.
- Shou, Y., L. Li, K. Prabhakaran, et al. (2004). "Calcineurin-mediated Bad translocation regulates cyanide-induced neuronal apoptosis." *Biochem J* **379**(Pt 3): 805-813.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." *CA Cancer J Clin* **65**(1): 5-29.
- Signoretti, S. and M. Loda (2007). "Prostate stem cells: from development to cancer." *Semin Cancer Biol* **17**(3): 219-224.
- Signoretti, S., R. Montironi, J. Manola, et al. (2000). "Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **92**(23): 1918-1925.
- Signoretti, S., D. Waltregny, J. Dilks, et al. (2000). "p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development." *Am J Pathol* **157**(6): 1769-1775.
- Simon, R. H., E. J. Lovett, 3rd, D. Tomaszek, et al. (1980). "Electrical stimulation of the midbrain mediates metastatic tumor growth." *Science* **209**(4461): 1132-1133.
- Simoncini, T. and A. R. Genazzani (2003). "Non-genomic actions of sex steroid hormones." *Eur J Endocrinol* **148**(3): 281-292.
- Singh, M., R. Jha, J. Melamed, et al. (2014). "Stromal androgen receptor in prostate development and cancer." *Am J Pathol* **184**(10): 2598-2607.
- Sitar, S., A. Kejzar, D. Pahovnik, et al. (2015). "Size characterization and quantification of exosomes by asymmetrical-flow field-flow fractionation." *Anal Chem* **87**(18): 9225-9233.
- Smith, D. C., M. R. Smith, C. Sweeney, et al. (2013). "Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial." *J Clin Oncol* **31**(4): 412-419.
- Soboloff, J., M. A. Spassova, M. A. Dziadek, et al. (2006). "Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication." *Biochim Biophys Acta* **1763**(11): 1161-1168.
- Socci, R., A. Chu, P. Reinach, et al. (1993). "In situ Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from a ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ store in corneal epithelial cells." *Comp Biochem Physiol B* **106**(4): 793-797.
- Song, C., H. Chen, T. Wang, et al. (2015). "Expression profile analysis of microRNAs in prostate cancer by next-generation sequencing." *Prostate* **75**(5): 500-516.

- Sorrentino, V. and P. Volpe (1993). "Ryanodine receptors: how many, where and why?" Trends Pharmacol Sci **14**(3): 98-103.
- Sotomayor, M., D. P. Corey and K. Schulten (2005). "In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats." Structure **13**(4): 669-682.
- Sounni, N. E. and A. Noel (2005). "Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression." Biochimie **87**(3-4): 329-342.
- Spaeth, E., A. Klopp, J. Dembinski, et al. (2008). "Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells." Gene Ther **15**(10): 730-738.
- Spina, A., V. D. Pasquale, G. Cerulo, et al. (2015). "HGF/c-MET Axis in Tumor Microenvironment and Metastasis Formation." Biomedicines **3**(1): 71-88.
- Spiotto, M. T. and T. D. Chung (2000). "STAT3 mediates IL-6-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells." Prostate **42**(3): 186-195.
- Stattin, P., S. Rinaldi, C. Biessy, et al. (2004). "High levels of circulating insulin-like growth factor-I increase prostate cancer risk: a prospective study in a population-based nonscreened cohort." J Clin Oncol **22**(15): 3104-3112.
- Stocker, M. (2004). "Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family." Nat Rev Neurosci **5**(10): 758-770.
- Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, et al. (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." Cell **112**(6): 819-829.
- Streng, T., H. E. Axelsson, P. Hedlund, et al. (2008). "Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder." Eur Urol **53**(2): 391-399.
- Stresemann, C., B. Brueckner, T. Musch, et al. (2006). "Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines." Cancer Res **66**(5): 2794-2800.
- Su, T. T., B. Guo, Y. Kawakami, et al. (2002). "PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling." Nat Immunol **3**(8): 780-786.
- Sugimoto, H., T. M. Mundel, M. W. Kieran, et al. (2006). "Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment." Cancer Biol Ther **5**(12): 1640-1646.
- Sugimura, T., K. Wakabayashi, H. Nakagama, et al. (2004). "Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish." Cancer Sci **95**(4): 290-299.
- Sulzer, M. A., M. P. Leers, J. A. van Noord, et al. (1998). "Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer." Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 1): 1319-1323.
- Sun, A., J. Tang, Y. Hong, et al. (2008). "Androgen receptor-dependent regulation of Bcl-xL expression: Implication in prostate cancer progression." Prostate **68**(4): 453-461.
- Sun, P., H. Enslen, P. S. Myung, et al. (1994). "Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity." Genes Dev **8**(21): 2527-2539.
- Sun, Y., J. Niu and J. Huang (2009). "Neuroendocrine differentiation in prostate cancer." Am J Transl Res **1**(2): 148-162.
- Sun, Y. X., A. Schneider, Y. Jung, et al. (2005). "Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo." J Bone Miner Res **20**(2): 318-329.
- Taboga, S. R. and C. Vidal Bde (2003). "Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies." J Submicrosc Cytol Pathol **35**(1): 11-16.
- Takahashi, N., Y. Mizuno, D. Kozai, et al. (2008). "Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators." Channels (Austin) **2**(4): 287-298.
- Takaishi, M., F. Fujita, K. Uchida, et al. (2012). "1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1." Mol Pain **8**: 86.
- Takayama, H., W. J. LaRochelle, R. Sharp, et al. (1997). "Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 701-706.
- Takenaka, Y., T. Fukumori and A. Raz (2004). "Galectin-3 and metastasis." Glycoconj J **19**(7-9): 543-549.
- Talavera, K., M. Gees, Y. Karashima, et al. (2009). "Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1." Nat Neurosci **12**(10): 1293-1299.
- Tannock, I. F., R. de Wit, W. R. Berry, et al. (2004). "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer." N Engl J Med **351**(15): 1502-1512.

- Taplin, M. E., G. J. Bubley, T. D. Shuster, et al. (1995). "Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer." *N Engl J Med* **332**(21): 1393-1398.
- Taylor-Clark, T. E., M. A. McAlexander, C. Nassenstein, et al. (2008). "Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal." *J Physiol* **586**(14): 3447-3459.
- Taylor-Clark, T. E., B. J. Udem, D. W. Macglashan, Jr., et al. (2008). "Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1)." *Mol Pharmacol* **73**(2): 274-281.
- Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, et al. (2010). "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." *Cancer Cell* **18**(1): 11-22.
- Taylor, R. A. and G. P. Risbridger (2008). "Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression." *Curr Cancer Drug Targets* **8**(6): 490-497.
- Taylor, R. A., R. Toivanen and G. P. Risbridger (2010). "Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem." *Endocr Relat Cancer* **17**(4): R273-285.
- Tennant, M. K., J. B. Thrasher, P. A. Twomey, et al. (1996). "Protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) for the type 1 insulin-like growth factor (IGF) receptor is decreased and IGF-II mRNA is increased in human prostate carcinoma compared to benign prostate epithelium." *J Clin Endocrinol Metab* **81**(10): 3774-3782.
- Tenniswood, M. (1986). "Role of epithelial-stromal interactions in the control of gene expression in the prostate: an hypothesis." *Prostate* **9**(4): 375-385.
- Thaker, P. H., L. Y. Han, A. A. Kamat, et al. (2006). "Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma." *Nat Med* **12**(8): 939-944.
- Thebault, S., M. Flourakis, K. Vanoverberghe, et al. (2006). "Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells." *Cancer Res* **66**(4): 2038-2047.
- Thebault, S., M. Roudbaraki, V. Sydorenko, et al. (2003). "Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells." *J Clin Invest* **111**(11): 1691-1701.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 442-454.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* **139**(5): 871-890.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(2): 131-142.
- Thorpe, J. F., S. Jain, T. H. Marczylo, et al. (2007). "A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention." *Ann R Coll Surg Engl* **89**(3): 207-211.
- Tkachenko, E., J. M. Rhodes and M. Simons (2005). "Syndecans: new kids on the signaling block." *Circ Res* **96**(5): 488-500.
- Toi, M., T. Taniguchi, T. Ueno, et al. (1998). "Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer." *Clin Cancer Res* **4**(3): 659-664.
- Tomas, D., M. Ulamec, T. Hudolin, et al. (2006). "Myofibroblastic stromal reaction and expression of tenascin-C and laminin in prostate adenocarcinoma." *Prostate Cancer Prostatic Dis* **9**(4): 414-419.
- Tombal, B., K. Miller, L. Boccon-Gibod, et al. (2010). "Additional analysis of the secondary end point of biochemical recurrence rate in a phase 3 trial (CS21) comparing degarelix 80 mg versus leuprolide in prostate cancer patients segmented by baseline characteristics." *Eur Urol* **57**(5): 836-842.
- Tombal, B. and P. J. Van Cangh (2001). "TRAITEMENT DU CANCER DE LA PROSTATE: NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES." *LOUVAIN MED.* **120**: 77-86.
- Tomic, T. T., H. Gustavsson, W. Wang, et al. (2012). "Castration resistant prostate cancer is associated with increased blood vessel stabilization and elevated levels of VEGF and Ang-2." *Prostate* **72**(7): 705-712.
- Tomlins, S. A., R. Mehra, D. R. Rhodes, et al. (2007). "Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression." *Nat Genet* **39**(1): 41-51.
- Tong, Z., W. Luo, Y. Wang, et al. (2010). "Tumor tissue-derived formaldehyde and acidic microenvironment synergistically induce bone cancer pain." *PLoS One* **5**(4): e10234.
- Toyota, H., N. Yanase, T. Yoshimoto, et al. (2003). "Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax." *Cancer Lett* **189**(2): 221-230.

- Tredan, O., C. M. Galmarini, K. Patel, et al. (2007). "Drug resistance and the solid tumor microenvironment." J Natl Cancer Inst **99**(19): 1441-1454.
- Trevisan, G., C. Hoffmeister, M. F. Rossato, et al. (2014). "TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout." Free Radic Biol Med **72**: 200-209.
- Trevisan, G., S. Materazzi, C. Fusi, et al. (2013). "Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade." Cancer Res **73**(10): 3120-3131.
- Trevisan, G., M. F. Rossato, C. Hoffmeister, et al. (2013). "Mechanisms involved in abdominal nociception induced by either TRPV1 or TRPA1 stimulation of rat peritoneum." Eur J Pharmacol **714**(1-3): 332-344.
- Trevisan, G., M. F. Rossato, R. Tonello, et al. (2014). "Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **387**(7): 679-689.
- Trevisani, M., J. Siemens, S. Materazzi, et al. (2007). "4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13519-13524.
- Tsavalier, L., M. H. Shapero, S. Morkowski, et al. (2001). "Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins." Cancer Res **61**(9): 3760-3769.
- Tsien, R. Y. (1980). "New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures." Biochemistry **19**(11): 2396-2404.
- Tsien, R. Y., T. Pozzan and T. J. Rink (1982). "Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator." J Cell Biol **94**(2): 325-334.
- Tsujimura, A., K. Fujita, K. Komori, et al. (2007). "Prostatic stem cell marker identified by cDNA microarray in mouse." J Urol **178**(2): 686-691.
- Tsutsumi, M., S. Denda, K. Ikeyama, et al. (2010). "Exposure to low temperature induces elevation of intracellular calcium in cultured human keratinocytes." J Invest Dermatol **130**(7): 1945-1948.
- Tu, W. H., T. Z. Thomas, N. Masumori, et al. (2003). "The loss of TGF-beta signaling promotes prostate cancer metastasis." Neoplasia **5**(3): 267-277.
- Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala and D. R. Rowley (2001). "Reactive stroma in prostate cancer progression." J Urol **166**(6): 2472-2483.
- Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala, M. J. Smith, et al. (2002). "Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling." Clin Cancer Res **8**(9): 2912-2923.
- Tuxhorn, J. A., S. J. McAlhany, T. D. Dang, et al. (2002). "Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model." Cancer Res **62**(11): 3298-3307.
- Uzgare, A. R., Y. Xu and J. T. Isaacs (2004). "In vitro culturing and characteristics of transit amplifying epithelial cells from human prostate tissue." J Cell Biochem **91**(1): 196-205.
- van Asperen, C. J., R. M. Brohet, E. J. Meijers-Heijboer, et al. (2005). "Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary." J Med Genet **42**(9): 711-719.
- Van Coppenolle, F., R. Skryma, H. Ouadid-Ahidouch, et al. (2004). "Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation." Biochem J **377**(Pt 3): 569-578.
- van der Heul-Nieuwenhuijsen, L., P. J. Hendriksen, T. H. van der Kwast, et al. (2006). "Gene expression profiling of the human prostate zones." BJU Int **98**(4): 886-897.
- van Leenders, G., B. van Balken, T. Aalders, et al. (2002). "Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion." Prostate **51**(2): 98-107.
- van Leenders, G. J. and J. A. Schalken (2003). "Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer." Crit Rev Oncol Hematol **46** Suppl: S3-10.
- Vanden Abeele, F., L. Lemonnier, S. Thebault, 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 **279**(29): 30326-30337.

- Vanden Abeele, F., M. Roudbaraki, Y. Shuba, et al. (2003). "Store-operated Ca²⁺ current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca²⁺ transporter type 1." *J Biol Chem* **278**(17): 15381-15389.
- Vanden Abeele, F., Y. Shuba, M. Roudbaraki, et al. (2003). "Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis." *Cell Calcium* **33**(5-6): 357-373.
- Vanden Abeele, F., R. Skryma, Y. Shuba, 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.
- Vandenbos, F., D. Chevallier and J. F. Michiels (2004). "Cancers de la prostate : classification histopathologique." *Oncologie* **6**: 385-393.
- Vanoverberghe, K., P. Mariot, F. Vanden Abeele, et al. (2003). "Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells." *Cell Calcium* **34**(1): 75-85.
- Vanoverberghe, K., F. Vanden Abeele, P. Mariot, et al. (2004). "Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells." *Cell Death Differ* **11**(3): 321-330.
- Varkaris, A., P. G. Corn, S. Gaur, et al. (2011). "The role of HGF/c-Met signaling in prostate cancer progression and c-Met inhibitors in clinical trials." *Expert Opin Investig Drugs* **20**(12): 1677-1684.
- Varnai, P., L. Hunyady and T. Balla (2009). "STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry." *Trends Pharmacol Sci* **30**(3): 118-128.
- Vashchenko, N. and P. A. Abrahamsson (2005). "Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities." *Eur Urol* **47**(2): 147-155.
- Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." *Annu Rev Biochem* **76**: 387-417.
- Vig, M., C. Peinelt, A. Beck, et al. (2006). "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry." *Science* **312**(5777): 1220-1223.
- Villers, A., J. E. McNeal, E. A. Redwine, et al. (1989). "The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma." *J Urol* **142**(3): 763-768.
- Vis, A. N. and F. H. Schroder (2009). "Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 2: the androgen receptor and 5alpha-reductase." *BJU Int* **104**(9): 1191-1197.
- Visintainer, M. A., J. R. Volpicelli and M. E. Seligman (1982). "Tumor rejection in rats after inescapable or escapable shock." *Science* **216**(4544): 437-439.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2012). "Cancer stem cells: current status and evolving complexities." *Cell Stem Cell* **10**(6): 717-728.
- Vollmer, G. (1997). "Biologic and oncologic implications of tenascin-C/hexabrachion proteins." *Crit Rev Oncol Hematol* **25**(3): 187-210.
- Vral, A., V. Magri, E. Montanari, et al. (2012). "Topographic and quantitative relationship between prostate inflammation, proliferative inflammatory atrophy and low-grade prostate intraepithelial neoplasia: a biopsy study in chronic prostatitis patients." *Int J Oncol* **41**(6): 1950-1958.
- Vriens, J., A. Janssens, J. Prenen, et al. (2004). "TRPV channels and modulation by hepatocyte growth factor/scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells." *Cell Calcium* **36**(1): 19-28.
- W.K. Oh, M.Hurwitz, A.V.D'Amico, et al. (2003). "Biology of Prostate Cancer." *Holland-Frei Cancer Medicine* **6th edition**.
- Walle, T. (2011). "Bioavailability of resveratrol." *Ann N Y Acad Sci* **1215**: 9-15.
- Walle, T., F. Hsieh, M. H. DeLegge, et al. (2004). "High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans." *Drug Metab Dispos* **32**(12): 1377-1382.
- Waltering, K. K., A. Urbanucci and T. Visakorpi (2012). "Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer." *Mol Cell Endocrinol* **360**(1-2): 38-43.
- Wang, J., Y. Sun, W. Song, et al. (2005). "Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis." *Cell Signal* **17**(12): 1578-1592.
- Wang, S., Y. Dai, T. Fukuoka, et al. (2008). "Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain." *Brain* **131**(Pt 5): 1241-1251.
- Wang, S. and W. S. El-Deiry (2004). "Cytochrome c: a crosslink between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis." *Cancer Biol Ther* **3**(1): 44-46.
- Wang, S., J. Gao, Q. Lei, et al. (2003). "Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer." *Cancer Cell* **4**(3): 209-221.

- Wang, S., A. J. Garcia, M. Wu, et al. (2006). "Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1480-1485.
- Wang, S., C. Zhai, Y. Zhang, et al. (2016). "Cardamonin, a Novel Antagonist of hTRPA1 Cation Channel, Reveals Therapeutic Mechanism of Pathological Pain." *Molecules* **21**(9).
- Wang, X., M. Kruithof-de Julio, K. D. Economides, et al. (2009). "A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer." *Nature* **461**(7263): 495-500.
- Wang, Y., X. Deng, S. Mancarella, et al. (2010). "The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels." *Science* **330**(6000): 105-109.
- Wang, Y., S. Hayward, M. Cao, et al. (2001). "Cell differentiation lineage in the prostate." *Differentiation* **68**(4-5): 270-279.
- Wang, Y. Y., R. B. Chang, H. N. Waters, et al. (2008). "The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions." *J Biol Chem* **283**(47): 32691-32703.
- Wang, Y. Y., C. Lehuède, V. Laurent, et al. (2012). "Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer." *Cancer Lett* **324**(2): 142-151.
- Watabe, T., M. Lin, H. Ide, et al. (2002). "Growth, regeneration, and tumorigenesis of the prostate activates the PSCA promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 401-406.
- Watt, F., A. Martorana, D. E. Brookes, et al. (2001). "A tissue-specific enhancer of the prostate-specific membrane antigen gene, FOLH1." *Genomics* **73**(3): 243-254.
- Wernert, N. (1997). "The multiple roles of tumour stroma." *Virchows Arch* **430**(6): 433-443.
- Wernert, N., C. Locherbach, A. Wellmann, et al. (2001). "Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers." *Anticancer Res* **21**(4A): 2259-2264.
- Wernert, N., G. Seitz, R. Goebbels, et al. (1986). "Immunohistochemical demonstration of cytokeratins in the human prostate." *Pathol Res Pract* **181**(6): 668-674.
- West, R. B. and M. van de Rijn (2007). "Experimental approaches to the study of cancer-stroma interactions: recent findings suggest a pivotal role for stroma in carcinogenesis." *Lab Invest* **87**(10): 967-970.
- Wetherill, Y. B., C. E. Petre, K. R. Monk, et al. (2002). "The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells." *Mol Cancer Ther* **1**(7): 515-524.
- Whitacre, D. C., S. Chauhan, T. Davis, et al. (2002). "Androgen induction of in vitro prostate cell differentiation." *Cell Growth Differ* **13**(1): 1-11.
- Wikstrom, P., J. Marusic, P. Stattin, et al. (2009). "Low stroma androgen receptor level in normal and tumor prostate tissue is related to poor outcome in prostate cancer patients." *Prostate* **69**(8): 799-809.
- Wikstrom, P., P. Westin, P. Stattin, et al. (1999). "Early castration-induced upregulation of transforming growth factor beta1 and its receptors is associated with tumor cell apoptosis and a major decline in serum prostate-specific antigen in prostate cancer patients." *Prostate* **38**(4): 268-277.
- Williams, R. T., S. S. Manji, N. J. Parker, et al. (2001). "Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins." *Biochem J* **357**(Pt 3): 673-685.
- Wilson, S. R., K. A. Gerhold, A. Bifolck-Fisher, et al. (2011). "TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch." *Nat Neurosci* **14**(5): 595-602.
- Winterbourn, C. C. and A. J. Kettle (2000). "Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid." *Free Radic Biol Med* **29**(5): 403-409.
- Wiseman, B. S. and Z. Werb (2002). "Stromal effects on mammary gland development and breast cancer." *Science* **296**(5570): 1046-1049.
- Wolff, J. M. and M. Mason (2012). "Drivers for change in the management of prostate cancer - guidelines and new treatment techniques." *BJU Int* **109** Suppl 6: 33-41.
- Woo, J. K., J. H. Kang, B. Kim, et al. (2015). "Humanized anti-hepatocyte growth factor (HGF) antibody suppresses innate irinotecan (CPT-11) resistance induced by fibroblast-derived HGF." *Oncotarget* **6**(27): 24047-24060.
- Worley, P. F., W. Zeng, G. N. Huang, et al. (2007). "TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels." *Cell Calcium* **42**(2): 205-211.

- Wu, M. M., J. Buchanan, R. M. Luik, et al. (2006). "Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." *J Cell Biol* **174**(6): 803-813.
- Xiao, B., A. E. Dubin, B. Bursulaya, et al. (2008). "Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels." *J Neurosci* **28**(39): 9640-9651.
- Xie, J., H. Pan, J. Yao, et al. (2016). "SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives." *Int J Cancer* **138**(9): 2067-2077.
- Xin, L., D. A. Lawson and O. N. Witte (2005). "The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(19): 6942-6947.
- Xing, N., J. Qian, D. Bostwick, et al. (2001). "Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin." *Prostate* **48**(1): 7-15.
- Xu, H., N. T. Blair and D. E. Clapham (2005). "Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism." *J Neurosci* **25**(39): 8924-8937.
- Yagoda, A. and D. Petrylak (1993). "Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer." *Cancer* **71**(3 Suppl): 1098-1109.
- Yan, G., Y. Fukabori, S. Nikolaropoulos, et al. (1992). "Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin." *Mol Endocrinol* **6**(12): 2123-2128.
- Yang, S. and X. Y. Huang (2005). "Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration." *J Biol Chem* **280**(29): 27130-27137.
- Yang, S., J. J. Zhang and X. Y. Huang (2009). "Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis." *Cancer Cell* **15**(2): 124-134.
- Yang, Y., J. Hao, X. Liu, et al. (1997). "Differential expression of cytokeratin mRNA and protein in normal prostate, prostatic intraepithelial neoplasia, and invasive carcinoma." *Am J Pathol* **150**(2): 693-704.
- Yao, M., R. A. Taylor, M. G. Richards, et al. (2010). "Prostate-regenerating capacity of cultured human adult prostate epithelial cells." *Cells Tissues Organs* **191**(3): 203-212.
- Yasuda, K., O. Nagakawa, T. Akashi, et al. (2009). "Serum active hepatocyte growth factor (AHGF) in benign prostatic disease and prostate cancer." *Prostate* **69**(4): 346-351.
- Yeromin, A. V., S. L. Zhang, W. Jiang, et al. (2006). "Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai." *Nature* **443**(7108): 226-229.
- Yu, G., Y. Jing, X. Kou, et al. (2013). "Hepatic stellate cells secreted hepatocyte growth factor contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma." *PLoS One* **8**(9): e73312.
- Yu, L., S. Wang, Y. Kogure, et al. (2013). "Modulation of TRP channels by resveratrol and other stilbenoids." *Mol Pain* **9**: 3.
- Yu, S. and A. Ouyang (2009). "TRPA1 in bradykinin-induced mechanical hypersensitivity of vagal C fibers in guinea pig esophagus." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(2): G255-265.
- Yuan, T. C., S. Veeramani and M. F. Lin (2007). "Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells." *Endocr Relat Cancer* **14**(3): 531-547.
- Zarain-Herzberg, A., J. Frago-Molina and R. Estrada-Aviles (2011). "Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart." *IUBMB Life* **63**(10): 847-855.
- Zaynagetdinov, R., T. P. Sherrill, V. V. Polosukhin, et al. (2011). "A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis." *J Immunol* **187**(11): 5703-5711.
- Zeisberg, E. M., S. Potenta, L. Xie, et al. (2007). "Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts." *Cancer Res* **67**(21): 10123-10128.
- Zelivianski, S., T. Igawa, S. Lim, et al. (2002). "Identification and characterization of regulatory elements of the human prostatic acid phosphatase promoter." *Oncogene* **21**(23): 3696-3705.
- Zelivianski, S., M. Verni, C. Moore, et al. (2001). "Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype." *Biochim Biophys Acta* **1539**(1-2): 28-43.
- Zerbib, M. and S. Conquy (2001). *La Prostate*, Editions Doin.
- Zhang, W., L. R. Kapusta, J. M. Slingerland, et al. (1998). "Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium." *Cancer Res* **58**(4): 619-621.

- Zhou, Z., E. J. Hong, S. Cohen, et al. (2006). "Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation." Neuron **52**(2): 255-269.
- Zielinski, R. R., B. J. Eigel and K. N. Chi (2013). "Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer." Cancer J **19**(1): 79-89.
- Zong, W. X., C. Li, G. Hatzivassiliou, et al. (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." J Cell Biol **162**(1): 59-69.
- Zurborg, S., B. Yurgionas, J. A. Jira, et al. (2007). "Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺." Nat Neurosci **10**(3): 277-279.