

Université des Sciences et Technologies de Lille

Année 2007

N° Ordre H 561

Présentation des travaux en vue de l'obtention du diplôme
D'Habilitation à Diriger les Recherches.

**Implications des canaux potassiques et de la signalisation calcique
dans la physiopathologie des cellules épithéliales prostatiques.**

Le 31 Janvier 2007

Par

Fabien VAN COPPENOLLE

Laboratoire de Physiologie Cellulaire

INSERM U 800

Devant le jury composé de :

Mme Xuefen Le Bourhis , Professeur à l'Université de Lille I, INSERM ERI-8, Villeneuve d'Ascq.	Présidente de Jury
Mme Halima Ouadid-Ahidouch , Professeur à l'Université de Picardie, Directrice de Laboratoire, Amiens.	Rapporteur
Mr Laurent Combettes , Directeur de Recherche, CNRS UMR-S 757, Orsay.	Rapporteur
Mr José Cancela , Chargé de Recherche, CNRS UPR 9040, Gif-sur-Yvette.	Rapporteur
Mr Jean-Claude Beauvillain , Directeur de Recherche, INSERM U 422, Lille.	Examineur
Mme N. Prevarskaya , Professeur à l'Université de Lille I, INSERM U 800, Villeneuve d'Ascq.	Directrice

*A ma femme, Laurence.
Et à mes fils, Hugo et Louis.*

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement tout d'abord le Professeur Natalia Prevarskaya pour m'avoir accueilli, en 1996, dans son laboratoire. Au cours de ma thèse, puis lors de mon recrutement, j'ai pu bénéficier de ses précieux conseils, de son expérience et de sa disponibilité. Ceci est d'ailleurs toujours vrai aujourd'hui !

Je remercie très chaleureusement le Professeur Halima Ouadid-Ahidouch qui m'a encadré en DEA et co-encadré en thèse. Dans une carrière, il faut, je pense, tenter de réaliser un bon départ. Je ne pouvais rêver mieux que celui qu'Halima m'a offert ! Je la remercie également d'être rapporteur de mon travail.

Je remercie vivement le Professeur Xuefen Le Bourhis, le Docteur Laurent Combettes, le Docteur José Cancela et le Professeur Jean-Claude Beauvillain d'avoir accepté de participer à ce jury.

Enfin, j'adresse un grand merci à mes collègues et amis du laboratoire.

Sommaire

<i>Curriculum vitae</i>	7
Publications	10
Communications	13
Activités d'enseignement et de formation	16
Subventions obtenues	20
Activités de recherche	21
Avant-propos	22
Introduction	25
I- Généralités sur le cancer de la prostate	26
II- Canaux potassiques et prolifération cellulaire	28
1- Classification des canaux potassiques	29
2- Canaux potassiques et physiologie cellulaire	30
3- Rôles des canaux potassiques dans la prolifération cellulaire	32
4- Applications cliniques ?	35
5- Conclusion	35
III- Régulation de la concentration calcique luminale et cytosolique	36
1- Le calcium, un second messenger ubiquitaire	36
2- Homéostasie calcique	37
3- Fuite de calcium à partir des stocks intracellulaires : une énigme de la signalisation calcique	40
4- Rôle du translocon dans la fuite de calcium du réticulum endoplasmique	42
5- Conclusion	43
Résultats	44
Chapitre I : Implication des canaux potassiques dans le contrôle de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques. Modulation par la prolactine.	45
Article 1 : Skryma R., Van Coppenolle F., Dufy-Barbe L., Dufy B., Prevarskaya N.	46
Characterisation of Ca²⁺-inhibited potassium channels excised patches of cells from human prostate cancer cell line LNCaP. Receptors and Channels, 1999, 6 : 241-253	
Article 2: Rybalchenko V., Prevarskaya N., Van Coppenolle F., Legrand G., Lemonnier L., Le Bourhis X., Skryma R.	46
Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing K⁺ channel gating. Mol. Pharmacol., 2001, 59(6): 1376-87	

Article 3 : Ouadid-Ahidouch H., Van Coppenolle F. , Le Bourhis X., Belhaj A., Prevarskaya N. Potassium channels in rat prostate epithelial cells. Febs Letters, 1999, 459 : 15-21	48
Article 4 : Van Coppenolle F. , Le Bourhis X., Carpentier F., Delaby G., Cousse H., Raynaud J-P., Dupouy J.-P., Prevarskaya N. Pharmacological effect of the lipido-stérolé extract of <i>Serenoa repens</i> (Permixon®) on rat prostate hyperplasia. Comparison with Finasteride. The Prostate, 2000, 43(1) : 49-58	50
Article 5 : Van Coppenolle F. , Slomianny C., Carpentier F., Le Bourhis X., Ahidouch A., Croix D., Legrand G., Dewailly E., Fournier S., Cousse H., Authié D., Raynaud J-P., Beauvillain J-C., Dupouy J-P., Prevarskaya N. Effects of hyperprolactinemia on prostate growth: evidence of androgeno-dependence. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2001, 280(1) : E120-9	50
Article 6 : Van Coppenolle F. , Skryma R., Ouadid-Ahidouch H., Slomianny C., Roudbaraki M., Delcourt P., Dewailly E., Humez S., Crepin A., Gourdou I., Djiane J., Bonnal J-L., Mauroy B. And Prevarskaya N. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. Biochem J. 2004. 377 , 569-78	50
Conclusion chapitre 1	54
Chapitre 2 :	56
2.1- Etat des stocks calciques et apoptose des cellules cancéreuses prostatiques	57
Article 7 : Skryma R., Mariot P., Van Coppenolle F. , Shuba Y., Legrand G., Humez S., Le Bourhis X., Boilly B., Prevarskaya N. Store-depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer cells LNCaP : Involvement in apoptosis. J. Physiol. (London). 2000. 527 : 71-83	58
Article 8 : 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 Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. Cancer Cell. 2002. 1 : 169-179.	61
2.2- Régulation de la concentration en calcium dans le réticulum endoplasmique des cellules de pancréas exocrine de souris.	64
Article 9 : Cancela J, Van Coppenolle F. , Galione A, Tepikin AV and Petersen OH. Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients: the combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers. EMBO J. 2002. 21(5) : 909-19	65

Article 10 : Lomax RB, Camello C, Van Coppenolle F , Petersen OH and Tepikin AV. Basal and Physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Journal of Biological Chemistry. 2002. 277(29): 26479-26485	69
Chapitre 3 : Mise en évidence du rôle du translocon comme canal de fuite	71
Article 11 : Van Coppenolle F , Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E and Prevarskaya N Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. Journal of Cell Science. 2004. 117: 4135-4142	72
Article 12 : Flourakis M, Van Coppenolle F , Lehen'Kyi V, Beck B and Prevarskaya N Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA₂-pathway regulated Store Operated Channels activation. FASEB J. 2006. 20: 1215-7	74
Conclusion et synthèse	76
Discussion et Perspectives	79
Projet « Translocon et réponse UPR »	80
Projet « Prostate de souris et polarisation cellulaire »	87
Références bibliographiques	96

Fabien VAN COPPENOLLE

Né le 9 février 1970

Marié, 2 enfants

Nationalité française

Adresse personnelle:

20 rue Marius Brunau, 59260 Lezennes. Tel : 03 20 91 88 48

Situation actuelle :

Maître de conférences à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (U.S.T.L.).

Adresse : Laboratoire de Physiologie Cellulaire ; INSERM U 800 ; Université des Sciences et Technologies de Lille ; Bâtiment SN3 ; 59 655 Villeneuve d'Ascq Cedex ; France.

Tel : 03 20 33 64 21 ; Fax : 03 20 43 40 66 ; e-mail : fabien.vancoppenolle@univ-lille1.fr

Parcours ProfessionnelSeptembre 2000 à aujourd'hui

Maître de Conférences au Laboratoire de Physiologie Cellulaire ; INSERM U 800 ; Université de Lille I.

Décembre 1999 – septembre 2000

Stage post-doctoral à l' « University of Liverpool, MRC, Physiological Laboratory ».

“Etude des phénomènes de recapture du calcium par le réticulum endoplasmique dans les cellules du pancréas de souris”.

Encadrement : Professeur Ole H. Petersen ; Docteur Alexei Tepikin.

Octobre 1996-Décembre 1999

Doctorat « Sciences de la Vie et de la Santé »

Laboratoire de Physiologie Cellulaire; U.S.T.L., Villeneuve d'Ascq.

"Etude des mécanismes d'action de la prolactine dans les cellules de la prostate. Implications dans la prolifération et l'apoptose".

Tuteurs: Pr N. PREVARSKAYA et Dr H. OUADID.

Soutenance de thèse le 17 décembre 1999.

Mention très honorable avec les félicitations du jury.

1995 Diplôme d'Etudes Approfondies "Sciences de la Vie et de la Santé"

option Neurosciences à l'U.S.T.L.

(Université des Sciences et Technologies de Lille).

"Mécanismes de régulation des canaux calciques endogènes de type L de l'ovocyte immature de Pleurodèle par deux seconds messagers: l'AMPC et le GMPc."

Tuteurs : Professeur P. Guilbault ; Docteur H. Ouadid

DOMAINES DE COMPETENCE

- Patch-clamp en configuration cellule entière
- Imagerie calcique
- Microscopie confocale
- Technique des voltage-clamp à double microélectrodes
- Microspectrofluorimétrie
- Simple et double microinjections dans des ovocytes d'Amphibien

- Culture cellulaire (lignées cellulaires et cultures primaires)
- Immunohistochimie
- Mesures de prolifération cellulaire et d'apoptose
- Dosages hormonaux par R.I.A.
- Techniques biochimiques de base.

- Techniques d'études *in vivo* notamment (castrations, surrénalectomies, dissections des lobes prostatiques et du pancréas, pose d'implants androgéniques sous-cutanés,). Habilitation de niveau I obtenue en 2005 pour la pratique et l'encadrement lors d'expérimentation animale sur le rat et la souris
- Dissection et prélèvements des ovocytes chez *Pleurodeles waltlii* et *Xenopus laevis*.

FONCTIONS D'INTERET COLLECTIF

Mes fonctions d'intérêt collectif sont les suivantes :

- 1- Membre de la commission des spécialistes 66 depuis 2003.
- 2- Responsable de 3 unités de valeur et d'une journée thématique dans le cadre du LMD.
- 3- Correspondant « Hygiène et Sécurité » du laboratoire (ACMO) depuis 2000.
- 4- Responsable de l'expérimentation animale au sein du laboratoire.
- 5- Responsable de la gestion, de l'utilisation, de l'entretien et des utilisateurs du microscope confocal du laboratoire.

Publications

1. **Van Coppenolle* F.**, Flourakis* M., Lehen'kyi V., Beck B., Skryma R. and Prevarskaya N. (* Co-auteurs).
Passive calcium leak *via* translocon is a first step for iPLA₂-pathway regulated Store Operated Channels activation. FASEB J. 2006. **20**, 1215-7
2. **Van Coppenolle F.**, Vanden Abeel F., Slomianny, C., Flourakis M., Hesketh J., Dewailly E. and Prevarskaya N.
Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. J Cell Sci, 2004, **117**, 4135-42
3. **Van Coppenolle F.**, Skryma R., Ouadid-Ahidouch H., Slomianny C., Roudbaraki M., Delcourt P., Dewailly E., Humez S., Crepin A., Gourdou I., Djiane J., Bonnal J-L., Mauroy B. And Prevarskaya N.
Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. Biochem J. 2004. **377**, 569-78
4. Humez S, Monet M, **Van Coppenolle F**, Delcourt P, Prevarskaya N.
The role of intracellular pH in cell growth arrest induced by ATP. Am J Physiol Cell Physiol. 2004 **Dec**;287(6), C1733-46
5. Berteaux N, Lottin S, Adriaenssens E, **Van Coppenolle F**, Leroy X, Coll J, Dugimont T, Cury JJ.
Hormonal regulation of H19 gene expression in prostate epithelial cells. J Endocrinol. 2004 **Oct**;183(1),69-78.
6. Cancela J.M., **Van Coppenolle F.**, Galione A., Tepikin, A.V., Petersen O.H.
Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients : the combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers.
EMBO J., 2002, **21(5)**: 909-19
7. Lomax R.B., Camello C., **Van Coppenolle F.**, Petersen O.H., Tepikin A.

Basal and physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons.

J. Biol. Chem., 2002, **277**(29) : 26479-85

8. Vanden Abeele F., Skryma R., Shuba Y., **Van Coppenolle F.**, Slomianny C., Roudbaraki M., Mauroy B., Wuytack F., Prevarskaya N.

Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells.

Cancer Cell, 2002, **1**(2): 169-79

9. Rybalchenko V., Prevarskaya N., **Van Coppenolle F.**, Legrand G., Lemonnier L., Le Bourhis X., Skryma R.

Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing K⁺ channel gating.

Mol. Pharmacol., 2001, **59**(6): 1376-87

10. **Van Coppenolle F.**, Slomianny C., Carpentier F., Le Bourhis X., Ahidouch A., Croix D., Legrand G., Dewailly E., Fournier S., Cousse H., Authié D., Raynaud J-P., Beauvillain J-C., Dupouy J-P., Prevarskaya N.

Effects of hyperprolactinemia on prostate growth: evidence of androgeno-dependence.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2001, **280**(1): E120-9

11. Shuba Y.M., Prevarskaya N., Lemonnier L., **Van Coppenolle F.**, Kostyuk P.G., Mauroy B., Skryma R.

Volume-regulated chloride conductance in the LNCaP human prostate cancer cell line.

Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2000, **279**(4): C1144-54

12. **Van Coppenolle F.**, Le Bourhis X., Carpentier F., Delaby G., Cousse H., Raynaud J-P., Dupouy J.-P., Prevarskaya N.

Pharmacological effect of the lipido-stérolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) on rat prostate hyperplasia. Comparison with Finasteride.

The Prostate, 2000, **43**(1) : 49-58

13. Skryma R., Mariot P., **Van Coppenolle F.**, Shuba Y., Legrand G., Humez S., Le Bourhis X., Boilly B., Prevarskaya N.

Store-depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer cells LNCaP :
Involvement in apoptosis.

J. Physiol. (London), 2000, **527(1)**: 71-83

14. Mariot P., Prevarskaya N., Roudbaraki M., Le Bourhis X., **Van Coppenolle F.**,
Vanoverberghe K., Skryma R.

Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP)
cells.

The Prostate, 2000, **43(3)** : 205-14

15. Skryma R., **Van Coppenolle F.**, Dufy-Barbe L., Dufy B., Prevarskaya N.
Characterisation of Ca^{2+} -inhibited potassium channels excised patches of cells from human
prostate cancer cell line LNCaP.

Receptors and Channels, 1999, **6** : 241-253

16. Ouadid-Ahidouch H., **Van Coppenolle F.**, Le Bourhis X., Belhaj A., Prevarskaya N.
Potassium channels in rat prostate epithelial cells.

Febs Letters, 1999, **459** : 15-21

17. Ouadid-Ahidouch H., **Van Coppenolle F.**

Seasonal influence of the functional expression of the endogenous L-type Ca^{2+} channels in
Pleurodeles oocytes : role of cAMP ?

Zygote, 1998, **6** : 97-101

18. **Van Coppenolle F.**, Guilbault P., Ouadid H.

Regulation of endogenous calcium channels by cyclic AMP and cyclic GMP-dependent protein
kinases in *Pleurodeles* oocytes.

Molecular and Cellular Biochemistry, 1997, **168**: 155-161

Communications

COMMUNICATIONS ORALES

1- Réseau « ARC », Mai 2003, Lille, **Van Coppenolle F.** ; Rôle de la prolactine dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

2- 6^{ème} journée scientifique de l'Association pour la Recherche sur les tumeurs de la Prostate (Maison de la Chimie ; Paris), le 5 décembre 1997.

Van Coppenolle F., Skryma R., Ouadid H., Ahidouch A., Fournier S. et Prevarskaya N.
Etude des mécanismes d'action de la prolactine dans le développement de la prostate.

3- Invité au congrès international d'experts cliniques : « Permixon dans l'hyperplasie bénigne de la prostate ». Paris, 11-12 mars 1999.

Van Coppenolle Fabien ; Effects of Permixon in the enlargement of the rat prostate induced by hyperprolactinemia.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

1- Réseau l' « ARC » Rouen, octobre 2002.

Van Coppenolle F., Skryma R., Ouadid H., Beauvillain J-C, Prevarskaya N.
Effets de la prolactine dans le développement des tumeurs prostatiques.

2- 3^{ème} réunion du réseau Lillois de cancérologie. Berteaux N., Lottin S., Roudbaraki M., **Van Coppenolle F.**, Leroy X., Adriaenssens E., Dugimont T., Curgy J-J.

Expression du gène H19 dans la prostate hyperplasique ou cancéreuse; effets antagonistes de la dihydrotestostérone (DHT) et de la prolactine (PRL) sur cette expression.

3- 3^{ème} Congrès Mondial de Recherche en Urologie, Institut Pasteur Paris, du 30 septembre au 3 octobre 1999.

Van Coppenolle F., Skryma R., Ouadid H., Beauvillain J-C., Dupouy J-P., Prevarskaya N.
«Role of prolactin in the prostate growth».

4- 3ème Congrès Mondial de Recherche en Urologie, Institut Pasteur Paris ,du 30 septembre au 3 octobre 1999.

Ouadid H., **Van Coppenolle F.**, Le Bourhis X, Belhaj A., Prevarskaya N. «Potassium Channels in rat prostate epithelial cells».

5-Congrès des boursiers de l'ARC, Villejuif, Paris, 18 Novembre 1999.

«Effets de la prolactine sur la croissance prostatique»

Van Coppenolle F., Ouadid H., Prevarskaya N

6- 9th Meeting of the European Neuroendocrine Association. Odense, Danemark, le 3-7 septembre 1999. Skryma R., **Van Coppenolle F.**, Le Bourhis X., Ouadid H. and Prevarskaya N. « Prolactin action on prostate cell growth »

7- 27^{ème} Colloque de la Société Neuroendocrinologique expérimentale en association avec le British Neuroendocrine Group. Lille, du 2 au 5 septembre 1998. **Van Coppenolle F.**, Skryma R., Ouadid H., Le Bourhis X., Beauvillain J.C., Dupouy J.P. and Prevarskaya N. « Prolactin effects on rat prostate development »

8- 9^{ème} Colloque "Canaux ioniques" à La Londe les Maures (Bouches du Rhône) du 20 au 23 septembre 1998.

Van Coppenolle F., Ouadid H., Le Bourhis X. and Prevarskaya N. « Regulation of potassium channels by cyclic AMP in LNCaP cells ».

9- 8ème Colloque "Canaux ioniques" à La Londe les Maures (Bouches du Rhône) du 21 au 24 septembre 1997.

Van Coppenolle F., Skryma R., Prevarskaya N. "Multiple actions of calcium channel blocker verapamil in human prostate cancer cells (LNCaP) and cell proliferation".

10- 6^{ème} journée scientifique de l'Association pour la Recherche sur les tumeurs de la Prostate (Maison de la Chimie ; Paris), le 5 décembre 1997.

Van Coppenolle F., Skryma R., Ouadid H., Ahidouch A., Fournier S. et Prevarskaya N.

Etude des mécanismes d'action de la prolactine dans le développement de la prostate.

11- 7ème Colloque "Canaux Ioniques" à La Londe les Maures (Bouches du Rhône) le 19 septembre 1996.

Van Coppenolle F., Guilbault P., Ouadid H. "Regulation of endogenous calcium channels by cyclic AMP and cyclic GMP-dependent protein kinases in *Pleurodeles* oocytes".

**Activités d'Enseignement
et de Formation**

Activités d'enseignement

Mes activités d'enseignement ont débuté lors de ma thèse en tant que vacataire en TP de Physiologie Animale à l'Université de Lille 1 et à l'Université d'Artois à Lens (1996 à 1999). Elles se sont poursuivies à l'USTL après l'obtention du poste de Maître de Conférences, à l'Université de Lille 1, en septembre 2000.

Responsabilité de Modules :

- *Licence Première Année* : Licence Aménagée : Module « Physiologie Cellulaire et Biophysique ».
- *Licence Deuxième Année* : Module « Grandes Fonctions Physiologiques ».
- *Master 2 Recherche* : « Interface Physico-chimique du vivant » ; Module « Biophysique Cellulaire ».
- *Master 2 Recherche* : Journée Thématique « Tumeurs neuroendocrines et cancers hormono-dépendants ».

Enseignements en Travaux Pratiques :

- *Licence Première Année* : Module de « Physiologie Cellulaire » : Etude du potentiel d'action et de la contraction musculaire.
- *Licence Troisième Année* : Module de « Physiologie des grandes fonctions » : Régulation cardiovasculaire, respiration, excrétion.
- *Master 1* : Module « Physiologie des grandes fonctions » : activités cardiaques, ventilation, pression artérielle.
- *Master 1* : Travaux d'Enseignement et de Recherche (TER) : Initiation à l'imagerie calcique, à la microscopie confocale et à la technique du patch-clamp.
- *Master 2* : Initiation à l'imagerie calcique, à la microscopie confocale et à la technique du patch-clamp.

Enseignements en Travaux Dirigés :

- *Licence Première Année* : Module de « Physiologie Cellulaire » : Etude de la perméabilité membranaire, des courants ioniques, de la genèse et de la propagation du potentiel d'action.
- *Licence Deuxième Année* : Module « Grandes Fonctions Physiologiques » : Pathologies de l'appareil respiratoire ; Techniques de procréation médicalement assistée. Module « Communication cellulaire » : Propagation des vagues calciques.

- *Licence Troisième année* : Module d' « Endocrinologie » : Prolactine et cancer de la prostate.
- *Master 1* : Préparation CAPES : Les gradients ioniques ; la cellule musculaire.

Enseignements en Cours Magistraux:

- *Première Année* : Module de « Physiologie Cellulaire » : Les synapses ; le muscle.
- *Deuxième Année* : Module « Grandes Fonctions Physiologiques » : L'appareil respiratoire, les appareils reproducteurs, les glandes endocrines. Module « Communication cellulaire » : Principes de l'homéostasie calcique.
- *Master 1* : Module « Techniques du vivant » : Flux calciques et compartimentation cellulaire.
- *Master 2 recherche* : « Interface physico-chimique du vivant » ; « Protéomique » ; « Génie cellulaire et Moléculaire » : Techniques d'imagerie calcique, de microscopie confocale et applications.

Activités de Formation

Encadrement d'étudiants :

1996-2000 :

Encadrement d'étudiants en stage au laboratoire pour une durée minimale de 1 mois :

- Etudiants niveau DEUG à Maîtrise : Stéphanie Thébault, Fabien Vanden Abeele, Loïc Lemonnier, Karine Vanoverberghe.
- Etudiants BTS Biotechnologie : Sarah Fournier, Geoffrey Delaby.

Encadrement d'un étudiant au laboratoire de Physiologie (Liverpool, UK) : Denis Burdakov.

2000-aujourd'hui :

2000 : co-encadrement de Stéphanie Thébault en DEA « Biologie et Santé ». Implications des récepteurs adrénérgiques de type α_1 H dans la prolifération des cellules musculaires lisses de la prostate.

2003-2004 : Co-encadrement de Matthieu Flourakis en DEA « Biologie et Santé ». Mise en évidence du translocon comme canal de fuite calcique des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

2004-aujourd'hui : co-encadrement de la thèse de Matthieu Flourakis.

Durant cette période :

Encadrements d'étudiants du niveau Licence au niveau Master : Matthieu Flourakis, Florian Gackière, Solenne Ousson, Dana Ghanem, Marouf Ould-Ahmed, Frédéric Gavory, Alice Joly, Cindy Dupont, ...

Encadrements de chercheurs dans le cadre de la formation permanente :

2003 et 2004 : Formation permanente INSERM ; initiation à la microscopie confocale.

Subventions obtenues

ARTP (Association pour la Recherche sur les tumeurs de la Prostate) ; 1997 : Mise en évidence du rôle de la prolactine dans la croissance de la prostate.

Fondation pour le recherche médicale ; 1997 : Aide à l'implantation d'une nouvelle équipe : Rôle des canaux potassiques dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Pierre Fabre Médicaments ; 1997 et 1998 : Etude des mécanismes d'action de la prolactine dans les cellules prostatiques.

ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) ; 2001 : Subvention équipement lourd (co-financement du microscope confocal): Rôle des canaux potassiques et du calcium dans la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Bonus Qualité Recherche ; 2001 : Mise en place des techniques de mesures du calcium réticulaire dans les cellules prostatiques.

Ligue Nationale contre le Cancer ; 2001 : Equipement lourd (co-financement du microscope confocal): Rôle des canaux potassiques et du calcium dans la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Activités de Recherche

Avant-propos

Voici résumé en quelques lignes les grandes dates et les rencontres clés de mon parcours scientifique. Tout a débuté en 1994 où j'ai réalisé mon DEA sous la tutelle du Dr Halima Ouadid au sein du laboratoire de Physiologie Cellulaire (Université de Lille I). Nous avons entamé l'étude d'un canal calcique de type L endogène des ovocytes de Pleurodèle (Amphibien Urodèle).

Le DEA en poche, j'ai fait une « pause » sous les drapeaux d'une dizaine de mois avant d'entreprendre une thèse en septembre 1996. Cette date coïncide avec les recrutements de Natacha Prevarskaya à la tête du laboratoire de Physiologie Cellulaire et de celui de Roman Skryma en tant que Maître de Conférences. Sous la cotutelle de Natacha et d'Halima, j'ai entamé l'étude des mécanismes d'action de la prolactine *in vivo* et *in vitro* sur la prostate. Ces travaux se sont déroulés selon trois axes principaux :

- le premier concerne l'étude, en patch-clamp, des canaux potassiques impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines et dans les mécanismes de transduction de la prolactine ;
- le deuxième axe, quant à lui, fait appel aux techniques d'imagerie calcique afin de caractériser le rôle du calcium dans la régulation de l'apoptose. Nous avons mis l'accent sur les récepteurs à la ryanodine et Bcl-2 ;
- le troisième axe a trait aux études *in vivo* des effets de la prolactine sur la prostate de rat.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance d'établir de bonnes relations de travail avec le monde de l'entreprise et notamment avec « Pierre Fabre Médicaments ». Nous avons établi, avec le Département Urologie de cette entreprise, de nombreuses collaborations ayant débouché sur des contrats de recherche ainsi que sur des publications communes.

Après la soutenance de ma thèse fin 1999, je suis parti en stage post-doctoral au sein du laboratoire de Physiologie (Université de Liverpool, GB) dirigé par le Pr. O.H. Petersen. Avec le Dr. A. Tepikin comme superviseur et bénéficiant des conseils précieux et avisés du Dr J. Cancela, j'ai eu l'opportunité d'employer, de manière combinée, les deux techniques principalement utilisées au cours de ma thèse, à savoir le patch-clamp et l'imagerie calcique. Au cours du stage post-doctoral, le modèle cellulaire a changé. En effet, les cellules cancéreuses prostatiques humaines se sont « transformées » en cellules de pancréas exocrine de souris. Par contre, une continuité thématique a été suivie. En effet, les travaux auxquels j'ai participé à Liverpool ont porté sur les mécanismes de fuite calcique au sein du réticulum endoplasmique : d'une part, la fuite dite « active », c'est à dire engendrée par des agonistes tels que l'IP3, l'ADPr cyclique et le NAADP ; et d'autre part, la fuite « passive » transitant par des canaux de fuite dont tout le monde parle mais qui restent un mystère.

Enfin, en septembre 2000, j'ai été recruté comme Maître de Conférences dans le laboratoire de Physiologie Cellulaire. J'ai donc essayé de mettre à profit les connaissances techniques et scientifiques acquises au cours de mon stage post-doctoral à Liverpool. J'y ai poursuivi les études menant à la caractérisation des canaux de fuite calcique du réticulum endoplasmique. Du pancréas, je suis revenu à la prostate.

La présentation des travaux auxquels j'ai participé s'articule en deux grandes parties :

- La première a trait à l'implication des canaux potassiques dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate. Natacha et Roman avaient débuté cette thématique de recherche à Bordeaux. Ils l'ont naturellement poursuivie à Villeneuve d'Ascq. Par ailleurs, Halima réalisait une étude similaire sur les cellules cancéreuses mammaires humaines. Le but de ces travaux est bien entendu de déterminer quels sont les canaux ioniques responsables de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques humaines afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

- La seconde partie illustre les études concernant la régulation de l'état des stocks calciques, notamment par les canaux dits « de fuite ». En effet, il s'agit du sujet sur lequel je travaille principalement actuellement.

Les canaux de « fuite » sont un vaste domaine de recherche. En science, nous aimons nommer les choses. En effet, nommer un objet, implique de le connaître un tant soit peu. Néanmoins, donner un nom aussi vague à ces canaux dénote d'un manque de connaissance, de compréhension de leurs structures et de leurs rôles physiologiques. De très nombreux canaux ioniques ont été caractérisés. Par contre, les canaux de fuite restent à découvrir. C'est donc à cette famille de canaux « fourre-tout » que je me suis intéressé en particulier.

Introduction

Au cours des chapitres suivants, je vous présenterai brièvement les mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire par les canaux potassiques. Je terminerai cette introduction en rappelant les mécanismes de régulation de la concentration en calcium cytosolique et luminal.

I- Généralités sur le cancer de la prostate

Les hyperplasies bénignes et les cancers de la prostate sont des maladies des plus fréquentes. Le cancer de la prostate est devenu la première cause de mortalité par cancer dans la population masculine après le cancer du poumon. La croissance normale et pathologique de cette glande est sous le contrôle des androgènes. C'est la raison pour laquelle la plupart des traitements actuels se basent sur la diminution du taux d'androgènes circulants. Cependant, à long terme, les tumeurs deviennent hormono-indépendantes et entrent en phase d'échappement thérapeutique. Il est donc capital d'une part, de déterminer quels sont les mécanismes responsables de cette évolution et d'autre part, de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'une des particularités du cancer de la prostate réside dans le fait que son développement est lent. Un patient peut survivre plusieurs années avec cette pathologie. Ce n'est pas le cas pour d'autres cancers beaucoup plus invasifs comme le cancer du poumon ou le cancer du pancréas. Cette réalité est illustrée dans les figures ci-dessous issues d'une étude épidémiologique réalisée par l'INSERM (Remontet et al., 2003) et de l'étude Eurocare (Berrino, 2003). La figure 1 représente le nombre de nouveaux cas, chez l'homme et chez la femme en 2000 ainsi que le nombre de décès imputables à ces pathologies en 1999. La figure 2 illustre le taux de survie après 5 ans en fonction du nombre de cas diagnostiqués. Il apparaît que le taux de survie est relativement important pour le cancer de la prostate comme l'indique la figure 2. Juste une parenthèse pour attirer votre attention sur les similitudes épidémiologiques que l'on rencontre entre le cancer de la prostate et le cancer du sein, une autre glande traitée par hormonothérapie.... Le nombre de décès dû au cancer de la prostate est largement inférieur au nombre de cas détectés. Cela indique encore que le taux de survie est important. Néanmoins, ces données de mortalité ne prennent pas en compte les patients décédant d'autres pathologies au cours de leur traitement. En effet, le cancer de la prostate touche des individus le plus souvent âgés. D'autres pathologies peuvent se superposer au cancer cas comme les maladies cardio-vasculaires par exemple.

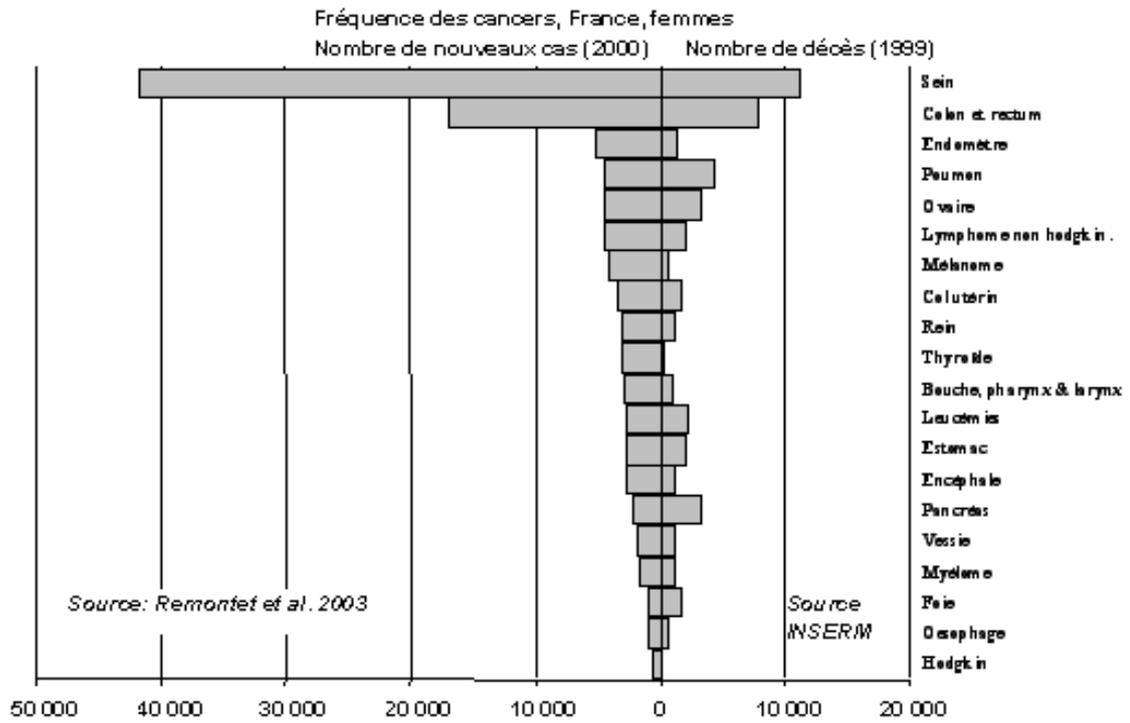
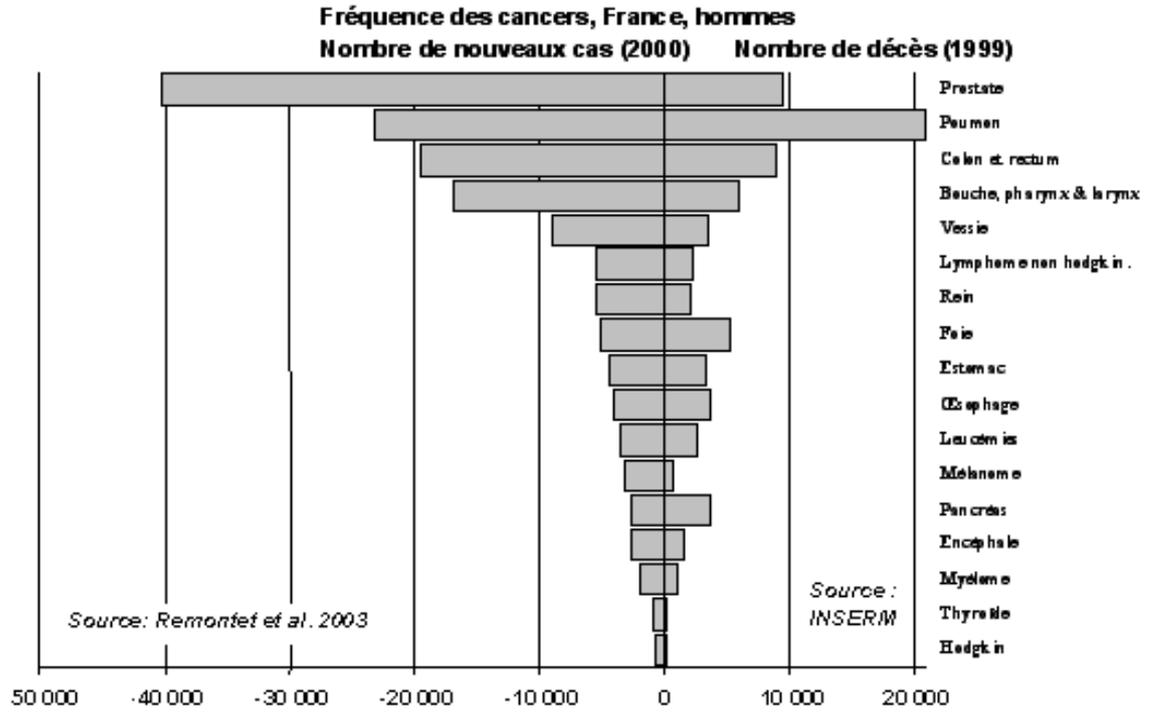


Figure 1 : Etude épidémiologique sur la fréquence des cancers dans la population française. D'après Remontet et al. 2003.

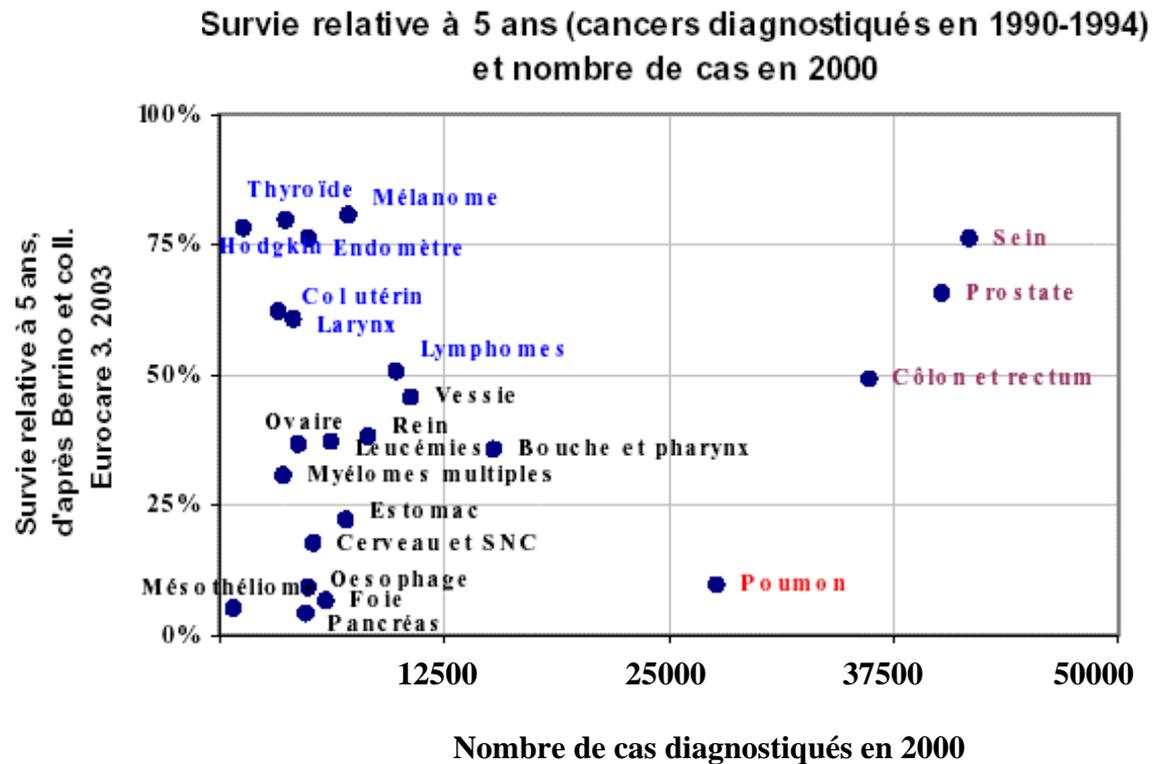


Figure 2 : Taux de survie à 5 ans par cancer en fonction du nombre de cas diagnostiqués. D'après Berrino et al. 2003.

Des travaux récents indiquent que des altérations de l'homéostasie calcique et des modulations des canaux ioniques peuvent être impliquées dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation et l'oncogenèse. Des variations fonctionnelles et/ou de l'expression de ces canaux peuvent conduire au développement de pathologies appelées canalopathies. La localisation tissu-spécifique de ces canaux, ainsi que leur structure variable pourrait permettre de traiter spécifiquement une canalopathie en limitant les effets potentiels sur les autres organes. C'est la raison pour laquelle le ciblage des canaux ioniques d'intérêt offre de grandes opportunités pour les traitements des cancers.

II- Canaux potassiques et prolifération cellulaire

Les canaux potassiques sont impliqués dans le processus prolifératif de nombreux types cellulaires. Un grand nombre de travaux le confirment. D'une part, l'inhibition des canaux potassiques provoque une diminution de la prolifération cellulaire. D'autre part, l'on constate que la surexpression de ces canaux induit une augmentation de la prolifération cellulaire et une

progression tumorale. Par ailleurs, les cellules en prolifération ont un potentiel de membrane plus hyperpolarisé que les cellules différenciées. Enfin, dans de nombreux types cellulaires, les canaux potassiques de type Kca (IK), KV1.1, KV 1.3 et hEAG seraient impliqués dans la progression au sein du cycle cellulaire.

1- Classification des canaux potassiques

Il existe 68 gènes codants pour des canaux potassiques. Selon leurs propriétés électrophysiologiques et leur structure moléculaire, les canaux potassiques ont été classés selon les familles suivantes :

- Les canaux potassiques voltage-dépendants de type Kv (sous-familles *shaker*, *shaw*, *shal*, KCNQ et *éther à go go* (EAG)). Les canaux de type Kv se subdivisent en Kv1, Kv2, Kv3 et Kv4. La sous-famille EAG comprend les canaux de type EAG, ERG (pour « EAG related gene »), *elk* et *BEK*.
- Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{IR}).
- Les canaux potassiques modulés par le pH intracellulaire, les acides gras et l'étirement de la membrane (Task, Trek et Trak).
- Les canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire :
 - BK (« Large conductance potassium channel ») ;
 - SK (« Small conductance potassium channel ») ;
 - IK_{Ca1} (« Intermediate conductance potassium channel »).

Nous nous sommes particulièrement intéressés au canal potassique de type EAG connus pour participer au contrôle de la prolifération cellulaire (Ouadid-Ahidouch et al., 2004; Pardo et al., 1999). Par ailleurs, il a été mis en évidence par Farias et collaborateurs que le canal hEAG est exprimé de préférence dans le cancer du col de l'utérus. Ce canal est absent du col sain, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle (Farias et al., 2004).

2- Canaux potassiques et physiologie cellulaire

a- Importance du potentiel de membrane et des signaux calciques dans la prolifération cellulaire

Les canaux potassiques contrôlent le potentiel de repos. Toute modification du potentiel de membrane aura des conséquences importantes sur la physiologie de la cellule.

Il existe une corrélation claire entre potentiel de membrane et activité mitotique. En effet, les cellules différenciées sont dépolarisées alors que les cellules en division sont hyperpolarisées, comme par exemple les cellules tumorales. Les cellules ayant recours aux facteurs de croissance

et aux hormones pour entrer dans le cycle cellulaire possèdent un potentiel de membrane intermédiaire (Binggeli and Weinstein, 1986). La stimulation mitogène provoque une brève hyperpolarisation en début de phase G1 suivie d'une dépolarisation dans la plupart des cellules. L'hyperpolarisation (qui accroît la force électromotrice du calcium) est nécessaire pour induire une entrée accrue de calcium en phase G1.

De même que la corrélation entre l'activité des canaux potassiques et l'entrée de calcium est démontrée, l'hyperpolarisation favorise les cotransports de nutriments de type secondaires utilisant le sodium.

b- Volume cellulaire et prolifération

Lors de la progression dans le cycle cellulaire, le volume des cellules change continuellement. Il existe, de ce fait, des mécanismes de compensation. Les canaux potassiques et chlorures y participent.

Il a été démontré par l'équipe de J.M. Dubois que les agents mitogènes stimulent la capture de nutriments et induisent le gonflement cellulaire. L'accroissement du volume cellulaire active des protéines kinases régulatrices comme ERK 1 et ERK 2 (Dubois and Rouzaine-Dubois, 2004; Rouzaine-Dubois and Dubois, 1998). Par contre, l'augmentation du volume cellulaire provoque également un phénomène de dilution qui provoque une modification de l'activité enzymatique. Il en résulte une courbe en cloche qui corrèle le volume cellulaire et la prolifération.

Afin de rester dans des volumes physiologiques, les cellules font appel à des systèmes de régulation comme le RVD (« Regulatory Volume Decrease ») : lors de l'augmentation du volume cellulaire, des canaux potassiques, mais aussi au chlore (VRAC « Volume-Regulated Anion Channel ») sont activés. Il en résulte une sortie massive de ces ions et ainsi une sortie d'eau et donc une diminution de volume (Lemonnier et al., 2002a; Lemonnier et al., 2002b). Par ailleurs, l'importance de ces canaux dans le cadre du contrôle du volume cellulaire est souligné par le fait qu'ils sont régulés en fonction du cycle cellulaire (Shen et al., 2000).

En conclusion, les hypothèses actuelles tendent à montrer qu'au cours de la division cellulaire, l'activation des canaux potassiques est transitoire (et est corrélée aux oscillations de concentration intracellulaire en calcium suite à l'activation des canaux SOC) et ne modifie que peu la concentration interne en potassium de la cellule (Kunzelmann, 2005). L'augmentation du volume cellulaire accompagne la prolifération cellulaire. Néanmoins, les liens exacts entre l'activation des canaux potassiques, l'augmentation du volume cellulaire et la prolifération sont peu clairs.

c- Rôle des canaux potassiques dans l'apoptose

Les canaux potassiques sont également activés lors de l'apoptose. Ceci est paradoxal eu égard au rôle des canaux potassiques lors de la prolifération cellulaire. Cependant, lors de l'apoptose, il semblerait que l'activation des canaux potassiques se fasse de manière prolongée. En effet, l'apoptose s'accompagne souvent d'une vidange totale des stocks calciques et d'une augmentation de la concentration intracytoplasmique en calcium (Skryma et al., 2000). Il en résulte un efflux de potassium et une diminution du volume cellulaire. Ceci provoque l'activation de caspases et de nucléases (Wang, 2004) qui vont ainsi propager le signal apoptotique. Lors de l'apoptose, il se produit de nombreuses modifications de concentration ionique intracellulaire. Néanmoins, il a été proposé que ces enzymes soient dépendantes des concentrations intracellulaires en potassium (Johnson and Day, 2000). Le potassium semble donc jouer un rôle clé dans la régulation des processus apoptotiques.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, lors de la prolifération cellulaire, les canaux potassiques sont également activés. HERG, par exemple, favorise l'apoptose induite par H_2O_2 et facilite par ailleurs la prolifération de cellules tumorales (Wang et al., 2002). L'explication de ce paradoxe résiderait dans le fait que l'apoptose est également déclenchée soit par l'activation de récepteurs dits « de mort » par des molécules spécifiques (déclenchement exogène) soit par des perturbations des mitochondries (déclenchement endogène). Ces phénomènes sont des événements précoces d'initiation de l'apoptose et ne se produisent pas lors de la prolifération cellulaire.

Lors de l'apoptose, il semblerait que l'activation des canaux potassiques soit beaucoup plus prononcée que celle qui survient lors de la prolifération cellulaire (Yu and Choi, 2000). Dans ce cas, le volume cellulaire diminue contrairement à l'augmentation de volume enregistré lors de la division cellulaire. De plus, les efflux de potassium lors de l'apoptose sont de loin beaucoup plus importants que ceux se produisant lors de la prolifération de cellules tumorales. Ceci a été mis en évidence par l'équipe de Cidlowski (Hughes et al., 1997). Au final, la concentration en potassium intracellulaire peut descendre à 50 mM voire même en dessous. En parallèle, les auteurs ont enregistré une hausse de la concentration en Na^+ intracellulaire. Lors de la prolifération cellulaire, par contre, les modifications de concentration intracellulaire en potassium sont des oscillations autour d'un niveau de concentration plus élevé (Takagi et al., 1986). Selon ces auteurs, en général, de fortes concentrations en potassium sont enregistrées lors de la prolifération. Cela concorde avec le fait que certaines enzymes nécessitent un taux de K^+ élevé pour fonctionner et induire la division cellulaire. Ces enzymes seraient donc inactives lors de l'apoptose où la concentration en K^+ cytosolique est faible.

3- Rôle des canaux K⁺ dans la prolifération cellulaire.

a- Identification des canaux impliqués

L'identification des canaux potassiques impliqués dans la prolifération cellulaire s'effectue en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques. Néanmoins, leur spécificité n'est pas toujours suffisante. Par ailleurs, leur utilisation à forte concentration peut avoir des effets annexes. La solution actuelle la plus efficace consiste à utiliser des siRNA dirigés contre un canal d'intérêt ou encore de surexprimer ce canal dans un modèle cellulaire afin d'en appréhender les conséquences.

Il est difficile de corrélérer la prolifération cellulaire avec un seul type de canal. Les cellules expriment le plus souvent de nombreux types de canaux potassiques et faire la part de l'implication d'un type de canal vis-à-vis des autres n'est pas évident. Cela ne va pas sans compter également l'expression de canaux dépendante des phases du cycle cellulaire. Au cours des paragraphes qui suivent, j'ai choisi quelques exemples représentatifs des travaux sur ce sujet.

b- K_v

L'impact de ces canaux sur la prolifération cellulaire a essentiellement été étudié sur celle des cellules tumorales et principalement celles d'origine épithéliale (Abdul and Hoosein, 2002b; Abdul and Hoosein, 2002c; Bianchi et al., 1998).

Ces canaux potassiques s'ouvrent lors des dépolarisations de la membrane. Cela se produit au sein des cellules excitables lors de l'émission des potentiels d'action. Dans les cellules non excitables, le phénomène permettant l'ouverture de ces canaux est différent : il faut se référer au « courant de fenêtre » qui existe au sein des cellules cancéreuses notamment. En effet, ces dernières ont un potentiel de repos plus dépolarisé par rapport aux cellules épithéliales différenciées (O'Grady and Lee, 2005; Pardo, 2004).

Néanmoins, peu de choses sont connues sur le potentiel de membrane des cellules normales au sein du tissu sain. En effet, rien n'indique que le potentiel de membrane des cellules normales en culture primaire soit similaire à celui que l'on pourrait mesurer au sein du tissu d'origine. Par exemple, la membrane basolatérale des cellules épithéliales de pancréas exocrine est en relation avec les protéines du sérum. La mesure de leur potentiel de membrane indique qu'elles sont plus dépolarisées que celles qui sont mises en culture. De ce fait, nous ne pouvons affirmer que les canaux potassiques de type K_v ne soient pas activés *in situ* dans des conditions physiologiques.

Enfin, les hormones et les facteurs de croissance modulent l'activité des canaux potassiques. La prolactine augmente la probabilité d'ouverture d'un canal potassique de type K_v, via l'activation de P59^{fn}, dans un lignée de cellule cancéreuse prostatique humaine LNCaP (Van

Coppenolle et al., 2004a). Les hormones et les facteurs de croissance peuvent également induire la surexpression de canaux potassiques : c'est ce que produit l'IGF1 sur des canaux de type Kv au sein des cellules HEK293 (Kunzelmann, 2005).

c- Canaux de type EAG et HERG

La famille des canaux potassique de type EAG (*ether-à-go-go*) a été décrite initialement puis clonée chez *Drosophila melanogaster* (Warmke et al., 1991). Deux des canaux de cette famille sont impliqués dans la prolifération cellulaire : EAG et HERG (« Human EAG-related K⁺ channel »).

L'activité des canaux de type EAG et HERG est modulée au cours du cycle cellulaire chez l'embryon de Xénope (Day et al., 2001). Il ne semble pas que ceci soit un épiphénomène. En effet, ces canaux sont inhibés lors de la transition G2/M, ce qui provoque une dépolarisation de la membrane (Bruggemann et al., 1997). Cette inhibition est induite par la Cycline B et P34^{CDC2}. Par contre, l'activité de ces canaux est plus élevée lors de la transition M/G1. Par ailleurs, il a été démontré que les canaux EAG possèdent des sites consensus pour les MAP kinases (« mitogen-activated protein kinase »), les « mitosis-promoting factors » (MPF).

L'expression des canaux EAG peut être également spécifique d'un tissu donné. Barajas et collaborateurs (Farias et al., 2004) ont mis en évidence par RT-PCR que le canal EAG n'est pas exprimé dans le col de l'utérus sain. Par contre, sa présence est systématique dans les tissus cervicaux cancéreux. Cela corrobore les travaux de Pardo et collaborateurs (Pardo et al., 1999) qui ont mis en évidence le rôle oncogénique de ce canal grâce à l'utilisation de souris nude. L'inhibition de l'expression des canaux EAG au sein des tumeurs réduit considérablement la prolifération cellulaire. A l'inverse, une surexpression des canaux EAG induit un développement tumoral plus important. EAG a par ailleurs été caractérisé dans d'autres types cellulaires comme dans les tumeurs mammaires (il est absent des cellules saines) (Ouadid-Ahidouch et al., 2001) et les neuroblastomes (Meyer and Heinemann, 1998).

Les canaux de type EAG seraient activés en début de cycle cellulaire. La progression des cellules en phase G1 s'accompagne d'une entrée massive de calcium. Cette dernière inhibe EAG, mais active une autre conductance potassique (activée par le calcium) IKCa1 qui a son tour provoque une augmentation du calcium intracellulaire (dans laquelle le canal TRPV6 est impliqué) et une progression du cycle cellulaire en phase G1/S (Article Roudbaraki *et al.*, Soumis). L'activation séquentielle de ces canaux potassiques induirait donc des variations de calcium intracellulaire sous forme d'oscillations.

Les canaux de type HERG sont présents lors de la vie fœtale, essentiellement au niveau cardiaque (Wang and Duff, 1996; Wang et al., 1996; Wang, 2004). Ces canaux disparaissent à l'état adulte au sein des cellules différenciées, mais réapparaissent dans les cellules tumorales (Bhattacharyya et al., 1997; Claycomb et al., 1998; Kabir et al., 2000; Wang et al., 2002; Yang et al., 1997). Cela signifie que les canaux HERG jouent un rôle actif dans la régulation de la prolifération cellulaire.

d- Canaux K⁺ activés par le calcium

Ces canaux sont présents dans un grand nombre de types cellulaires : la prostate (Abdul and Hoosein, 2002a; Parihar et al., 2003; Suzuki and Takimoto, 2004), l'utérus (Suzuki and Takimoto, 2004), les cellules gliales (Basrai et al., 2002), l'estomac (Elso et al., 2004), le pancréas (Jager et al., 2004), l'hypophyse (Czarnecki et al., 2003), le sein (Ouadid-Ahidouch et al., 2004), le colon (Abdul and Hoosein, 2002a; Lastraioli et al., 2004; Yao and Kwan, 1999).

Comme pour les canaux de type EAG, l'expression des canaux potassiques activés par le calcium peut être dépendante du cycle cellulaire. Cela a été clairement démontré pour hIK1 (Ouadid-Ahidouch et al., 2004) au sein des cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7. L'activité de ce canal est augmentée en fin de G1 et en début de phase S. Ce phénomène est dû en partie à un niveau d'ARNm codant pour ce canal plus élevé lors de ces phases du cycle cellulaire. Cela induit un influx de calcium plus important du fait de l'hyperpolarisation de la membrane qui en découle. Les hormones impliquées dans la prolifération et la survie peuvent moduler l'activité de ces canaux. Citons comme exemple l'oestradiol qui active un canal potassique de type BK dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7 (Coiret et al., 2005).

e- Autres canaux potassiques

Il existe un grand nombre de canaux potassiques. Je citerai ici comme exemple les canaux présentant 2 pores en tandem : les « 2P-domain K⁺ Channels ». Ces canaux sont ouverts au potentiel de repos et peuvent de ce fait jouer le rôle de canal de fuite pour le potassium. (Patel and Lazdunski, 2004). L'un de ces canaux, KCNK9 (encore appelé TASK3 pour « TWIK-related acid-sensitive K⁺ Channel ») est surexprimé dans le cas des cancers du sein, de la prostate et du poumon (Mu et al., 2003). Ceci est dû à une amplification génomique. Cela confère à la tumeur des propriétés oncogéniques.

Les canaux sensibles à l'ATP (Canaux K_{ATP}) sont présents dans les cultures primaires d'hépatocytes et de foie de rat (Malhi et al., 2000) et accroissent la prolifération cellulaire. Cette étude ne montre pas de modulation des flux calciques par ces canaux.

4- Applications cliniques ?

La première question à se poser quant aux applications cliniques potentielles : faut-il inhiber les canaux potassiques afin de bloquer la prolifération cellulaire ou est-il préférable d'activer ces canaux dans le but d'induire l'apoptose ?

Il existe malheureusement encore de nombreuses lacunes pour répondre à cette question. Nous connaissons finalement peu de choses sur le fonctionnement et le rôle de ces canaux *in situ*, dans la tumeur. Par ailleurs, nous ne possédons pas encore d'inhibiteurs pharmacologiques suffisamment spécifiques (traversant la barrière hémato-encéphalique ou non) pour ne bloquer que le canal potassique qui serait surexprimé au sein d'une tumeur donnée et ne pas induire d'effets secondaires sur un autre organe (notamment au niveau cardiaque). La solution réside peut-être dans l'injection de siRNA qui donne de bons résultats *in vivo* sur la souris. Ainsi, nous pourrions mettre en évidence quel canal pourrait être utilisable sans effets secondaires chez l'homme (ce pourrait être le cas de hEAG par exemple). Néanmoins de nombreuses autres études seront nécessaires pour y parvenir.

5- Conclusion

Au cours de la transformation d'un épithélium normal vers le cancer, un grand nombre d'altérations peuvent survenir et affecter notamment leur expression ou leur activité. Ces modifications peuvent conduire au développement d'une tumeur. Il n'est pas encore très clair à quel stade de développement du cancer ces modifications apparaissent et quels sont les canaux exprimés différemment entre les tissus sains et les tissus cancéreux. Ce processus peut impliquer les canaux potassiques, mais également les canaux calciques.

Comme nous venons de le voir, les canaux potassiques jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Cependant, notre attention s'est également portée d'une part sur des canaux calciques de type SOC (pour « Store Operated Channels ») activés suite à la vidange des réserves calciques intracellulaires et d'autre part, sur les canaux de fuite calcique du réticulum endoplasmique.

Les canaux potassiques contrôlent le potentiel de membrane, mais ils modulent également l'influx de calcium via les canaux SOC. En effet, les canaux de type SOC constituent la voie majeure d'entrée de calcium dans les cellules non excitables. L'activation des canaux potassiques

hyperpolarise la membrane plasmique, ce qui a pour conséquence d'augmenter la force électromotrice pour le calcium et donc son entrée dans la cellule.

III- Régulation de la concentration calcique luminale et cytosolique

1- Le calcium : second messenger ubiquitaire

L'ion calcium est considéré comme un second messenger ubiquitaire utilisé par tous les types cellulaires. C'est un facteur essentiel impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Pour cela les signaux calciques sont régulés de nombreuses façons afin d'opérer un large spectre de fonctions physiologiques aussi diverses que l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la fécondation et la sécrétion (Berridge, 1995; Nicotera and Rossi, 1994), les signaux calciques ont une provenance, une fréquence, une amplitude et une étendue qui sont autant de paramètres qui permettent d'affiner le signal afin de lui donner une spécificité : on parle alors de « signature calcique ».

Comme l'illustre la figure 3, à tout moment la concentration en calcium dans le cytoplasme est déterminée par une balance entre un « état activé » et un « état de repos » (Berridge et al., 2003).

Ainsi, lors de « l'état activé » les stimuli peuvent provoquer à la fois une entrée de calcium provenant du milieu externe, ou la production de seconds messagers capables de provoquer la vidange du calcium contenu dans les organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique de la cellule (ce qui provoque une hausse de la concentration de calcium dans le cytoplasme). Une grande majorité de ce calcium sera liée aux tampons intracellulaires, alors que le reste interagira avec des effecteurs qui activeront différents processus cellulaires dans une gamme de temps assez large. Prenons par exemple une jonction synaptique. Le calcium peut induire l'exocytose en quelques microsecondes, alors que ce même calcium doit interagir pendant quelques minutes à des heures afin d'engendrer des effets tels que la transcription génique ou la prolifération cellulaire (Berridge et al., 2000; Carafoli et al., 2001).

Par la suite, lors du retour à « l'état de repos », le calcium est libéré des effecteurs et des tampons. La concentration de calcium dans le cytoplasme est de retour au niveau basal par l'action combinée de pompes et d'échangeurs.

Il est également important de noter qu'une surcharge en calcium dans le cytoplasme ou dans les mitochondries pendant un temps prolongé peut avoir des conséquences délétères pour la cellule et donc conduire à des processus apoptotiques.

Ainsi, la survie cellulaire dépend de l'homéostasie calcique. Pour cela, il est important de connaître les différents canaux ioniques et transporteurs présents sur la membrane plasmique ou sur la membrane du Réticulum Endoplasmique (RE) (principale réserve calcique de la cellule).

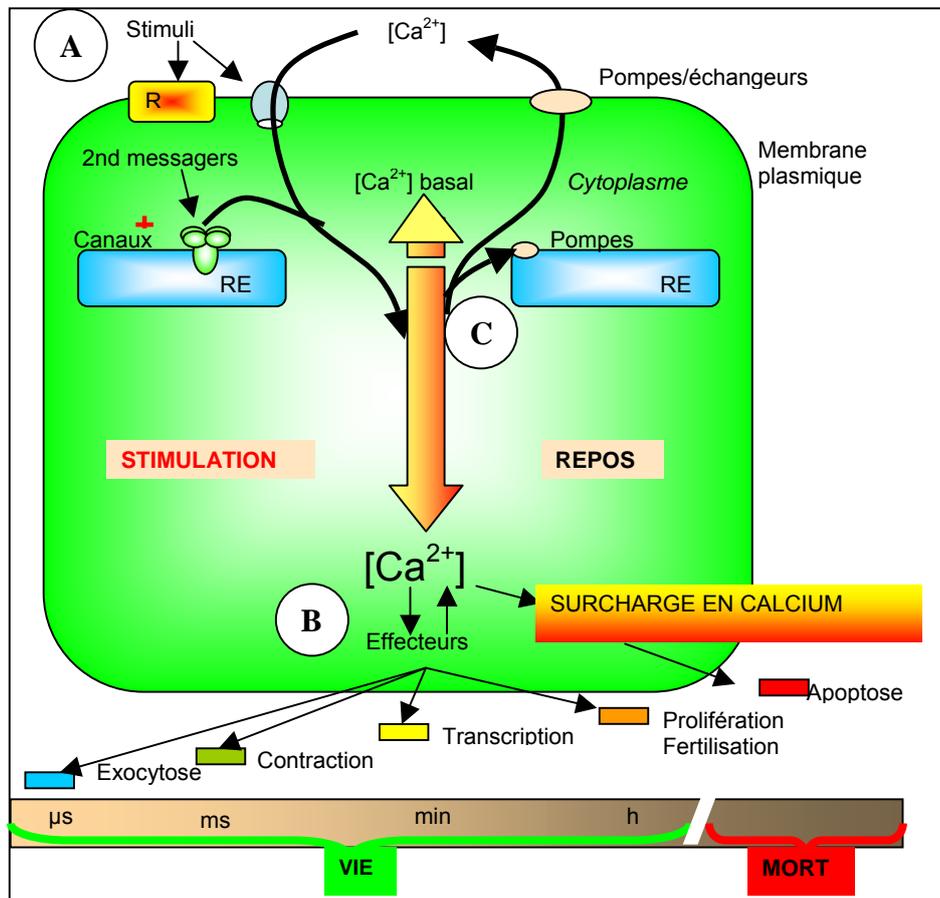


Figure 3 : Représentation schématique de la signalisation calcique. (A) : entrée de calcium ou production de seconds messagers qui provoquent la libération du calcium contenu dans les stocks intracellulaires ; (B) : Variété de processus physiologiques induits par le calcium ; (C) : retour à l'état de repos grâce à l'action combinée de pompes et d'échangeurs. (Berridge et al., 2003)

2- Homéostasie calcique

a- Canaux et pompes présents au niveau de la membrane plasmique (figure 4)

1. Les canaux VOC (Voltage Operated Channel) sont présents essentiellement sur les cellules excitables. Ils sont activés par une variation du potentiel membranaire.
2. Les canaux ROC (Receptor Operated Channel) sont présents essentiellement sur les cellules non excitables. Ils sont activés par la fixation d'un ligand spécifique.
3. Les canaux SOC (Store Operated Channel) sont activés lors de la déplétion des stocks calciques.

4. Les pompes calciques PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase) sont ubiquitaires et permettent de faire sortir le calcium de la cellule.
5. Les échangeurs comme l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui fait sortir le calcium de la cellule et assure le maintien du gradient électrochimique de cet ion.

b- Canaux et pompes présents au niveau du réticulum endoplasmique

1. Les récepteurs IP_3 (IP_3R) sont activés par la fixation de l'Inositol tri Phosphate.
2. Les récepteurs à la ryanodine (Ryr) sont activés par le calcium et l'ADP ribose cyclique.
3. Le récepteur au NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate) qui libère du calcium suite à la formation de ce ligand.
4. Les pompes calciques : SERCA (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) sont chargées de faire rentrer le calcium dans le RE.
5. Certains canaux TRP comme TRPM8 qui sont présents à la fois sur la membrane plasmique, mais également sur celle du RE.
6. Les pannexines dont la structure est proche de celle des connexines et qui peuvent former des canaux perméables au calcium au sein du RE (Vanden Abeele et al., 2006).
7. Les présénilines, protéines transmembranaires du RE peuvent également jouer le rôle de canal perméable au calcium (Tu et al., 2006).
8. Les canaux de fuite : terme générique définissant les canaux laissant sortir passivement le calcium du RE. Les mécanismes cellulaires responsables de cette fuite ainsi que la nature moléculaire de ces canaux sont inconnus à ce jour.

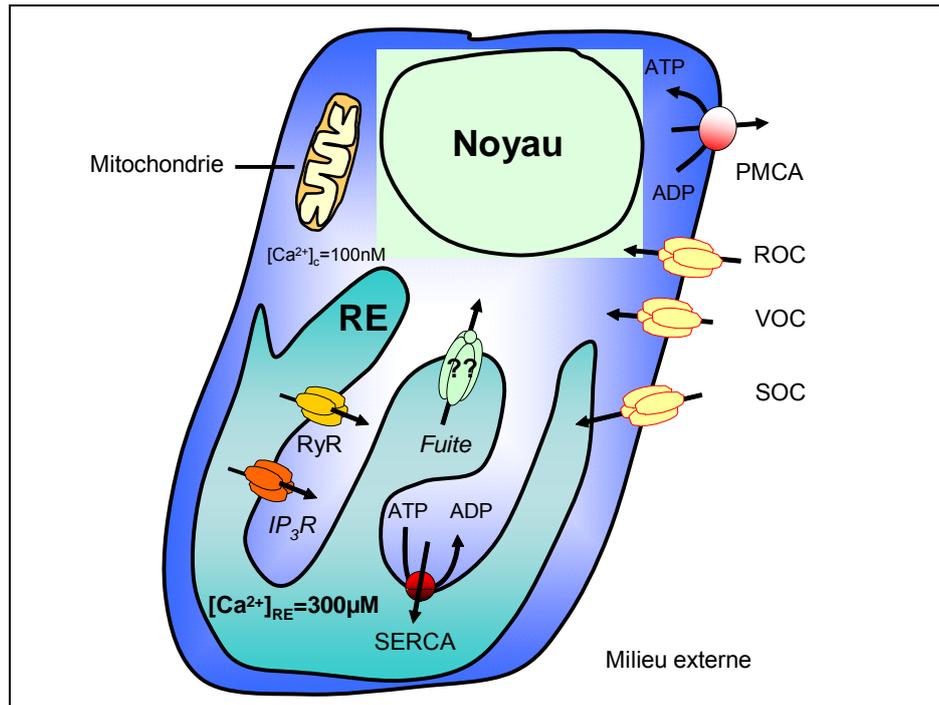


Figure 4 : Principaux canaux et pompes calciques présents dans une cellule animale.

Ainsi, dans le cytoplasme de la cellule on trouve des organites qui capables de stocker du calcium à une concentration très importante. Ceci est particulièrement vrai pour le réticulum endoplasmique (RE) qui représente la principale source de calcium mobilisable. Le RE est donc un acteur très important pour la régulation de la signalisation calcique : le calcium mobilisé à partir du RE est à la base de nombreux processus physiologiques comme l'apoptose, la prolifération ou la sécrétion. En effet, des études réalisées au sein du laboratoire ont démontré qu'une baisse de la concentration de calcium dans le RE est associée aux phénomènes de résistance apoptotique des cellules cancéreuses prostatiques humaines (Vanden Abeele et al., 2002; Vanoverberghe et al., 2004). De plus, il a été démontré que l'induction de la fuite passive de calcium ainsi que l'activation des canaux calciques de type SOC, grâce à des substances pharmacologiques telles que la thapsigargine, peut induire l'apoptose de ces mêmes cellules (Skryma et al., 2000).

La lumière du RE est également un environnement parfaitement adapté pour la synthèse protéique, les modifications post-traductionnelles et la maturation des protéines. C'est pourquoi l'homéostasie calcique du RE est finement régulée. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette régulation :

- a) **La libération provoquée de calcium** à partir du RE après production de second messenger tels que l' IP_3 , l'ADP ribose cyclique, le calcium et le NAADP.
- b) **La capture du calcium dans le RE** grâce aux pompes calciques de type SERCA.

c) **La fixation du calcium** au sein du réticulum par des protéines chaperonnes telles que la calréticuline et la calnexine.

d) **La fuite passive de calcium** qui contrebalance l'influx créé par les pompes permettant ainsi d'équilibrer les concentrations en calcium intra réticulaire.

Cependant si la connaissance des pompes calciques, des récepteurs IP₃, ainsi que celle des récepteurs à la ryanodine est de plus en plus étendue (régulation par le calcium, la modulation, la nature moléculaire ainsi que le rôle physiologique), celle des canaux calciques de fuite est beaucoup moins vaste. Dans le paragraphe suivant nous discuterons de l'état des connaissances sur la fuite passive de calcium à partir du RE.

c- Mitochondries, appareil de Golgi et noyau

Les mitochondries, l'appareil de Golgi et le noyau participent également au contrôle de la concentration en calcium intracellulaire (Campanella et al., 2004; Gerasimenko et al., 2003; Petersen et al., 1998; Rizzuto et al., 1999; Robert et al., 2000; Tinel et al., 1999). Néanmoins, le but de mon propos n'est pas d'en faire le détail ici.

3- Fuite de calcium à partir des stocks intracellulaires : une énigme de la signalisation calcique

La fuite passive de calcium est le mécanisme le plus énigmatique intervenant dans la régulation de l'homéostasie calcique. La nature moléculaire de cette fuite est encore inconnue. C'est un mécanisme lent, facilement masqué par des seconds messagers induisant un relargage de calcium beaucoup plus rapidement, ce qui rend cette fuite difficile à étudier. Ceci explique la faible étendue des données la concernant. Cependant, au cours du temps, des données se sont lentement accumulées.

a) **La fuite passive n'est pas affectée par l'inhibition des RyR par le rouge de ruthénium et des IP₃R par l'héparine.** La fuite passive de calcium ne transite donc pas *via* les récepteurs IP₃ et les RyR (Missiaen et al., 1996). De même, l'inhibition de la réponse au NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate) n'a aucun effet sur le taux basal de la fuite passive (Lomax et al., 2002). Comme l'illustre la *figure 5*, il existe deux types de mobilisation de calcium à partir du RE : la libération provoquée de calcium et la fuite calcique passive. Pour la libération de calcium provoquée, la fixation d'un ligand sur des récepteurs spécifiques se trouvant sur la membrane plasmique provoque la formation de second messenger tel que l'IP₃. Celui-ci se fixe sur des récepteurs se trouvant sur la membrane du RE : on observe alors une vidange du RE activée par un ligand spécifique. Une variation de conformation des récepteurs

IP_3 due à leur activation entraîne l'entrée de calcium dans le cytoplasme par l'intermédiaire des canaux calciques de type SOC (Vanden Abeele et al., 2004).

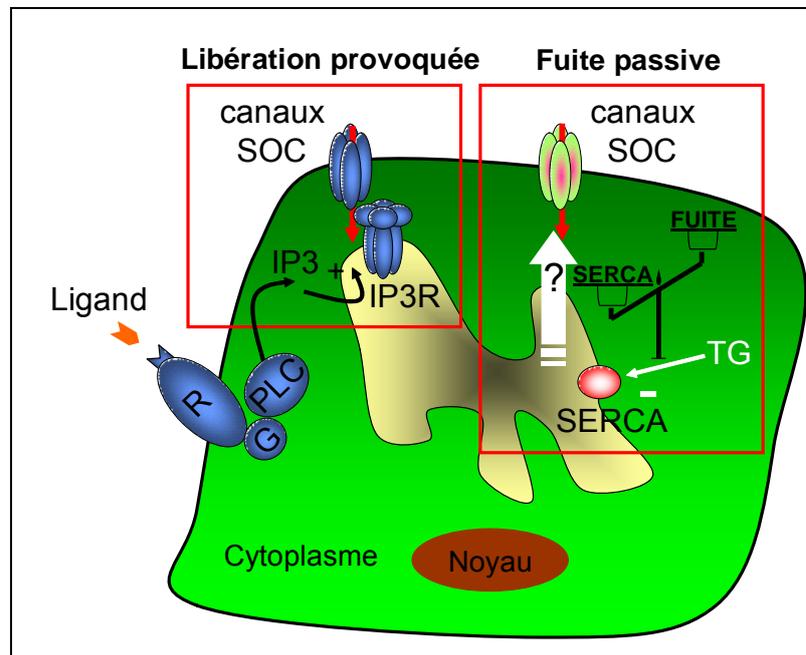


Figure 5 : Comparaison de la libération provoquée de calcium et de la fuite de calcium passive à partir du RE.

b) **En parallèle, il existe la fuite calcique passive. A l'état de base, le calcium contenu dans le RE est le fruit d'un équilibre entre l'entrée de calcium par les pompes calciques de type SERCA et une fuite passive de base au travers des canaux de fuite.** Actuellement, la seule technique utilisée pour observer la fuite de calcium du réticulum endoplasmique est l'utilisation d'inhibiteurs des pompes calciques (SERCA) tels que la thapsigargin. On observe alors une lente diminution du calcium libre dans le réticulum. Cette vidange du réticulum provoque l'activation des canaux calciques de type SOC, qui se trouvent sur la membrane plasmique, chargés de remplir le RE en calcium (la nature de ces canaux SOC est différente celle des canaux SOC activés par l' IP_3) (Vanden Abeele et al., 2003). Cependant actuellement, même s'il est évident que la fuite passive de calcium existe, on ignore totalement dans quelles conditions physiologiques elle a lieu, ou par quels canaux elle transite et comment se fait l'activation des canaux calciques de type SOC (sensibles à un déséquilibre entre l'entrée du calcium par les pompes et la fuite passive). La caractérisation moléculaire de ces canaux de fuite ainsi que les conditions physiologiques permettant cette fuite passive est primordiale pour comprendre la régulation fine de la concentration en calcium réticulaire.

c) De plus, il est important de noter que la thapsigargine est l'outil pharmacologique le plus couramment utilisé pour l'étude de la fuite calcique. Comme précisé précédemment, la thapsigargine est connue d'une part pour induire la vidange du calcium contenu dans le RE et d'autre part pour activer les canaux calciques de type SOC, conduisant ainsi à l'induction de l'apoptose. Pour ces raisons, cette molécule a fait l'objet d'essais cliniques en vue de mettre au point de nouveaux traitements contre le cancer de la prostate (Denmeade et al., 2003). Cependant, le mécanisme d'action par lequel la thapsigargine induit la fuite passive de calcium restait inconnu. Il était donc important de tenter d'apporter des réponses à ces questions.

4- Rôle du translocon dans la fuite de calcium du RE

J'avais entamé l'étude du rôle du translocon dans la fuite calcique à Liverpool lors de mon stage post-doctoral. J'ai poursuivi ces travaux au sein du laboratoire de Physiologie Cellulaire de Villeneuve d'Ascq. Le translocon est un complexe de plusieurs protéines. Les sous-unités SEC 61 α , β et γ forment le pore du canal. D'autres protéines sont associées à ces sous-unités comme TRAM et Sec 63p. Les sous-unités ribosomales viennent se lier au translocon. La synthèse protéique peut alors débuter. La chaîne peptidique néosynthétisée « descend » dans la lumière du RE (Figure 6).

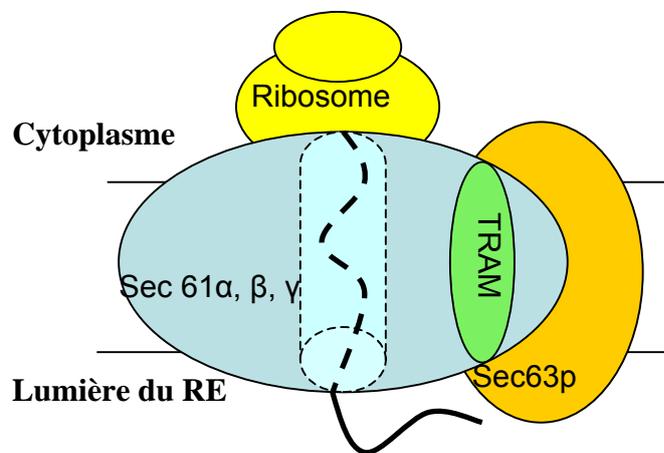


Figure 6: Représentation schématique du translocon. Le complexe du translocon a été isolé pour la première fois chez la levure. Il est constitué d'un hétérotrimère associé aux protéines TRAM.

Le translocon est un bon candidat pour être un canal de fuite pour les raisons suivantes :

- le translocon possède le pore le plus large présent sur la membrane du RE : 4-6 nm lorsque le ribosome s'y fixe et 0.9-1.5 nm en absence de ribosome (Hamman et al., 1997);

- l'équipe de Wonderlin a mis en évidence que de petites molécules polarisées pouvaient traverser le translocon (Heritage and Wonderlin, 2001; Roy and Wonderlin, 2003). Il est donc logique de penser que le calcium puisse également traverser le canal formé par le translocon ;
- par ailleurs, il a été démontré que le translocon pouvait s'ouvrir de manière spontanée, pouvant provoquer ainsi une fuite massive de calcium (Simon and Blobel, 1991).

A la vue de ces données, il était logique de penser que le translocon puisse jouer le rôle d'un canal de fuite. C'est ce que nous avons démontré au cours de notre travail (Flourakis et al., 2006; Van Coppenolle et al., 2004b).

5- Conclusion

Comme ces dernières pages le résument, la régulation de la concentration en calcium cytosolique et lumenale est capitale pour la physiologie de la cellule. Nos connaissances sur les canaux calciques de la membrane plasmique s'étoffent de jour en jour. Les canaux calciques intracellulaires (par essence plus difficiles d'accès) sont moins bien caractérisés si l'on excepte les récepteurs à l' IP_3 ou à l'ADPRc. Les études sur les canaux de fuite (dite « non induite ») sont par contre plus restreintes. Cependant, ces canaux jouent un rôle capital dans la physiologie de la cellule et méritent toute notre attention.

RESULTATS

Chapitre 1

Implication des canaux potassiques dans le contrôle de la prolifération cellulaire des cancéreuses prostatiques.

Modulation par la prolactine.

Article 1

Skryma R., **Van Coppenolle F.**, Dufy-Barbe L., Dufy B., Prevarskaya N.

Characterisation of Ca²⁺-inhibited potassium channels excised patches of cells from human prostate cancer cell line LNCaP.

Receptors and Channels, 1999, **6** : 241-253

Article 2

Rybalchenko V., Prevarskaya N., **Van Coppenolle F.**, Legrand G., Lemonnier L.,
Le Bourhis X., Skryma R.

Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing K⁺ channel gating.

Mol. Pharmacol., 2001, **59(6)**: 1376-87

I- Position du problème :

Comme décrit dans l'introduction, le cancer de la prostate est androgéno-dépendant dans un premier temps. A ce stade, le traitement le plus efficace réside dans l'hormonothérapie qui a pour but de diminuer le taux d'androgènes dans le sang. Les tumeurs régressent, mais malheureusement, avec le temps, le cancer de la prostate devient androgéno-indépendant. L'hormonothérapie est alors inefficace. Il est donc nécessaire de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'inhibition des canaux potassiques des cellules LNCaP conduit à une diminution de la prolifération cellulaire. Nous nous sommes intéressés par la suite au mode d'action du vérapamil sur le canal potassique. En effet, le vérapamil inhibe la prolifération cellulaire, mais les mécanismes responsables de ce phénomène restent inconnus. Cette molécule possède les propriétés d'inhiber les phénomènes de « Multi Drug Resistance » (MDR) (Theyer et al., 1993) ; de bloquer les canaux calciques de type L et d'inhiber les canaux potassiques (Yao and Kwan, 1999). Les cellules LNCaP n'expriment pas de canaux calciques dans des conditions classiques de culture. Par ailleurs, l'équipe de Theyer (Theyer et al., 1993) a démontré que les cellules

LNCaP n'expriment pas la p-glycoprotéine responsable du mécanisme de MDR. En conclusion, cette lignée cellulaire est un excellent modèle d'étude des effets antiprolifératifs du vérapamil sur les canaux potassiques (article 2).

II- Résultats et conclusion :

Dans l'article 1, nous avons mis en évidence, grâce à la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière » ainsi qu'en « Inside-out », que la conductance unitaire de ce canal potassique est de 78 pS. La probabilité d'ouverture de ce canal est inhibée par l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Le courant est inhibé par le calcium. Des études de biologie moléculaire sont indispensables pour identifier plus précisément la nature des canaux impliqués.

L'article 2 poursuit l'étude démarrée dans l'article 1. Nous nous sommes intéressés ici aux liens entre la prolifération cellulaire et l'inhibition du canal potassique. Nous avons principalement étudié le mode de fonctionnement du vérapamil et du TEA. L'effet de ces inhibiteurs sur la prolifération cellulaire n'est pas cumulatif. Cela implique que ces deux molécules partagent une voie commune menant à l'inhibition de la prolifération des cellules LNCaP. Néanmoins, nous avons mis en évidence que le TEA (1 mM) diminue la conductance unitaire du canal potassique. Par contre, le vérapamil (10 μ M) réduit la probabilité d'ouverture du canal potassique. En utilisant un analogue non perméant du vérapamil, le N-méthyl-vérapamil, nous avons démontré que le site d'action de cet inhibiteur se trouve, dans les cellules LNCaP, sur la face interne de la membrane. En effet, le N-méthyl-vérapamil n'a pas d'effets lorsqu'il est ajouté dans le milieu extracellulaire en configuration cellule entière. Par contre, cette molécule inhibe le courant potassique quand elle est ajoutée au milieu intrapipette.

Article 3

Ouadid-Ahidouch H., **Van Coppenolle F.**, Le Bourhis X., Belhaj A., Prevarskaya N.

Potassium channels in rat prostate epithelial cells.

Febs Letters, 1999, **459** : 15-21

I- Position du problème :

Dans cet article, nous nous sommes attachés à caractériser les canaux potassiques des cellules prostatiques normales. Pour cela, nous avons eu recours à la prostate de rat. En effet, l'obtention de cellules prostatiques humaines normales se heurte aux difficultés suivantes. Dès la puberté, la prostate humaine augmente de volume. A ce stade, nous ne pouvons plus qualifier la prostate de normale. Sans être cancéreuse, la prostate devient hyperplasique. Nous rencontrons le même problème lors d'un cancer de la vessie. L'exérèse de la vessie s'accompagne du retrait d'une partie de la prostate. Les cellules que nous pourrions utiliser dans ce cas sont donc issues d'une prostate hyperplasique et non d'une prostate normale vu l'âge des patients opérés.

Il existe maintenant des lignées de prostate « normales » obtenues après immortalisation. Néanmoins, le phénotype de ces cellules est nettement éloigné de celui d'une cellule prostatique saine.

Nous avons donc opté pour des cultures primaires de cellules de prostate de rat faciles à obtenir. La prostate de rat est composée de trois lobes principaux. Deux lobes ventraux, deux lobes latéraux et un lobe dorsal. Les lobes latéraux et dorsaux possèdent la même structure histologique que la prostate humaine contrairement aux lobes ventraux (Robinette, 1988). C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé cette étude sur des cultures primaires de lobes prostatiques latéraux et dorsaux.

II- Résultats :

Ces cultures primaires sont composées essentiellement de cellules épithéliales. La caractérisation immunocytochimique des différents types cellulaires indique l'existence de trois populations : épithéliales (positives à la pan-cytokératine) ; myoépithéliales (positives à l' α -actine) et fibroblastes (positifs à la vimentine). Les anticorps utilisés sont spécifiques des ces types cellulaires. Grâce à la technique de patch-clamp en configuration cellule entière, nous avons pu, pour la première fois, mettre en évidence la présence de canaux K^+ dépendants du

voltage, de type Kv1.3, dans les cellules épithéliales des prostates latérales et dorsales. Ces canaux sont impliqués dans la régulation du potentiel de membrane puisque leur inhibition provoque une variation de potentiel de repos. De plus, une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire se traduit par une diminution du courant macroscopique potassique.

Article 4

Van Coppenolle F., Le Bourhis X., Carpentier F., Delaby G., Cousse H., Raynaud J-P., Dupouy J.-P., Prevarskaya N.

Pharmacological effect of the lipido-stérolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) on rat prostate hyperplasia. Comparison with Finasteride.

The Prostate, 2000, **43(1)**: 49-58

Article 5

Van Coppenolle F., Slomianny C., Carpentier F., Le Bourhis X., Ahidouch A., Croix D., Legrand G., Dewailly E., Fournier S., Cousse H., Authié D., Raynaud J-P., Beauvillain J-C., Dupouy J-P., Prevarskaya N.

Effects of hyperprolactinemia on prostate growth: evidence of androgeno-dependence.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2001, **280(1)**: E120-9

Article 6

Van Coppenolle F., Skryma R., Ouadid-Ahidouch H., Slomianny C., Roudbaraki M., Delcourt P., Dewailly E., Humez S., Crepin A., Gourdou I., Djiane J., Bonnal J-L., Mauroy B. And Prevarskaya N.

Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation.

Biochem J. 2004. **377**, 569-78

I- Position du problème :

L'article 6 fait suite à 2 articles précédents mettant en évidence le rôle *in vivo* de la prolactine dans la croissance de la prostate de rat (Van Coppenolle et al., 2000; Van Coppenolle et al., 2001). Les articles 4 et 5 ont été réalisés en collaboration étroite avec le Département d'Urologie de l'entreprise Pierre Fabre Médicaments. Nous avons mis en évidence, *in vivo*, chez le rat, que la prolactine provoque une hyperplasie bénigne de la prostate latérale accompagnée d'une surexpression de Bcl-2. Cet effet peut être inhibé par l'extrait lipidostérolique de *Serenoa repens* employé en clinique pour traiter les cancers et les hyperplasies bénignes.

L'hormonothérapie visant à traiter le cancer de la prostate se base sur une diminution du taux d'androgènes circulants. Or, chez l'homme (comme chez le rat), la concentration plasmatique en androgènes diminue avec l'âge. A l'inverse, la concentration en prolactine sanguine augmente (de même que les pathologies liées à la prostate...) (Abrahamsson et al., 1986). Par ailleurs, les cellules épithéliales prostatiques humaines possèdent la forme longue du récepteur de la prolactine (Nevalainen et al., 1997b). De plus, l'équipe de Harkonen a mis en évidence que les cellules épithéliales prostatiques sécrètent de la prolactine dans la lumière des acini. Les récepteurs à la prolactine se situent principalement sur la face apicale des cellules épithéliales jointives par des jonctions serrées (Nevalainen et al., 1997a). La prolactine aurait donc une action autocrine et/ou paracrine sur le développement de la prostate. Il était par conséquent logique que cette hormone puisse avoir un effet sur la croissance de la prostate.

Actuellement, 3 types de R-PRL ont été caractérisés chez le rat : une forme courte (291 acides aminés) (Boutin et al., 1989), une forme longue (519 acides aminés) (Shirota et al., 1990) et une forme intermédiaire (393 acides aminés) (Ali et al., 1991). La forme intermédiaire a été mise en évidence uniquement dans la lignée Nb2 issue d'un lymphome de rat. Ces récepteurs se distinguent par la longueur de leur région cytoplasmique. Les domaines extracellulaires et transmembranaires sont identiques.

L'homodimérisation de la forme longue et intermédiaire du R-PRL se produit lors de la fixation de la PRL et entraîne l'activation de deux tyrosine kinases P120^{jak2} et P59^{fyn} (Rui et al., 1994). JAK2 phosphoryle probablement le récepteur. Il s'ensuit la phosphorylation du facteur de transcription Stat 5 (Sorin et al., 1998). Cette molécule forme ensuite un homodimère qui se fixe sur des régions spécifiques de l'ADN et régule la transcription des gènes. La région extracellulaire du R-PRL possède une séquence conservée Trp-Ser-X-Trp-Ser qui pourrait agir

dans les interactions récepteur/récepteur ou hormone/récepteur. La région box1 contient un domaine permettant l'interaction entre le R-PRL et JAK2 (Bole-Feysot et al., 1998) Box2 est indispensable pour l'activation de Stat 5.

La phosphorylation de la forme courte du R-PRL ne peut physiquement pas se produire (Lebrun et al., 1995). Néanmoins, des études sur des cellules NIH 3T3 indiquent que la forme courte du R-PRL est capable d'induire la division cellulaire (Das and Vonderhaar, 1995).

Parmi ces voies de transduction, l'un des éléments précoces est l'activation des canaux potassiques (Prevarskaya et al., 1994; Prevarskaya et al., 1995). Sachant d'une part que l'inhibition des canaux potassiques des cellules cancéreuses prostatiques humaines provoque un arrêt de la prolifération cellulaire et que d'autre part la prolactine induit la croissance de la prostate, qu'en est-il des effets éventuels de la prolactine sur les canaux potassiques. La prolactine agit-elle sur les canaux potassiques ou emprunte-t-elle une ou plusieurs voies différentes ? Nous avons utilisé les cellules LNCaP comme modèle d'étude. En effet, les canaux potassiques de ces cellules avaient préalablement été caractérisés (Skryma et al., 1999).

II- Résultats :

Nous avons ainsi démontré, qu'une hyperprolactinémie provoque une hyperplasie localisée spécifiquement au sein du lobe latéral de la prostate de rat. Comme indiqué dans le paragraphe précédent, nous avons mis en évidence également que l'hyperprolactinémie induit une surexpression de Bcl-2 dans les cellules épithéliales apicales. La prolactine pourrait donc avoir une action anti-apoptotique.

Les cellules LNCaP expriment la forme longue du récepteur de la prolactine. Nous n'avons pas détecté de modifications de la concentration en calcium cytosolique.

Nous avons néanmoins démontré que la prolactine accroît l'amplitude du courant potassique des cellules LNCaP à des concentrations physiologiques en augmentant la probabilité d'ouverture des canaux potassiques. Cette stimulation se fait par l'intermédiaire de P59^{fyn}. La prolactine stimule la prolifération cellulaire, mais n'a plus d'effets significatifs après l'inhibition des canaux potassiques.

En conclusion, nous avons démontré que la prolactine, en se fixant sur son récepteur, provoque l'activation de P59^{fyn} qui ira phosphoryler les canaux potassiques des cellules LNCaP et ainsi augmenter leur probabilité d'ouverture. Il en résulte une augmentation de la prolifération cellulaire.

La prolactine, son récepteur et ses voies de transduction sont donc des cibles potentielles pour traiter les cancers et les hyperplasies bénignes de la prostate. Suite à ces travaux, deux protocoles

d'étude cliniques ont été rédigés et acceptés en ce sens. Leur coordination est réalisée par le Professeur Brigitte Mauroy (Service d'Urologie, Hôpital Saint Philibert).

Conclusion Chapitre I

Ces travaux nous ont permis de caractériser et de mettre en évidence le rôle des canaux potassiques dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Nous avons utilisé principalement les cellules LNCaP comme modèle d'étude.

L'inhibition des canaux potassiques conduit à une diminution de la prolifération cellulaire. D'autres travaux intéressants et prometteurs sont en cours au sein du laboratoire. Ils sont menés principalement par Morad Roudbaraki et Pascal Mariot. Morad a mis en évidence une surexpression spécifique de canaux de type hEAG dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. La surexpression de ce canal dans un tissu cancéreux a déjà été mise en évidence dans le cadre du cancer du col de l'utérus (Farias et al., 2004). Cette surexpression est absente dans la prostate saine et les hyperplasies. Cela fait de ce canal une cible thérapeutique potentielle pour tenter de bloquer spécifiquement la prolifération des cellules cancéreuses. Je n'irai pas plus loin dans ces explications car je laisse le soin aux principaux acteurs de ce projet de le développer.

Nos travaux impliquant la prolactine dans le développement de la prostate ont permis de lancer deux protocoles d'étude clinique en collaboration avec le Service d'Urologie du CH de Roubaix, dirigé par le Professeur Brigitte Mauroy. La première étude a débuté en 2000 et s'intitule « Etude de l'action d'un agoniste dopaminergique dans le traitement des adénocarcinomes de la prostate ». La deuxième étude porte sur l'« Efficacité d'un traitement antiprolactinique sur la rétention aiguë d'urines secondaire à une hyperplasie bénigne de la prostate chez l'homme ». Une fiche d'information destinée aux patients a été créée et une fiche de consentement éclairé signée est demandée. La coordinatrice de ce projet est le Professeur Mauroy (actuellement Directrice du Service d'Urologie de l'hôpital Saint Philibert à Lomme).

Les deux protocoles cliniques se basent sur le fait que la dopamine régule négativement la sécrétion de prolactine hypophysaire. Lors de nos travaux *in vivo*, nous avons utilisé notamment du sulpiride, un antagoniste dopaminergique pour induire une hyperprolactinémie. Dans ces deux études, chez l'homme, nous avons appliqué bien sûr un protocole inverse. Les patients reçoivent, en plus de thérapies antiandrogéniques classiques, un agoniste dopaminergique, la cabergoline (ou un placebo), afin de réduire le taux de prolactine sanguine. Une telle molécule est d'ores et déjà utilisée pour traiter avec succès les cas d'aménorrhée sans effets secondaires notables. Le problème majeur rencontré dans ces deux protocoles réside dans le fait que les critères d'inclusion sont drastiques, ce qui limite fortement le nombre de patients pouvant en bénéficier.

A l'avenir, ce genre de protocole devrait se faire de manière multicentrique pour augmenter le nombre de patients traités.

Chapitre 2

2.1

**Etat des stocks calciques et apoptose des cellules cancéreuses
prostatiques.**

Article 7

Skryma R., Mariot P., **Van Coppenolle F.**, Shuba Y., Legrand G., Humez S.,
Le Bourhis X., Boilly B., Prevarskaya N.

**Store-depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate
cancer cells LNCaP : Involvement in apoptosis.**

2000. J. Physiol. (London). **527**: 71-83

I- Position du problème :

Le développement lent du cancer de la prostate serait dû à une augmentation de la prolifération cellulaire, mais serait surtout le fait d'une diminution de l'apoptose rompant l'homéostasie cellulaire de l'organe (Bruyninx et al., 1999). Ceci est d'autant plus flagrant dans les cancers de la prostate hormono-indépendants. Normalement, l'absence d'androgènes conduit à l'apoptose des cellules prostatiques (qu'elles soient saines ou cancéreuses). Dans ces pathologies, les cellules cancéreuses prolifèrent et n'entrent plus en apoptose. A ce stade, le cancer de la prostate devient incurable. Il est donc nécessaire de trouver d'autres voies thérapeutiques.

De nombreux travaux ont démontré que la déplétion des stocks calciques induit l'apoptose dans un grand nombre de modèles cellulaires et dans la prostate en particulier (Furuya et al., 1994). Peu de données étaient connues concernant les canaux calciques intracellulaires impliqués dans ce phénomène. L'un des premiers articles qui marque le début des recherches du laboratoire concernant un thème de recherche très vaste : « le rôle du calcium intracellulaire dans le contrôle de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques humaines » est celui de Pascal Mariot (Mariot et al., 2000). Au cours de ce travail, Pascal a mis en évidence que les cellules LNCaP expriment de manière fonctionnelle des récepteurs à la ryanodine de type 1 et de type 2. L'ouverture de ces récepteurs-canaux induit l'apoptose. Au contraire, leur inhibition protège les cellules LNCaP de ce phénomène.

C'est au cours de ce travail que j'ai eu la chance d'apprendre l'imagerie calcique avec Pascal et de bénéficier de sa grande expérience dans ce domaine.

II- Résultats :

Dans cet article, nous avons étudié le rôle des stocks calciques intracellulaires et des canaux de type SOC dans l'induction de l'apoptose des cellules LNCaP. Pour la première fois, ce courant a été caractérisé dans ces cellules en configuration « cellule entière » et « cellule attachée ». Il existe deux hypothèses quant au rôle du calcium dans le déclenchement de l'apoptose.

En effet, deux théories s'opposent pour expliquer le rôle du calcium dans l'apoptose :

- une augmentation soutenue de la concentration en calcium intracellulaire par la vidange des stocks et/ou par un influx de calcium extracellulaire agirait comme un signal apoptotique (activation d'enzymes dépendantes du calcium) (He et al., 1997). L'élévation de la concentration en calcium pourrait avoir pour cible des enzymes intermédiaires des signaux de transduction, par exemple des protéines kinases ou des phosphatases. Le calcium peut également activer des protéases comme les caspases, la transglutaminase (qui forme des liaisons protéiques maintenant l'intégrité de la cellule avant qu'elle ne soit phagocytée) ou des endonucléases qui mènent au clivage de l'ADN. Des taux élevés de calcium provoquent également la migration de protéines membranaires (mouvements de phosphatidylsérine de la face interne vers la face externe de la membrane plasmique) reconnues par les macrophages.
- l'action de vidanger les réserves calciques intracellulaires, plutôt que l'augmentation du calcium cytosolique déclencherait l'apoptose (Putney and Ribeiro, 2000). Il est possible que la vidange du calcium soit accompagnée de la libération d'une molécule proapoptotique comme une endonucléase. La déplétion des stocks pourrait également déstabiliser le réseau « calcium-protéines » ainsi que les portions de membrane qui lui sont associées conduisant à la formation de vésicules et de corps apoptotiques.

Dans cet article, grâce à l'utilisation combinée de la thapsigargine (vidangeant le RE en calcium) et du nickel (qui bloque le courant SOC), nous avons mis en évidence que c'est la vidange du RE qui induit l'apoptose et non l'augmentation soutenue de calcium dans le cytoplasme entretenue par l'ouverture des canaux SOC.

En conclusion, la concentration en calcium du RE régule l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Il est alors important de comprendre quels sont les mécanismes de contrôle de la concentration en calcium dans le RE. Pour cela, il fallait mettre

au point une technique de mesure du calcium au sein du RE. J'ai acquis cela au cours de mon stage post-doctoral à Liverpool. J'ai développé et transmis par la suite les techniques de mesure de calcium dans le RE dans le laboratoire de Physiologie Cellulaire.

Article 8

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 Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. 2002. *Cancer Cell*.1: 169-179

I- Position du problème :

Le calcium est l'un des éléments clés de la modulation de l'apoptose des cellules prostatiques. Comme nous l'avons vu, dans de nombreux modèles cellulaires, la mort cellulaire programmée est déclenchée par une augmentation soutenue du taux de calcium cytosolique (Kyprianou et al., 1988). Au sein des cellules cancéreuses prostatiques humaines, nos résultats stipulent que l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP est déclenchée par la vidange des réserves calciques intracellulaires (réticulum endoplasmique). La concentration luminale du calcium cytosolique est donc un élément capital dans la régulation de l'apoptose des cellules prostatiques humaines.

L'ensemble des protéines impliquées concourt à la régulation du calcium luminal et donc de l'apoptose. Cependant, si les connaissances concernant les pompes calciques, les récepteurs à l'IP3 et à la ryanodine sont étendues, il n'en est pas de même pour les protéines qui appartiennent à la famille de Bcl-2, de Bax et des canaux de fuite.

D'après les expériences de l'équipe de Kroemer (Brenner et al., 2000) et de celle de (Schlesinger et al., 1997), Bcl-2 se dimérise et forme un canal dans une bicouche artificielle de phospholipides. Par ailleurs, la surexpression de Bcl-2 dans les cellules de lymphome provoque une augmentation de la concentration en calcium luminale (He et al., 1997). Cet effet aurait pour effet de ralentir, voire de stopper les processus apoptotiques.

Nous ne connaissons que les conséquences de la surexpression de Bcl-2 dans divers modèles cellulaires amenant à une réduction du pourcentage de cellules apoptotiques. Cependant, les mécanismes d'action précis de Bcl-2 étaient peu détaillés.

La concentration en calcium lumenale est un équilibre entre l'entrée et la sortie de calcium au travers de la membrane du réticulum endoplasmique. Les canaux dits « de fuite » restent obscurs et définissent les mouvements calciques non encore clairement définis. Notre hypothèse est la suivante : les protéines du genre de celui de Bcl-2 et de celui de Bax sont impliquées dans la régulation de cette fuite de calcium. Ainsi, Bcl-2 pourrait réduire la fuite de calcium et donc, à terme, modifier la concentration lumenale en calcium ayant pour conséquence de ralentir les processus apoptotiques.

Les molécules proapoptotiques (Bax,...) agiraient de manière opposée, c'est à dire, augmenteraient la fuite de calcium, rendant la vidange totale des stocks calciques plus rapide et donc favoriseraient le développement des processus apoptotiques. L'état de remplissage des stocks calciques et donc l'entrée de la cellule en apoptose pourraient résulter, en partie, des proportions respectives en molécules antiapoptotiques (type Bcl-2) et proapoptotiques (type Bax).

La lignée cellulaire LNCaP est notre modèle d'étude. L'équipe de Ralph Buttyan a créé une lignée de cellule LNCaP qui surexprime Bcl-2 (Raffo et al., 1995). Ces cellules deviennent hormono-indépendantes. En effet, l'absence d'androgènes dans le milieu de culture n'altère pas la prolifération et surtout, l'apoptose n'est pas induite. Il se produit un mécanisme similaire chez un patient atteint d'un cancer en phase d'échappement thérapeutique.

J'ai alors demandé au Dr de la Taille (à l'époque en stage post-doctoral chez Ralph Buttyan) de nous envoyer ces cellules surexprimant Bcl-2, ce qu'il a accepté (encore merci !). Nous avons nommé cette lignée « LNCaP Bcl-2 ».

Comme la vidange des stocks calciques provoque l'apoptose et que Bcl-2 protège les cellules de l'apoptose, nous nous attendions à ce que le RE des cellules LNCaP Bcl-2 soit davantage rempli en calcium. Pour le visualiser, nous avons tout d'abord mesuré la réponse de ces cellules à la thapsigargine..... Nous avons visualisé tout le contraire à notre grande surprise!!!! La « réponse Tg » était beaucoup plus faible que celle obtenue dans les cellules LNCaP. Nous avons alors demandé à Alexandre de nous envoyer une autre lignée de cellules LNCaP Bcl-2.... Même constat !!!! J'avais réalisé ces expériences avec mon stagiaire de l'époque, juste avant de partir en stage post-doctoral : Fabien Vanden Abeele (que tout le monde connaît sous le nom de « Petit Fabien » qui n'a rien de péjoratif mais fait simplement référence à nos tailles respectives). Fabien Vanden Abeele a poursuivi ces travaux en stage de DEA par la suite et a permis la publication de l'article présenté ici.

II- Résumé :

Dans cet article, il a été mis en évidence les résultats suivants :

- La vidange induite par la thapsigargine des cellules LNCaP Bcl-2 est réduite par rapport aux cellules LNCaP contrôle ;
- La mesure de la concentration calcique luminaire indique que le RE des cellules LNCaP Bcl-2 contient moins de calcium (d'où une réponse TG plus petite) ;
- La fuite de calcium du RE est plus conséquente ;
- L'amplitude du courant SOC est plus faible. Ceci est dû en partie à une vidange des stocks réduite ainsi qu'à une diminution de la densité des canaux SOC ;
- L'expression des SECA 2b et de la calréticuline est diminuée dans les cellules LNCaP Bcl-2 ;
- L'activation des canaux SOC est indispensable pour induire l'apoptose des cellules LNCaP Bcl-2.

En conclusion, les cellules LNCaP Bcl-2 résistent à la déplétion du milieu de culture en androgènes en augmentant la fuite de calcium du RE. Cela modifie l'équilibre entre l'entrée de calcium dans le RE et sa sortie. Il en résulte une concentration intraluminale en calcium diminuée. La quantité de calcium pouvant être libérée est donc plus faible que dans les cellules non transfectées. Les cellules LNCaP Bcl-2 résistent donc à l'apoptose et développent un courant SOC de plus faible amplitude. Or, comme ce courant est indispensable pour induire l'apoptose de la lignée LNCaP Bcl-2, ces cellules deviennent donc résistantes à l'apoptose ; ce qui est le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques en phase d'échappement thérapeutique.

2.2

Régulation de la concentration en calcium dans le réticulum endoplasmique des cellules de pancréas de souris.

Article 9

Cancela J, Van Coppenolle F, Galione A, Tepikin AV and Petersen OH.

Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients: the combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers.

2002. EMBO J. **21**(5): 909-19

I- Position du problème :

J'ai participé aux travaux présentés dans ce chapitre au cours de mon stage post-doctoral à Liverpool concernant l'étude des mécanismes de contrôle de la concentration en calcium dans le RE.

Cette étude est menée sur les cellules de pancréas exocrine de souris. Ces cellules sont structurellement et fonctionnellement polarisées. Les granules de zymogène sont concentrés au niveau apical, alors que le réticulum endoplasmique, le noyau et l'appareil de Golgi sont localisés au niveau basal de la cellule (figure 7). Ces cellules sécrètent des enzymes pancréatiques en réponse à la stimulation par l'acétylcholine (ACh) ou par la cholecystokinine (CCK). Ces cellules sont un excellent modèle d'étude des variations de calcium dans l'espace et dans le temps entre les différents compartiments intracellulaires.

Au niveau de l'apex du RE se situent les récepteurs IP3 (Cancela et al., 2002). C'est à ce niveau que le calcium est libéré dans le cytoplasme après avoir transité de la partie basale du RE vers l'apex. Il s'agit du phénomène de « tunneling » (Park et al., 2000). Les variations de calcium cytoplasmique sont localisées au niveau apical pour de faibles doses d'ACh ou de CCK. Par contre, l'inhibition des mitochondries qui forment un cordon entourant les granules de sécrétion permet au calcium de se répandre dans toute la cellule et provoque une « vague calcique » (Tinel et al., 1999). Ce phénomène met en évidence le rôle tampon des mitochondries dans les échanges de calcium entre le cytoplasme et le RE.

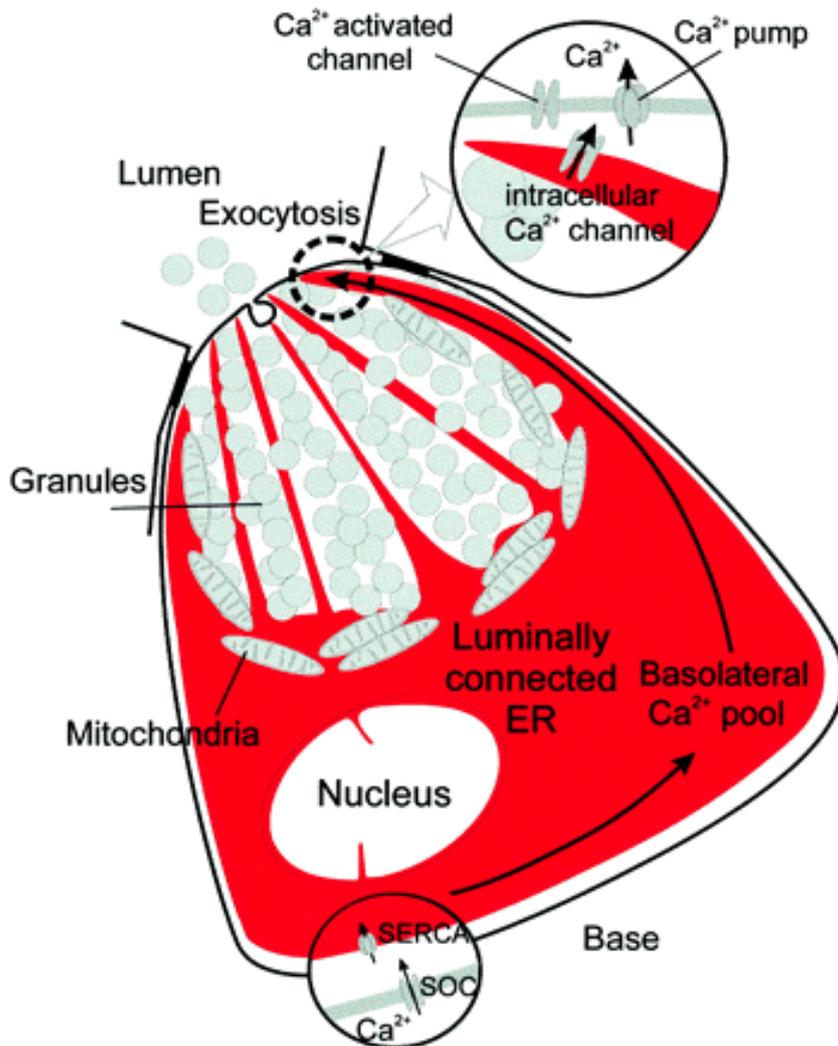


Figure 7 : Représentation schématique d'une cellule de pancréas exocrine de souris. D'après Park et al. 2000.

Cette étude, réalisée par José Cancela et à laquelle j'ai eu la chance de participer, a pour but de mettre la lumière sur le fait que de faibles doses d'ACh ou de CCK induisent des variations localisées de calcium cytoplasmique, alors qu'à forte dose, ces molécules provoquent un signal calcique global.

II- Résumé :

Les variations rapides de calcium intracellulaire sont mesurées grâce au courant « chlore calcium-dépendant ». Cet index permet de visualiser très rapidement et avec une grande précision les modifications rapides (« spikes ») ou globales de la concentration en calcium cytosolique (Cancela et al., 2002).

L'acétylcholine (ACh) et la cholecystokinine (CCK) induisent la libération du contenu des vésicules de sécrétion des cellules de pancréas exocrine. Ces deux agonistes physiologiques provoquent des oscillations calciques à faible concentration et un signal global à des concentrations plus élevées (Cancela et al., 2000; Cancela et al., 2002). Dans ce modèle, nous avons voulu déterminer quels étaient les seconds messagers impliqués dans la libération de calcium du RE. La voie de signalisation de l'ACh passerait par la production d'IP3 alors que celle de la CCK serait le fruit de la combinaison des effets de l'ADPRc et du NAADP. Il faut cependant savoir que Fukushi et collaborateurs (Fukushi et al., 2001) ont démontré que l'ACh génère également de l'ADPRc et du NAADP. Cependant cette étude ne révèle pas la concentration précise de ces seconds messagers produits. D'autre part, ce phénomène doit dépendre de la concentration en agonistes.

Nous avons mis en évidence que la réponse à l'ACh est potentialisée par l'ADPRc et le NAADP. Les oscillations initiales dues à l'ACh deviennent un signal plus large lors de l'ajout d'ADPRc ou de NAADP dans la pipette de patch. La réponse à la CCK n'est par contre potentialisée que par l'IP3. Ces données sont à rapprocher des voies de signalisation connues de l'ACh et de la CCK.

Nous avons également démontré que le NAADP potentialise la réponse à l'IP3, mais que son effet est beaucoup plus important sur la réponse à l'ADPRc.

La diffusion combinée d'IP3, d'ADPRc et de NAADP via la pipette de patch-clamp provoque une libération de calcium soutenue et de très grande amplitude.

Il existe donc une séquence d'activation des récepteurs aux agonistes qui permet le passage d'oscillations locales à un phénomène global. Pour l'expliquer, il faut savoir que les récepteurs à la ryanodine sont disséminés sur toute la surface du RE alors que les récepteurs à l'IP3 se situent essentiellement au niveau apical. Le signal calcique devient global lorsque suffisamment de canaux de « release » sont activés de manière à dépasser le pouvoir tampon des mitochondries. Ce phénomène a lieu notamment au niveau apical quand sont présents les 3 agonistes dans la pipette de patch-clamp. Il se produit une potentialisation du signal et une vague calcique.

Le NAADP n'a que peu d'effets sur la libération du calcium du RE. Cependant, cette molécule apparaît comme l'élément clé dans la formation d'un signal global, débutant au pôle apical puis se répandant dans toute la cellule. De toute évidence, la libération de calcium par le

RE est un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux paramètres (types de stimulations, lieux de libération, agonistes produits, séquences d'évènements,).

Article 10

Lomax RB, Camello C, **Van Coppenolle F**, Petersen OH and Tepikin AV.

Basal and Physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells

2002. Journal of Biological Chemistry. **277(29)**: 26479-26485

I- Position du problème :

Cette étude utilise le même modèle cellulaire que celui employé dans l'article précédent : les cellules de pancréas exocrine de souris. Le but de ce travail consiste à déterminer quelles sont les différentes voies de libération de calcium avec ou sans l'action de stimuli physiologiques (ACh ou CCK). La concentration en calcium du RE est relativement constante à l'état basal. Cet équilibre n'est pas statique mais est entretenu en permanence par les pompes calciques qui contrebalancent en permanence les fuites basales de calcium via des canaux ouverts, en absence de stimuli physiologiques. Cet équilibre est rompu lorsque des seconds messagers comme l'IP₃ ou l'ADPRc sont produits. De nouveaux canaux de fuite « activés » s'ouvrent et provoquent une libération importante de calcium dans le cytoplasme : le RE se vide. Lorsque les stimuli cessent, les seconds messagers ne sont plus produits. Les pompes SERCA « rechargent » le RE en calcium pour retrouver la concentration basale en calcium.

Ce travail a pour objectif d'analyser les différentes voies de libération de calcium qu'elles soient basales ou induites par des agonistes.

II- Résultats :

Afin d'étudier la fuite de calcium, il convient de maintenir artificiellement la concentration en calcium cytosolique à l'aide de Bapta. La concentration cytoplasmique de calcium est maintenue à 90 nM environ, ce qui correspond à la concentration en calcium cytosolique basale.

Ces travaux ont confirmé les points suivants :

- l'acétylcholine provoque la libération de calcium du RE via l'ouverture de récepteurs IP₃ ;
- la CCK induit un relargage de calcium par la voie de l'ADPRc et du NAADP.

Par ailleurs, dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que le translocon (un complexe multiprotéique impliqué dans la traduction et situé sur la membrane du RE) pouvait être un canal

de fuite. Pour cette étude, j'ai employé un antibiotique, la puromycine, qui maintient le pore du translocon ouvert. La perfusion de puromycine sur des cellules de pancréas exocrine de souris induit une vidange importante de calcium sans faire intervenir ni les récepteurs IP3, ni les récepteurs à l'ADPRc.

Chapitre 3

Mise en évidence du rôle du translocon comme canal de fuite.

Article 11

Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E and Prevarskaya N

Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores
2004. Journal of Cell Science. **117**: 4135-4142

I- Position du problème et résumé:

C'est en grande partie au cours de ce travail que j'ai formé Matthieu Flourakis à l'imagerie calcique ainsi qu'à la microscopie confocale lors de nombreux stages au laboratoire et au cours de son DEA.

Afin de mettre en évidence le rôle du translocon comme canal de fuite, nous avons démontré les points suivants :

- la libération de calcium par la thapsigargine est plus faible sur des cellules préalablement incubées dans un milieu contenant de la puromycine ;
- la puromycine (200 μ M) induit une vidange du RE d'environ 40% ;
- l'anisomycine (200 μ M) inhibe la traduction en empêchant le ribosome de se fixer sur le translocon. Cet antibiotique, agit en amont de la puromycine (qui, je le rappelle, provoque la libération de la chaîne peptidique naissante et laisse le pore du translocon ouvert). L'anisomycine, perfusée préalablement sur les cellules avant la puromycine, bloque l'effet de cette dernière ;
- nous avons également démontré que la vidange induite par la puromycine n'implique ni les récepteurs IP3, ni les récepteurs à l'ADPRc, ni la voie du NAADP ;
- enfin, nous avons mesuré les coefficients de colocalisation entre la sous-unité 60S du ribosome et la protéine Sec 61 α du translocon. Après une heure d'incubation en présence de puromycine (200 μ M), nous avons noté une diminution du coefficient de colocalisation. Cependant, nous avons au préalable démontré qu'un traitement d'une heure avec de la puromycine (à la même concentration) réduit considérablement la concentration en calcium réticulaire. Cela signifie qu'un faible nombre de translocons ouverts est capable de provoquer une vidange importante. Cela se comprend car comme énoncé plus haut, le pore ouvert du translocon mesure entre 4 et 6 nm (Simon and Blobel, 1991).

En conclusion, nous avons mis en évidence dans cet article que la vidange du RE induite par la puromycine se déroule via le translocon. Cette libération de calcium se produit également physiologiquement à la fin de la traduction lorsque la chaîne peptidique est libérée et pendant le laps de temps où le ribosome se trouve toujours sur le translocon. A ce moment, le pore du translocon est ouvert et le calcium fuit vers le cytoplasme.

Article 12

Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'Kyi V, Beck B and Prevarskaya N

Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA₂-pathway regulated Store Operated Channels activation.

2006. FASEB J. **20**: 1215-7

I- Position du problème :

Matthieu Flourakis et moi-même sommes co-premier auteur dans cet article. Dans l'article précédent, nous avons mis en évidence que le translocon est un canal de fuite calcique du RE.

La concentration en calcium réticulaire résulte d'un équilibre entre l'entrée de calcium via les pompes SERCA et la fuite (induite ou non par des agonistes tels que l'IP3 ou l'ADPRc). Nous nous sommes posés les questions suivantes :

- la thapsigargine provoque la vidange du RE par inhibition des pompes de type SERCAs. La libération du calcium du RE ne peut se faire via ces pompes calciques car leur conformation est incompatible avec la formation d'un pore. Comme le translocon est un canal de fuite, la vidange induite par la thapsigargine emprunte-t-elle le translocon ?

- nous connaissons le couplage existant entre la réponse du RE à l'IP3 ou à l'ADPRc avec l'activation des canaux SOCs. Qu'en est-il de la vidange spécifique au translocon ? Celle-ci peut-elle activer les canaux SOCs et si oui, par quels mécanismes ?

Ce sont ces questions auxquelles nous avons tenté de répondre dans l'article suivant. Ces travaux correspondent à ceux que j'ai suivi, co-encadré et co-réalisé au cours du DEA et du début de la thèse de Matthieu Flourakis. Ces travaux ont permis à cet étudiant d'obtenir une bourse de thèse du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

II- Résumé :

Au cours de cette étude, nous avons démontré les points suivants :

- 1- le translocon est impliqué dans la fuite calcique induite par la thapsigargine et l'EGTA ;
- 2- l'inhibition des SERCAs par la thapsigargine révèle la fuite transitant par le translocon ;
- 3- la fuite de calcium véhiculée par le translocon active les canaux SOCs ;
- 4- une étude de Bolotina et collaborateurs (Bolotina, 2004) a mis en évidence l'implication de la phospholipase A2 calcium-indépendante (iPLA₂β) dans l'activation des SOCs par la fuite passive de calcium. Nous retrouvons ici les mêmes résultats avec la fuite transitant par le translocon ;

Ces travaux constituent la première caractérisation d'une entrée de calcium via les canaux de type SOCs provoquée par une vidange de calcium transitant par un canal de fuite « non induite » connu.

CONCLUSION ET SYNTHÈSE

Au cours de ma thèse (au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire, USTL, sous la cotutelle du Pr Prevarskaya et du Dr Halima Ouadid-Ahidouch), mes travaux se sont essentiellement accés sur les effets de la prolactine sur les cellules prostatiques. En partenariat avec l'entreprise « Pierre Fabre Médicaments », j'ai mis en évidence, *in vivo* chez le rat, que cette hormone induit une hyperplasie bénigne de la prostate en synergie avec les androgènes (Van Coppenolle et al., 2000; Van Coppenolle et al., 2001). J'ai par la suite démontré, *in vitro*, que la prolactine augmente la probabilité d'ouverture d'un canal potassique impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP (Van Coppenolle et al., 2004a). Ces travaux ont conduit à l'élaboration et au démarrage de deux protocoles d'étude clinique utilisant la prolactine comme cible thérapeutique (études réalisées sous la direction du Pr B. Mauroy, Chef du Service d'Urologie, Hôpital Saint Philibert, Lomme).

En parallèle, nous avons mis en évidence que la vidange des stocks calciques des cellules LNCaP induit l'apoptose (Skryma et al., 2000). Il nous a alors paru judicieux de poursuivre les travaux sur les mécanismes précis de régulation de la concentration en calcium au sein du RE.

Ainsi, au cours de mon stage post-doctoral (Laboratoire de Physiologie, Liverpool, Directeur O.H. Petersen), j'ai pu participer à l'étude des mécanismes de libération du calcium du RE par les seconds messagers dans les cellules polarisées de pancréas exocrine de souris. J'ai eu l'opportunité d'acquérir les techniques de microscopie confocale, développées par la suite au laboratoire de Physiologie Cellulaire. Durant cette période, j'ai également décrit une libération de calcium probablement due au translocon (Lomax et al., 2002).

Après mon recrutement au sein du laboratoire de Physiologie Cellulaire, j'ai poursuivi le projet « Translocon » sur les cellules LNCaP. Mon étudiant en thèse et moi-même avons démontré que le translocon est réellement un canal de fuite calcique du RE (Van Coppenolle et al., 2004b) qui est par ailleurs impliqué dans l'entrée capacitive (Flourakis et al., 2006). Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que la fuite calcique induite par la thapsigargine transite en grande partie via le pore du translocon.

La libération de calcium par le RE provoque un stress réticulaire et l'apoptose. A court terme, dans la continuité des travaux sur le translocon et comme détaillé dans le chapitre « Discussion et Perspectives » ci-dessous, j'espère faire le lien entre la réponse UPR (« Unfolded Protein Response ») et la fuite calcique transitant par le translocon. J'étudierai notamment les effets du blocage de l'ouverture du translocon sur l'apoptose et le stress réticulaire.

Enfin, et ceci est un projet plus vaste, je m'appliquerai à développer un nouveau modèle d'étude au laboratoire : les cellules polarisées de prostate de souris. Ces travaux, je l'espère, nous

permettrons d'étudier des morceaux d'organes (acinus ou canal prostatique) dans des conditions plus physiologiques que celles offertes par les cultures de lignées cellulaires ou les cultures primaires. Nous pourrons ainsi analyser les interactions entre les différents organites intracellulaires et la membrane plasmique. Nous porterons un intérêt particulier aux canaux de type TRP et leurs rôles dans le développement du courant SOC.

A long terme, comme détaillé dans le chapitre suivant, nous voudrions utiliser d'autres souches de souris : des souris KO pour certains TRP, des souris développant spontanément des tumeurs prostatiques, mais également des souris recevant des injections de siRNA afin d'abolir l'expression d'un canal d'intérêt.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Je vais vous présenter ici les deux projets de recherche qui me tiennent maintenant à cœur.

- 1- Je vais poursuivre les travaux engagés sur le translocon. Le but de ce projet étant de mettre en relation la fuite calcique et la réponse UPR (« Unfolded Protein Response »).
- 2- Je vais développer l'étude de la polarisation cellulaire à partir de cellules issues de biopsies de prostate de souris. Ce modèle d'étude permettra de valider les données obtenues sur des lignées cellulaires en apportant un environnement plus physiologique. L'obtention de cellules épithéliales de prostate de souris est possible. L'intérêt du modèle « souris » réside dans le fait que nous pouvons maintenant utiliser des souris développant un cancer de la prostate et moduler l'expression d'un canal par injections de siRNA.

Projet « Translocon et Réponse UPR »

Nous projetons en effet de poursuivre l'étude entamée sur le translocon. Cette structure est impliquée à la fois dans la traduction et la fuite calcique, mais également dans la réponse UPR. Les protéines mal conformées sont expulsées hors du réticulum via le translocon, puis ubiquitinylées et prises en charge par le protéasome.

Il est logique de penser que la sortie du RE de ces protéines mal conformées s'accompagne d'une fuite massive de calcium qui, si elle perdure, provoque l'apoptose de la cellule.

Ce phénomène pourrait être impliqué dans de nombreuses pathologies (Kim and Arvan, 1998; Lindholm et al., 2006) ainsi que dans certains phénomènes de chimiorésistance (Mandic et al., 2003) dont nous allons parler dans ce chapitre.

Résumé du projet de recherche sur le translocon :

De récentes études indiquent que l'activation de la voie UPR au sein des cellules tumorales altère leur sensibilité à la chimiothérapie. Le but de ce projet consiste à caractériser les mécanismes responsables de ce phénomène afin d'en contourner les effets.

La réponse UPR est provoquée initialement par l'accumulation de protéines mal conformées. Tout d'abord, la traduction est stoppée (Kaneko and Nomura, 2003). Puis, l'expression de protéines chaperones comme GRP 78 (autrement appelée « Bip ») est induite. GRP 78 prend en charge les protéines incriminées afin qu'elles soient exportées dans le cytoplasme puis dégradées par le protéasome. Dans un deuxième temps, si la première voie s'avère inefficace, un stress réticulaire s'installe. Les cellules vont alors entrer en apoptose.

Il semble que la résistance à la chimiothérapie (Etoposide), imputable à l'activation de la voie UPR, se fasse par un blocage de l'apoptose (Reddy et al., 2003). Les éléments clés de cette régulation sont la protéine GRP 78 et le translocon. Lors de la réponse UPR, le RE libère le calcium qu'il contient par une voie qui restait inconnue. Cela engendre un stress réticulaire induisant l'apoptose. Nos travaux récents ont mis en évidence que le calcium quitte la lumière du RE pour le cytoplasme en empruntant le pore du translocon. Cette fuite s'accompagne de l'activation d'un courant de type SOC.

Le but de notre étude est :

- d'une part, d'analyser les mécanismes d'ouverture et de fermeture du translocon lors de la réponse UPR. Nous étudierons en particulier les interactions entre GRP 78 et le translocon. En effet, de par sa position proche du translocon, GRP 78 pourrait participer à la régulation de l'ouverture du translocon. Nous utiliserons, dans un premier temps, des cellules cancéreuses prostatiques humaines comme modèle d'étude ;
- D'autre part, nous nous pencherons sur les implications de la fuite calcique via le translocon et de l'entrée de calcium qui en résulte sur l'apoptose. Nous avons au préalable démontré que la vidange du RE provoque l'apoptose (Skryma et al., 2000). Un stress réticulaire s'accompagne d'une libération du calcium intraréticulaire. Il est probable que cette vidange se fasse par l'ouverture du translocon. Nous déclencherons un stress réticulaire pharmacologiquement et mesurerons en parallèle la concentration en calcium réticulaire et l'apoptose en modulant en parallèle l'ouverture du translocon notamment grâce à la puromycine et à l'anisomycine ;
- Enfin, nous allons caractériser les canaux SOCs activés par la vidange induite par la puromycine. Nous pensons que les canaux SOCs activés par la vidange puromycine soient semblables à ceux activés par la fuite déclenchée par la thapsigargine.

Nous emploierons notamment les techniques d'imagerie cellulaire, de RT-PCR, d'immunolocalisation, de microscopie confocale et de FRET ;

1- Situation actuelle du sujet de recherche :

Il est connu que la réponse UPR constitue l'un des mécanismes de contrôle capital pour la cellule (Kaneko and Nomura, 2003). Dans un premier temps, la cellule va synthétiser des protéines chaperones comme GRP 78 (« Glucose Response Protein »). Il se produira ensuite un arrêt de la traduction, puis un stress réticulaire. Le stress du réticulum endoplasmique (RE) se traduit par une libération du calcium qu'il contient vers le cytoplasme par une voie qui restait

indéterminée. Ce phénomène conduit la cellule à entrer en apoptose, notamment par l'activation de la caspase 12.

Lors de la chimiothérapie, la réponse UPR peut être enclenchée (Mandic et al., 2003). Il s'ensuit une augmentation de l'expression de GRP 78 qui provoque notamment une diminution des effets cytotoxiques de l'Etoposide, molécule couramment utilisée en chimiothérapie (Figure 8). D'autre part, il a été démontré que la surexpression de GRP 78 protège les cellules tumorales de l'apoptose (Reddy et al., 2003). Afin de contourner cette résistance, nous projetons de provoquer pharmacologiquement un stress réticulaire afin de provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses.

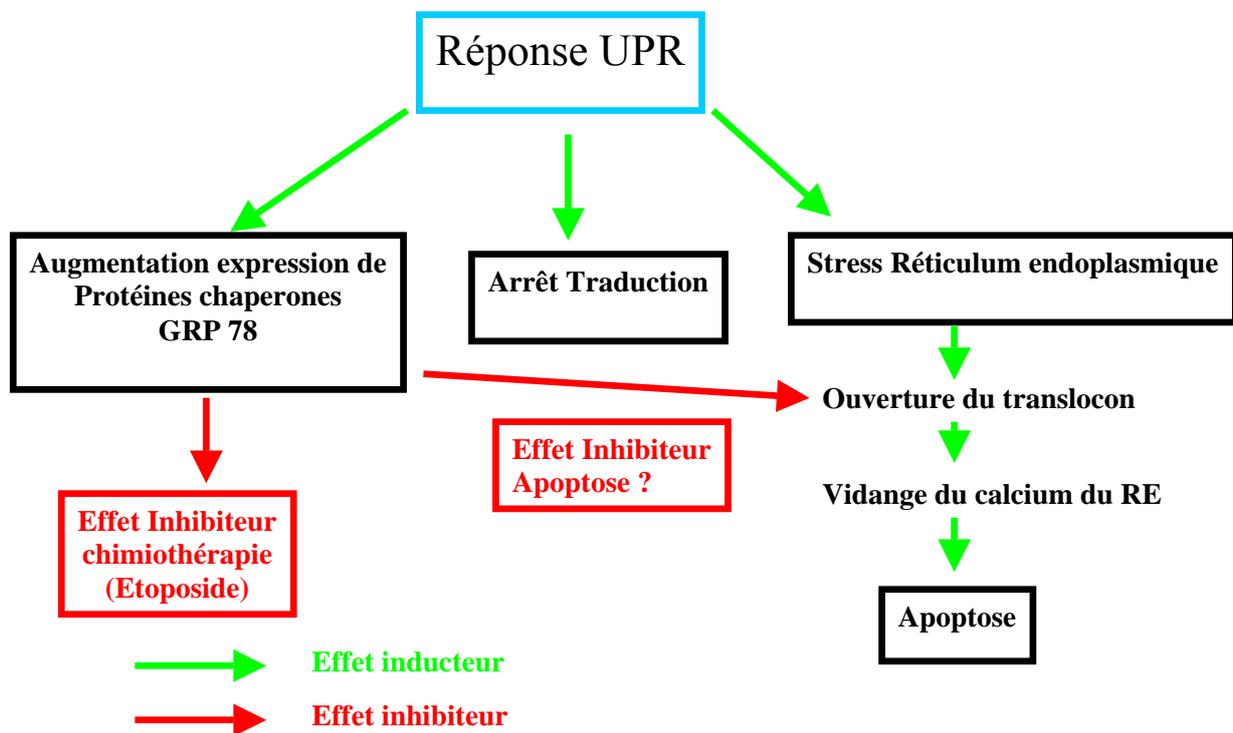


Figure 8 : La réponse UPR (« Unfolded Protein Response ») déclenche la surexpression de GRP 78, l'arrêt de la traduction et inhibe les effets de l'Etoposide. L'entrée en apoptose des cellules est ralentie.

2- Résultats préliminaires :

a- La puromycine induit l'apoptose et un stress réticulaire vide le RE en calcium :

Comme présenté précédemment, nous avons mis en évidence, pour la première fois, que le translocon, un complexe multiprotéique impliqué à la fois dans la traduction et dans le système ERAD (« Endoplasmic Reticulum Associated Degradation ») constitue le pore par lequel le

calcium s'épanche du cytoplasme (Flourakis et al., 2006; Lomax et al., 2002; Van Coppenolle et al., 2004b). Pour cela, nous avons utilisé deux antibiotiques (comme présenté précédemment): la puromycine et l'anisomycine qui ouvrent et ferment respectivement le pore du translocon.

Par ailleurs, nous avons démontré que l'ouverture soutenue du translocon (par la puromycine 200 μ M) provoque d'une part une vidange en calcium du RE et l'apoptose des cellules cancéreuses par la suite (Figure 9).

Un phénomène similaire se produit lors d'un stress réticulaire. Dans l'expérience illustrée par la figure 10, nous avons incubé les cellules LNCaP avec de la tunicamycine (5 μ g/ml), un inhibiteur de la glycosylation. Au cours du temps, la concentration en calcium dans le RE diminue (révélée par l'action de la thapsigargine qui inhibe les pompes calciques du RE et provoque une libération du contenu résiduel en calcium). Ceci est dû au fait que les protéines néosynthétisées acquièrent une mauvaise conformation. Celles-ci sont expulsées du RE par le pore du translocon qui libère en même temps le calcium. Le stress réticulaire est amorcé. La cellule va entrer en apoptose.

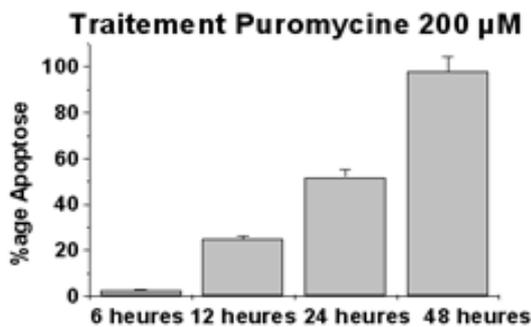


Figure 9: Evolution du taux d'apoptose des cellules Cancéreuses prostatiques humaines LNCaP après un traitement à la puromycine (200 μ M).

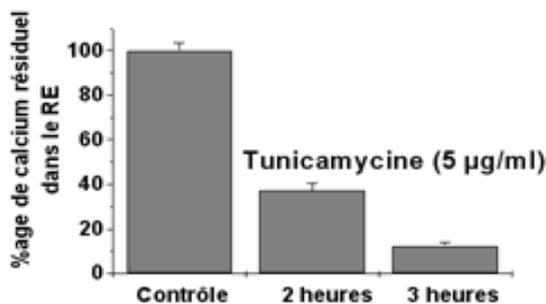


Figure 10: Evolution du taux de calcium Au sein du RE après incubation des Cellules LNCaP en présence de tunicamycine (5 μ g/ml)

b- L'anisomycine bloque l'apoptose induite par la thapsigargine et la puromycine:

La puromycine, tout comme la thapsigargine sont des molécules provoquant une fuite calcique et l'apoptose. Nous avons démontré que l'anisomycine inhibe la fuite induite à la fois par la puromycine et la thapsigargine. Nous avons de ce fait voulu vérifier s'il était possible d'inhiber l'apoptose déclenchée par ces deux molécules par l'anisomycine. En d'autres termes, le blocage de la fuite calcique peut-il être suffisant pour diminuer, voire inhiber l'apoptose ? Pour

cela, il nous a fallu déterminer quelle est la concentration d'anisomycine n'ayant pas un effet apoptotique. Une fois cette dose déterminée, nous avons pu procéder aux expériences suivantes (Figures 11A et 11B) en utilisant comme modèle les cellules LNCaP. Le pourcentage d'apoptose a été déterminé par comptage des cellules apoptotiques après coloration au Hoescht.

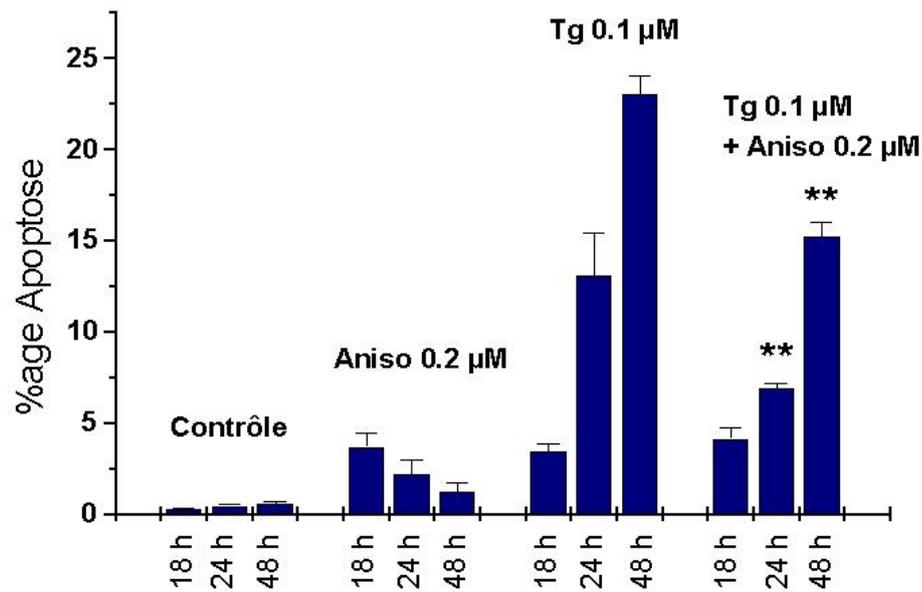


Figure 11 A : Mesure du pourcentage d'apoptose des cellules LNCaP après 18h00, 24h00 et 48h00 de traitement à l'anisomycine 0.2 µM (Aniso), à la thapsigargine 0.1 µM (Tg), à ces deux molécules combinées et dans les conditions contrôle. L'anisomycine, à la dose utilisée induit peu d'apoptose. Par contre, cet antibiotique réduit de manière significative ($p < 0.001$; test de student) le pourcentage d'apoptose déclenché par la thapsigargine.

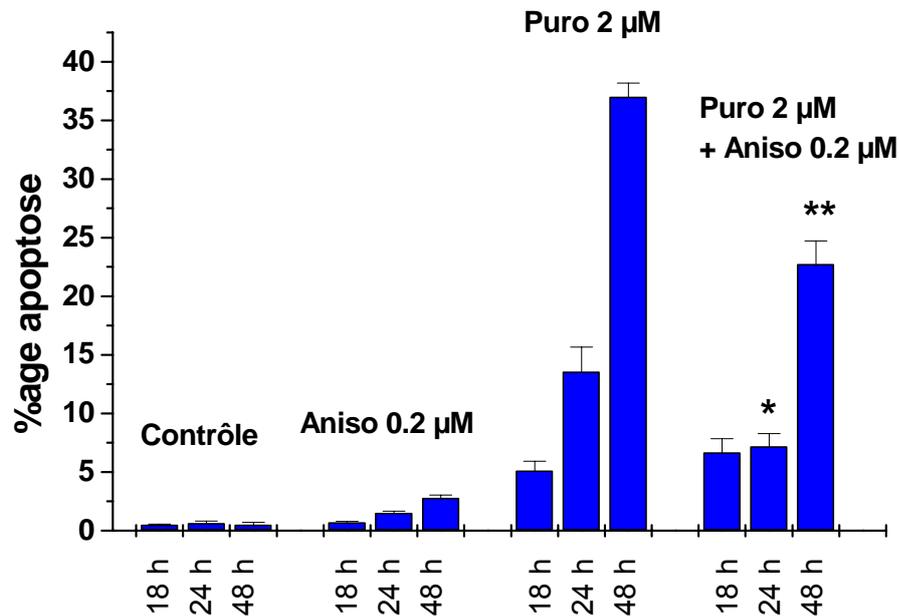


Figure 11 B: Mesure du pourcentage d'apoptose des cellules LNCaP après 18h00, 24h00 et 48h00 de traitement à l'anisomycine 0.2 µM (Aniso), à la puromycine 2 µM (Puro), à ces deux molécules combinées et dans les conditions contrôle. Tout comme dans l'expérience précédente, peu d'apoptose est mesurée en présence d'anisomycine. La puromycine déclenche davantage l'apoptose que la thapsigargine aux doses utilisées. En effet, cet antibiotique a deux effets ici : il inhibe la traduction et provoque la vidange du RE. Cependant, l'anisomycine réduit de manière significative (** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; test de student) le pourcentage d'apoptose déclenché par la puromycine.

L'anisomycine inhibe la fuite de calcium du RE provoquée par la thapsigargine et la puromycine (Flourakis et al., 2006; Van Coppenolle et al., 2004a). Les figures 11A et 11B indiquent, qu'aux concentrations utilisées, l'anisomycine est capable de ralentir l'apoptose déclenchée par la thapsigargine, mais également celle induite par la puromycine. L'apoptose des cellules LNCaP est directement corrélée à la vidange du RE (Skryma et al., 2000). L'anisomycine, en bloquant le translocon en position fermée, bloque ainsi la vidange du RE provoquée par la thapsigargine et la puromycine.

3- Programme de travail :

En résumé, notre programme de travail va consister à analyser les étapes suivantes : la réponse UPR induit une résistance à l'Etoposide. Celle-ci implique-t-elle le translocon et si oui,

est-il possible de rétablir la sensibilité des cellules cancéreuses à cette molécule en maintenant le translocon ouvert ?

a- Vérifier que tous les inducteurs de la réponse UPR induisent un stress réticulaire, une vidange calcique et l'apoptose :

Le stress réticulaire et la réponse UPR seront détectés par Western Blot et par RT-PCR en utilisant respectivement des anticorps et des amorces spécifiques de GRP 78 (protéine exprimée lors du stress de RE).

La vidange en calcium du RE sera mesurée au moyen de sondes fluorescentes sensibles aux variations de concentration calciques au sein du cytoplasme (Fura-2 et Fluo-4) et dans le RE (Mag Fura-2 et Mag Fluo-4).

En parallèle, nous vérifierons si l'apoptose de ces cellules s'est déclenchée. Afin de s'assurer du rôle du translocon dans ce phénomène, nous réaliserons les mêmes séries d'expérience en présence d'anisomycine et de spermine, molécules maintenant le translocon en configuration fermée.

b- Provoquer pharmacologiquement l'ouverture du translocon afin d'induire l'apoptose :

α - Pharmacologiquement :

Pour cela, nous disposons d'outils pharmacologiques comme la puromycine (Van Coppenolle et al., 2004b) et la pactamycine qui bloquent le translocon en configuration ouverte pendant la traduction.

β - Implication de GRP 78 :

Nous avons émis l'hypothèse que GRP 78, surexprimé lors de la réponse UPR puisse se lier au translocon et le maintenir fermé. De ce fait, l'entrée en apoptose des cellules en serait retardée voire inhibée. Nous vérifierons cette hypothèse d'une part en comparant les taux d'expression de GRP 78 avec les concentrations en calcium dans le RE et les pourcentages de cellules apoptotiques obtenues dans les conditions expérimentales décrites dans le paragraphe 1.

Par ailleurs, il a été démontré récemment que la versipelostatine inhibe le promoteur qui commande l'expression du gène codant pour GRP 78 (Park et al., 2004). Ainsi, si notre hypothèse est juste, cette molécule devrait lever l'inhibition de l'ouverture du translocon et de l'apoptose qui en sera la conséquence.

Projet « Prostate de souris et polarisation cellulaire »

Résumé du projet de recherche sur la polarisation cellulaire :

Le stage post-doctoral que j'ai effectué à Liverpool m'a permis de découvrir le modèle de cellules de pancréas exocrine de souris. Ces cellules, comme décrit précédemment, sont polarisées et offrent un merveilleux modèle d'étude des interactions entre les différents organites intracellulaires et la membrane plasmique. En effet, nous connaissons la position des différents organites intracellulaires dans les cellules polarisées. Au niveau du pôle basal, facilement identifiable, se situe le RE qui forme un « croissant » dont les apex se terminent au niveau du pôle apical. Le noyau occupe une position centrale alors que les granules de sécrétion, naturellement positionnés au sein du pôle apical, sont entourés d'un cordon de mitochondries. Cette disposition particulière permet d'étudier le rôle et les interactions entre les différents organites intracellulaires (Park et al., 2000; Tinel et al., 1999).

J'ai réussi à obtenir des cellules polarisées de prostate de souris. Il s'agit de cellules épithéliales apicales caractérisées par un pôle basal et un pôle apical. Le noyau est proche du pôle basal. Le RE est positionné au centre de la cellule. Les granules de sécrétion sont situés au pôle apical. Nous allons, grâce à ce nouveau modèle, pouvoir analyser, en microscopie confocale, d'une part, quels sont les mécanismes précis de régulation de la concentration intracellulaire en calcium dans ces cellules et d'autre part, visualiser les interactions entre le RE et les mitochondries ou entre le RE et la membrane plasmique notamment. Ces travaux ne pourraient se faire sur des cellules en culture, comme des lignées, où il y a absence de polarisation.

La limite de ces modèles résidait dans le fait qu'il était difficile d'éteindre un gène *in vivo*. Ceci est maintenant possible notamment par le développement de techniques l'injection de siRNA chez la souris. Par ailleurs, le laboratoire devrait prochainement obtenir des souris « Knock-Out » (KO) pour le canal TRP M8. D'autres souches de souris KO pour des canaux TRP pourraient nous être envoyées grâce aux différentes collaborations entretenues par le laboratoire.

Il existe également des souches de souris qui développent des cancers de la prostate. C'est le cas des souris « TRAMP » (Transgenic Mouse Prostate). Ces animaux développent des tumeurs prostatiques au bout de 12 semaines (Gingrich et al., 1996).

Nous projetons d'étudier, sur des cellules de prostate de souris fraîchement isolées, les interactions entre les différents organites intracellulaires (RE et mitochondries par exemple). Nous pourrions également nous pencher sur l'implication des canaux de type TRP («Transient

Receptor Potential ») dans le courant de type SOC au sein de cellules saines et cancéreuses. La comparaison de nos résultats obtenus sur des souris saines, des souris saines traitées avec des siRNA, ainsi que leur équivalent sur les souris TRAMP, nous fournira, nous l'espérons, de précieuses données sur le rôle de ces canaux d'intérêt dans la prolifération des cellules saines et cancéreuses.

Enfin, la maîtrise de la dissociation de la prostate de souris nous permettra également d'étudier la propagation de « vagues calciques » au sein d'une cellule prostatique, mais aussi entre plusieurs cellules.

1- Résultats préliminaires :

a- Structure de la prostate de souris

La prostate des rongeurs a une structure différente de celle de l'homme. Comme l'illustre la figure 12, la prostate de souris est composée de différents lobes : 2 lobes ventraux, 2 lobes latéraux et un lobe dorsal (qui est en fait formé de la fusion de deux lobes dorsaux). De par son histologie et sa sensibilité aux hormones, le lobe latéral est celui qui présente le plus de similitudes avec la prostate humaine (Robinette, 1988).

Il convient donc, dans la mesure du possible, d'utiliser ce lobe prostatique dans nos expériences. La seule difficulté étant de réussir à isoler les lobes latéraux du lobe dorsal. En effet, de nombreuses études se font sur les lobes ventraux (plus faciles à dissocier) ou sur le lobe dorsolatéral, ce qui est une erreur car la préparation cellulaire est de ce fait loin d'être homogène.

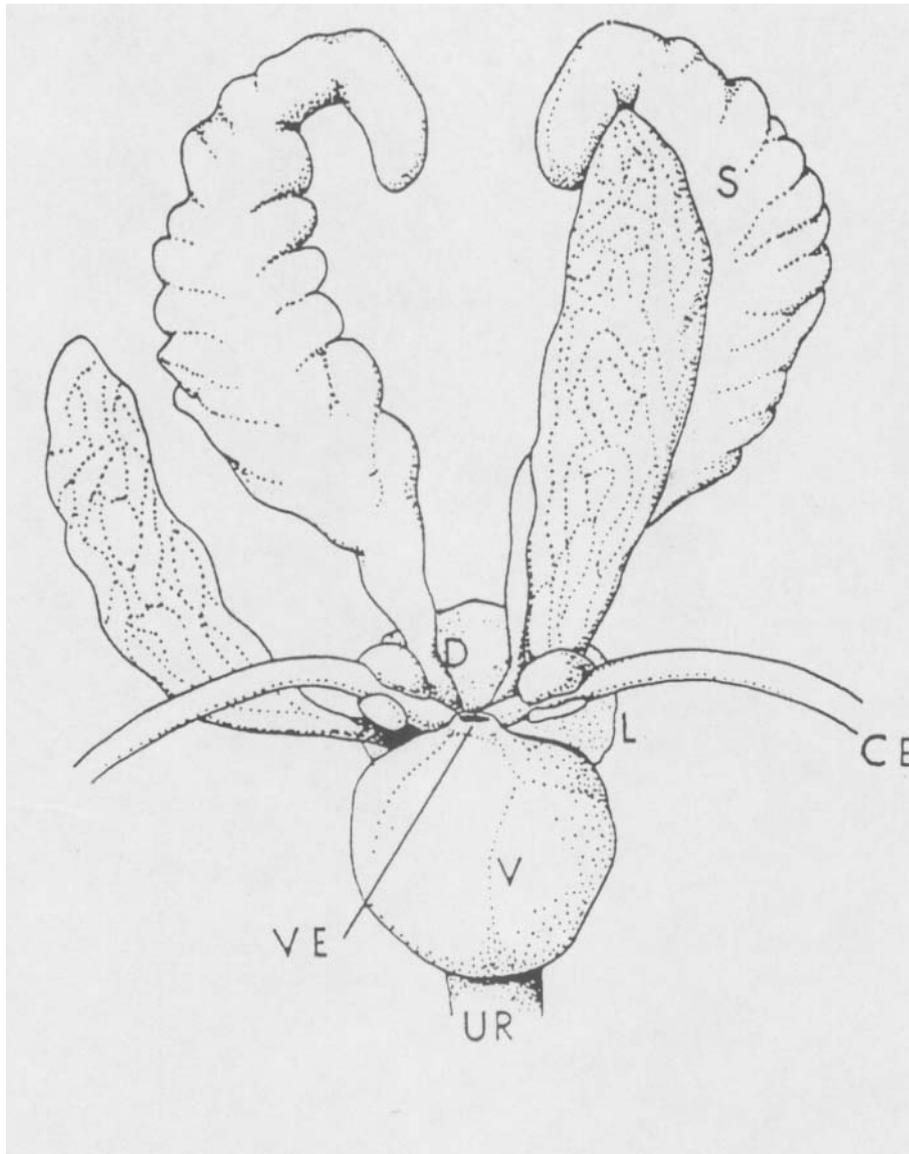


Figure 12 : Schéma de la prostate de souris. (UR : urètre ; VE : Emplacement de la vessie ; V : lobe prostatique ventral ; L : lobe prostatique latéral ; D : lobe prostatique dorsal ; CE : canaux éjaculateurs ; S : vésicules séminales). D'après Robinette, 1988.

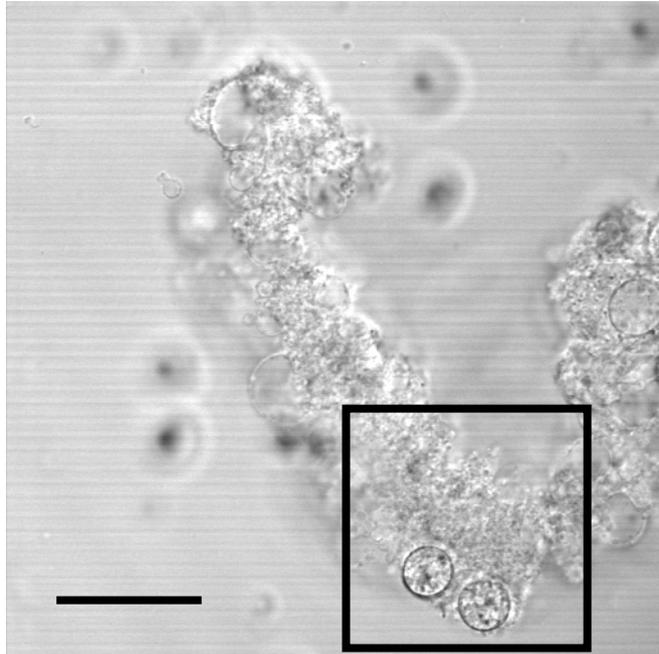
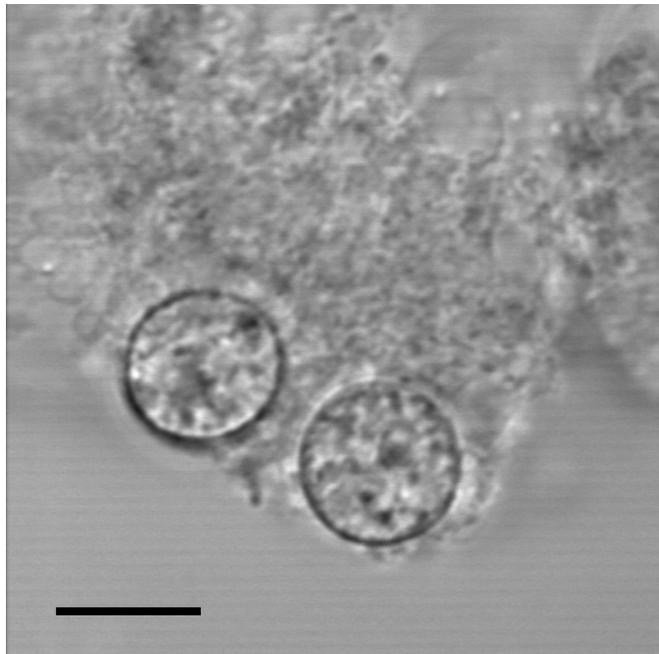
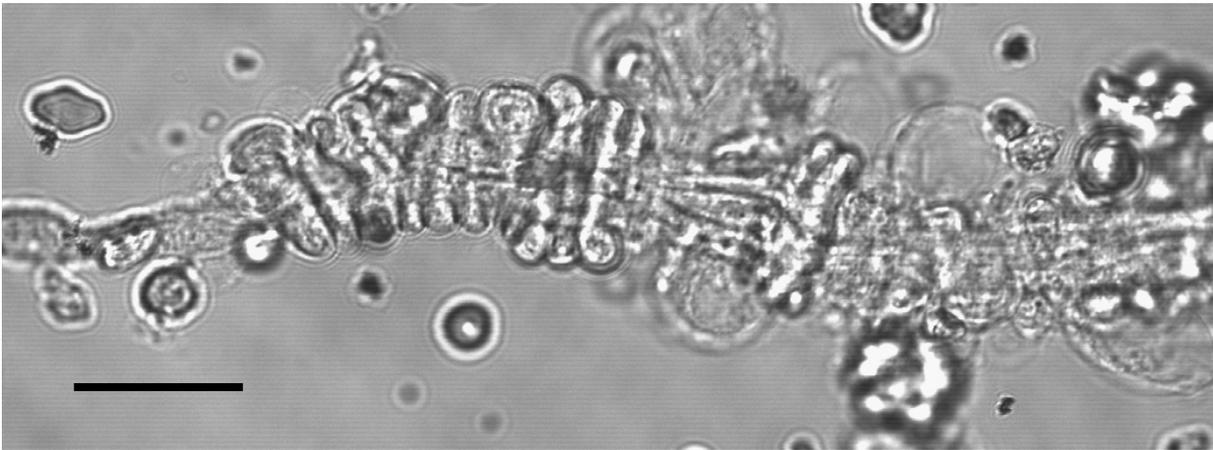
b- Structure des cellules épithéliales apicales de prostate de souris**A****B**

Figure 13 : Acinus de prostate latérale de souris obtenu par microscopie confocale en lumière transmise. A : Barre 20 μm ; B : Barre 10 μm , agrandissement de la figure 13 A.

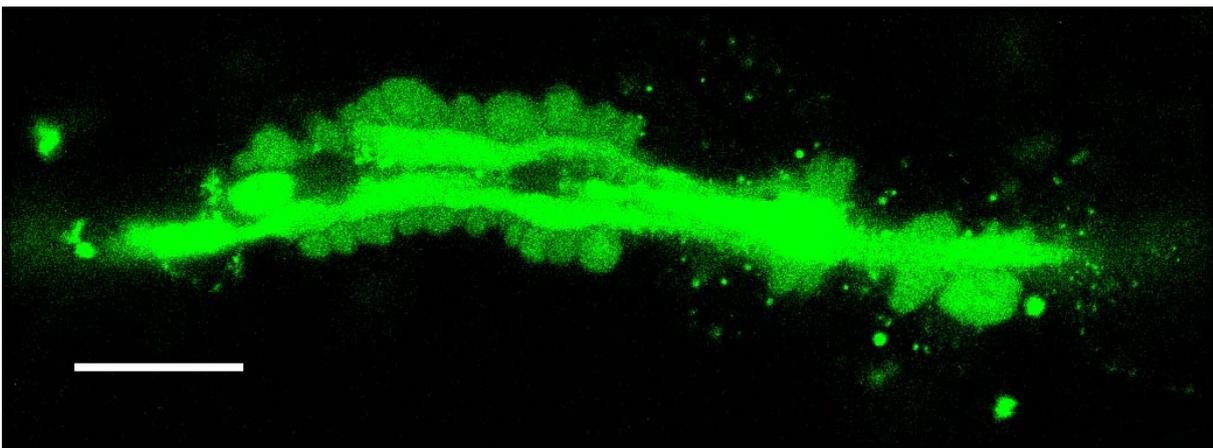
La préparation dont sont issues les photos ci-dessus a été obtenue après une dissociation mécanique et enzymatique de lobes latéraux de prostate de souris. La figure 13A représente un morceau d'acinus de forme caractéristique. La figure 13B, un agrandissement de la photo précédente, présente 2 cellules épithéliales apicales typiques. Le noyau est positionné au niveau du pôle basal. Le RE occupe la partie centrale de la cellule, alors que les granules de sécrétion se situent au pôle apical. Cette structure avait été préalablement mise en évidence en microscopie électronique par le Dr Christian Slomianny.

c- Dissociation d'un canal prostatique

A



B



C



Figure 14 : Images d'un canal de prostate latérale de souris obtenu en microscopie confocale. Barre : 20 μm . A : Image en lumière transmise ; B : Image de la fluorescence des cellules chargées en Fluo4 AM (5 μM) ; C : superposition des images A et B.

Cette technique de dissociation nous permet d'obtenir des cellules isolées, des morceaux d'acini, mais également des canaux prostatiques, comme l'illustre la figure 14. Le canal (proprement dit) est formé de cellules épithéliales apicales et est entouré d'un manchon de cellules épithéliales basales. Ce modèle est très intéressant, car nous avons à notre disposition d'une part, deux types cellulaires distincts et d'autre part, des cellules alignées.

Nous pourrions ainsi exploiter ce modèle afin d'étudier les interactions entre ces différentes cellules en respectant au maximum les conditions physiologiques présentes au sein de l'organe. Nous pourrions notamment étudier la propagation des vagues calciques dans les cellules épithéliales apicales et l'implication éventuelle des cellules épithéliales basales.

Nous pourrions également comparer les réponses de ces deux types cellulaires vis-à-vis d'agonistes tels que l'acétylcholine. Dans l'exemple qui suit, nous avons appliqué de l'ACh (1 μM) sur ce canal (Figure 15). Seules les cellules apicales ont répondu, à l'inverse des cellules basales. L'ACh induit une vidange IP_3 suivie d'une entrée capacitive. La comparaison de ces résultats avec des souris KO, notamment pour TRPC1 dont le rôle est connu dans le SOC_{CC} (par coulage conformationnel) (Vanden Abeele et al., 2004), nous donnera des données intéressantes sur le rôle de ce canal dans des conditions plus physiologiques que celles offertes par les lignées cellulaires ou encore les cultures primaires sur plusieurs jours.

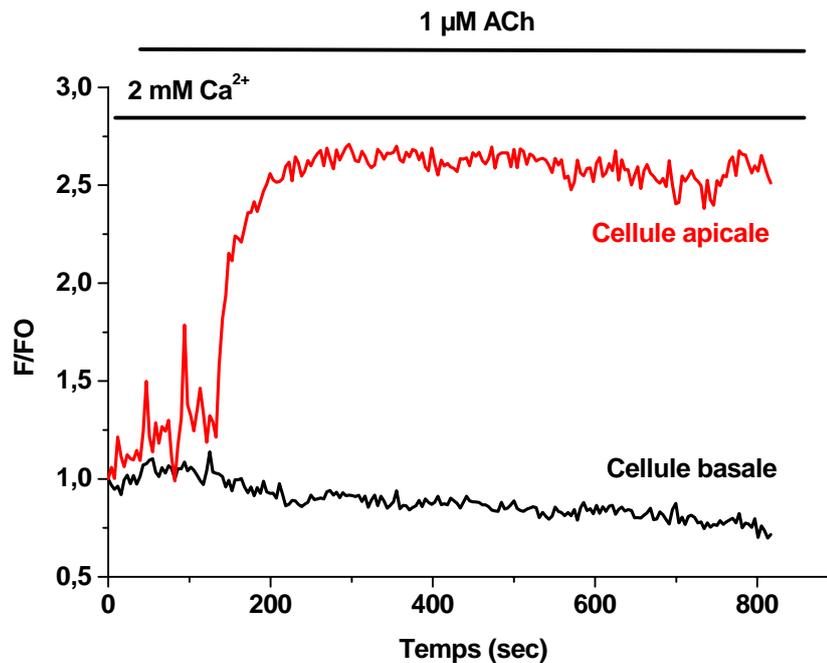


Figure 15 : Traces typiques illustrant les variations de concentration en calcium intracellulaire mesurées en microscopie confocale sur le canal (voir figure 14) chargé en Fluo 4 AM (5 μM) (Fluorescence mesurée/ Fluorescence initiale en fonction du temps). La perfusion d'ACh (1 μM) provoque une vidange de type IP₃ dans les cellules apicales suivie d'une entrée capacitive. Les cellules basales ne répondent pas à l'ACh.

2- Objectifs généraux des travaux :

a- Etude de la polarisation cellulaire

Nous projetons de réaliser de nombreuses études sur le modèle de cellules polarisées de prostate de souris. Hormis la polarisation, la préparation des cellules nous place dans un contexte plus physiologique que celui offert par les études sur les lignées cellulaires. Les interactions entre les cellules peuvent notamment être conservées.

Voici un aperçu des expériences prévues :

- Test d'agonistes sur la réponse calcique (ACh, Endothéline, menthol, iciline, ATP, ...).
- Etudes des interactions entre le RE et l'activation des canaux SOC (vidange par la Tg, la puromycine, le menthol, etc....). Quels sont les canaux SOC impliqués et les canaux de type TRP pouvant éventuellement jouer un rôle dans ce phénomène.
- Etude de la propagation des vagues calciques au sein d'une cellule et entre les cellules. Quels sont les seconds messagers impliqués ? Les mitochondries interviennent-elles en tamponnant la concentration intracellulaire en calcium ?

- Quelles sont les interrelations éventuelles entre les cellules épithéliales apicales et les cellules épithéliales basales ? Le calcium se propage-t-il de l'une à l'autre et si oui, dans quelles conditions ?

b- Etude de TRPM8

De nombreux travaux sont effectués sur le canal TRPM8 au sein du laboratoire.(Beck et al., 2006; Bidaux et al., 2005; Thebault et al., 2005). Comme mentionné dans le paragraphe précédent, nous pourrions étudier, dans un contexte plus physiologique, les liens existants entre la vidange du RE suite à l'activation de la forme réticulaire de TRPM8 et le développement du courant SOC (faisant intervenir la forme plasmique de TRPM8 ou non).

Nous allons bientôt recevoir une souche de souris KO pour TRPM8. Nous pourrions ainsi analyser quel est le rôle de TRPM8 dans l'homéostasie calcique au sein des cellules épithéliales apicales notamment. Le courant SOC sera-t-il modifié ? Les flux calciques enregistrés dans ces cellules seront-ils identiques et notamment la propagation des vagues calciques.

Nous projetons d'injecter des siRNA dirigé contre les ARNm codants pour TRPM8 dans les souris saines et dans le modèle TRAMP. Cette étude nous semble appropriée pour définir, chez la souris quelle est l'implication de TRPM8 dans le développement des tumeurs ainsi que dans la prolifération cellulaire.

c- Etude de TRPC1

Une étude du laboratoire a mis en évidence l'implication de TRPC1 dans l'activation du courant SOC par couplage conformationnel avec le récepteur IP3 (Vanden Abeele et al., 2004). Nous avons la possibilité d'obtenir une souche de souris KO pour TRPC1. Nous pourrions analyser notamment si le courant SOC est modifié dans les cellules de souris « sauvage » et de souris KO pour ce canal.

d- Etude cinétique du développement tumoral

Nous désirons également étudier l'impact des canaux de type TRP sur le développement tumoral. Pour cela, nous prévoyons d'utiliser comme modèles, des souris TRAMP qui recevront ou non des injections de siRNA afin d'inhiber l'expression de TRP d'intérêt et notamment TRPM8 et TRPC1. Ainsi, il serait possible d'analyser le rôle de ces canaux dans la cinétique de développement d'un carcinome des lobes dorsolatéraux de ces souris.

e- Etudes d'autres types cellulaires

D'autres modèles cellulaires attirent notre attention comme les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli. Ces deux types cellulaires sont, comme les cellules épithéliales prostatiques, sensibles aux androgènes. A plus ou moins long terme, nous pensons nous pencher sur le rôle éventuel des canaux TRP dans la physiologie de ces cellules.

3- Collaborations prévues :

- Docteur Florence Cabon pour les travaux utilisant les siRNA sur les souris (Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 9079, Institut André Lwoff, Villejuif, France).

- Par l'intermédiaire du Docteur Ambudkar, nous pourrions obtenir une lignée de souris KO pour TRPC1. (Docteur Indu Ambudkar (Secretary Physiology Section, GTTB, NIDCR, NIH, Bethesda, MD 20892, USA) et le Docteur L. Birnbaumer (Transmembrane Signaling Group, Laboratory of Signal Transduction, Division of Intramural Research, National Institute of Environmental Health Sciences, NIH, Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC 27709, USA)).

- Le Docteur Bolotina (Boston University School of Medicine, Boston, USA) nous fournira une lignée de souris KO pour iPLA₂. Ces animaux seront intéressants pour étudier le rôle de iPLA₂ dans l'activation du courant SOC, comme celui que nous avons mis en évidence dans les cellules LNCaP après application de puromycine (Flourakis et al., 2006).

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul, M. and Hoosein, N.** (2002a). Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Letters* **186**, 99-105.
- Abdul, M. and Hoosein, N.** (2002b). Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol Rep* **9**, 961-4.
- Abdul, M. and Hoosein, N.** (2002c). Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity. *Anticancer Research* **22**, 1727-30.
- Abrahamsson, P. A., Wadstrom, L. B., Alumets, J., Falkmer, S. and Grimelius, L.** (1986). Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands. *Pathology, Research and Practice* **181**, 675-83.
- Ali, S., Pellegrini, I. and Kelly, P. A.** (1991). A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 20110-7.
- Basrai, D., Kraft, R., Bollensdorff, C., Liebmann, L., Benndorf, K. and Patt, S.** (2002). BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuroreport* **13**, 403-7.
- Beck, B., Bidaux, G., Bavencoffe, A., Lemonnier, L., Thebault, S., Shuba, Y., Barrit, G., Skryma, R. and Prevarskaya, N.** (2006). Prospects for prostate cancer imaging and therapy using high-affinity TRPM8 activators. *Cell Calcium*.
- Berridge, M. J.** (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *BioEssays* **17**, 491-500.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L.** (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-29.
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D.** (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- Berrino, F.** (2003). The EURO CARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies. *Annals of Oncology* **14 Suppl 5**, v9-13.
- Bhattacharyya, M. L., Sarker, S., Mull, K. P. and Debnam, Q.** (1997). Clofilium-induced block of delayed rectifier type K⁺ current in atrial tumor cells (AT-1 cells). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **29**, 301-7.
- Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Tagliatela, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, M. et al.** (1998). hERG encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Research* **58**, 815-22.
- Bidaux, G., Roudbaraki, M., Merle, C., Crepin, A., Delcourt, P., Slomianny, C., Thebault, S., Bonnal, J. L., Benahmed, M., Cabon, F. et al.** (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* **12**, 367-82.
- Binggeli, R. and Weinstein, R. C.** (1986). Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *Journal of Theoretical Biology* **123**, 377-401.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. and Kelly, P. A.** (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* **19**, 225-68.
- Bolotina, V. M.** (2004). Store-operated channels: diversity and activation mechanisms. *Sci STKE* **2004**, pe34.
- Boutin, J. M., Edery, M., Shirota, M., Jolicoeur, C., Lesueur, L., Ali, S., Gould, D., Djiane, J. and Kelly, P. A.** (1989). Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* **3**, 1455-61.

Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H. L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclouhier, H., Reed, J. C. et al. (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19**, 329-36.

Bruggemann, A., Stuhmer, W. and Pardo, L. A. (1997). Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 537-42.

Bruyninx, M., Hennuy, B., Cornet, A., Houssa, P., Daukandt, M., Reiter, E., Poncin, J., Closset, J. and Hennen, G. (1999). A novel gene overexpressed in the prostate of castrated rats: hormonal regulation, relationship to apoptosis and to acquired prostatic cell androgen independence. *Endocrinology* **140**, 4789-99.

Campanella, M., Pinton, P. and Rizzuto, R. (2004). Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease. *Biological Research* **37**, 653-60.

Cancela, J. M., Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V. and Petersen, O. H. (2000). Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca²⁺ release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *EMBO Journal* **19**, 2549-57.

Cancela, J. M., Van Coppenolle, F., Galione, A., Tepikin, A. V. and Petersen, O. H. (2002). Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients: the combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers. *EMBO Journal* **21**, 909-19.

Carafoli, E., Santella, L., Branca, D. and Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 107-260.

Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A. and Izzo, N. J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2979-84.

Coiret, G., Matifat, F., Hague, F. and Ouadid-Ahidouch, H. (2005). 17-beta-estradiol activates maxi-K channels through a non-genomic pathway in human breast cancer cells. *FEBS Letters* **579**, 2995-3000.

Czarnecki, A., Dufy-Barbe, L., Huet, S., Odessa, M. F. and Bresson-Bepoldin, L. (2003). Potassium channel expression level is dependent on the proliferation state in the GH3 pituitary cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1054-64.

Das, R. and Vonderhaar, B. K. (1995). Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Molecular Endocrinology* **9**, 1750-9.

Day, M. L., Winston, N., McConnell, J. L., Cook, D. and Johnson, M. H. (2001). tiK+ toK+: an embryonic clock? *Reproduction, Fertility, and Development* **13**, 69-79.

Denmeade, S. R., Jakobsen, C. M., Janssen, S., Khan, S. R., Garrett, E. S., Lilja, H., Christensen, S. B. and Isaacs, J. T. (2003). Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 990-1000.

Dubois, J. M. and Rouzair-Dubois, B. (2004). The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation. *European Biophysics Journal* **33**, 227-32.

Elso, C. M., Lu, X., Culiati, C. T., Rutledge, J. C., Cacheiro, N. L., Generoso, W. M. and Stubbs, L. J. (2004). Heightened susceptibility to chronic gastritis, hyperplasia and metaplasia in *Kcnq1* mutant mice. *Human Molecular Genetics* **13**, 2813-21.

Farias, L. M., Ocana, D. B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., Hinojosa, L. M., Lara, G., Villanueva, L. A., Vargas, C. et al. (2004). Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Research* **64**, 6996-7001.

Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2006). Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA₂-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB Journal* **20**, 1215-7.

Fukushi, Y., Kato, I., Takasawa, S., Sasaki, T., Ong, B. H., Sato, M., Ohsaga, A., Sato, K., Shirato, K., Okamoto, H. et al. (2001). Identification of cyclic ADP-ribose-dependent mechanisms in pancreatic muscarinic Ca(2+) signaling using CD38 knockout mice. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 649-55.

Furuya, Y., Lundmo, P., Short, A. D., Gill, D. L. and Isaacs, J. T. (1994). The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Research* **54**, 6167-75.

Gerasimenko, J., Maruyama, Y., Tepikin, A., Petersen, O. H. and Gerasimenko, O. (2003). Calcium signalling in and around the nuclear envelope. *Biochemical Society Transactions* **31**, 76-8.

Gingrich, J. R., Barrios, R. J., Morton, R. A., Boyce, B. F., DeMayo, F. J., Finegold, M. J., Angelopoulou, R., Rosen, J. M. and Greenberg, N. M. (1996). Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Research* **56**, 4096-102.

Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E. and Johnson, A. E. (1997). The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**, 535-44.

He, H., Lam, M., McCormick, T. S. and Distelhorst, C. W. (1997). Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *Journal of Cell Biology* **138**, 1219-28.

Heritage, D. and Wonderlin, W. F. (2001). Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 22655-62.

Hughes, F. M., Jr., Bortner, C. D., Purdy, G. D. and Cidlowski, J. A. (1997). Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 30567-76.

Jager, H., Dreker, T., Buck, A., Giehl, K., Gress, T. and Grissmer, S. (2004). Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Molecular Pharmacology* **65**, 630-8.

Johnson, M. H. and Day, M. L. (2000). Egg timers: how is developmental time measured in the early vertebrate embryo? *BioEssays* **22**, 57-63.

Kabir, S. M., Bhattacharyya, M. L. and Robinson, T. R. (2000). Indapamide blocks the rapid component of the delayed rectifier current in atrial tumor cells (AT-1 cells). *International Journal of Cardiology* **73**, 27-32.

Kaneko, M. and Nomura, Y. (2003). ER signaling in unfolded protein response. *Life Sciences* **74**, 199-205.

Kim, P. S. and Arvan, P. (1998). Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocrine Reviews* **19**, 173-202.

Kunzelmann, K. (2005). Ion channels and cancer. *Journal of Membrane Biology* **205**, 159-73.

Kyprianou, N., English, H. F. and Isaacs, J. T. (1988). Activation of a Ca²⁺-Mg²⁺-dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate* **13**, 103-17.

Lastraioli, E., Guasti, L., Crociani, O., Polvani, S., Hofmann, G., Witchel, H., Bencini, L., Calistri, M., Messerini, L., Scatizzi, M. et al. (2004). hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Research* **64**, 606-11.

Lebrun, J. J., Ali, S., Goffin, V., Ullrich, A. and Kelly, P. A. (1995). A single phosphotyrosine residue of the prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4031-5.

- Lemonnier, L., Prevarskaya, N., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Nilius, B., Mazurier, J. and Skryma, R.** (2002a). Ca²⁺ modulation of volume-regulated anion channels: evidence for colocalization with store-operated channels. *FASEB Journal* **16**, 222-4.
- Lemonnier, L., Vitko, Y., Shuba, Y. M., Vanden Abeele, F., Prevarskaya, N. and Skryma, R.** (2002b). Direct modulation of volume-regulated anion channels by Ca(2+) chelating agents. *FEBS Letters* **521**, 152-6.
- Lindholm, D., Wootz, H. and Korhonen, L.** (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* **13**, 385-92.
- Lomax, R. B., Camello, C., Van Coppenolle, F., Petersen, O. H. and Tepikin, A. V.** (2002). Basal and Physiological Ca²⁺ Leak from the Endoplasmic Reticulum of Pancreatic Acinar Cells. Second Messenger-Activated Channels And Translocons. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26479-26485.
- Malhi, H., Irani, A. N., Rajvanshi, P., Suadicani, S. O., Spray, D. C., McDonald, T. V. and Gupta, S.** (2000). KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 26050-7.
- Mandic, A., Hansson, J., Linder, S. and Shoshan, M. C.** (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 9100-6.
- Mariot, P., Prevarskaya, N., Roudbaraki, M. M., Le Bourhis, X., Van Coppenolle, F., Vanoverberghe, K. and Skryma, R.** (2000). Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate* **43**, 205-14.
- Meyer, R. and Heinemann, S. H.** (1998). Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *Journal of Physiology* **508 (Pt 1)**, 49-56.
- Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J. B., Raeymaekers, L., Droogmans, G., Van Den Bosch, L. and Casteels, R.** (1996). Kinetics of the non-specific calcium leak from non-mitochondrial calcium stores in permeabilized A7r5 cells. *Biochemical Journal* **317 (Pt 3)**, 849-53.
- Mu, D., Chen, L., Zhang, X., See, L. H., Koch, C. M., Yen, C., Tong, J. J., Spiegel, L., Nguyen, K. C., Servoss, A. et al.** (2003). Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell* **3**, 297-302.
- Nevalainen, M. T., Valve, E. M., Ahonen, T., Yagi, A., Paranko, J. and Harkonen, P. L.** (1997a). Androgen-dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium in vivo and in organ culture. *FASEB Journal* **11**, 1297-307.
- Nevalainen, M. T., Valve, E. M., Ingleton, P. M., Nurmi, M., Martikainen, P. M. and Harkonen, P. L.** (1997b). Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 618-27.
- Nicotera, P. and Rossi, A. D.** (1994). Nuclear Ca²⁺: physiological regulation and role in apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* **135**, 89-98.
- O'Grady, S. M. and Lee, S. Y.** (2005). Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37**, 1578-94.
- Ouadid-Ahidouch, H., Le Bourhis, X., Roudbaraki, M., Toillon, R. A., Delcourt, P. and Prevarskaya, N.** (2001). 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 and Channels* **7**, 345-56.
- Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Ahidouch, A., Joury, N. and Prevarskaya, N.** (2004). Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C125-34.
- Pardo, L. A.** (2004). Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* **19**, 285-92.

- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S. and Stuhmer, W.** (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO Journal* **18**, 5540-7.
- Parihar, A. S., Coghlan, M. J., Gopalakrishnan, M. and Shieh, C. C.** (2003). Effects of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *European Journal of Pharmacology* **471**, 157-64.
- Park, H. R., Tomida, A., Sato, S., Tsukumo, Y., Yun, J., Yamori, T., Hayakawa, Y., Tsuruo, T. and Shin-ya, K.** (2004). Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1300-10.
- Park, M. K., Petersen, O. H. and Tepikin, A. V.** (2000). The endoplasmic reticulum as one continuous Ca(2+) pool: visualization of rapid Ca(2+) movements and equilibration. *EMBO Journal* **19**, 5729-39.
- Patel, A. J. and Lazdunski, M.** (2004). The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)* **448**, 261-73.
- Petersen, O. H., Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., Mogami, H. and Tepikin, A. V.** (1998). The calcium store in the nuclear envelope. *Cell Calcium* **23**, 87-90.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Vacher, P., Daniel, N., Bignon, C., Djiane, J. and Dufy, B.** (1994). Early effects of PRL on ion conductances in CHO cells expressing PRL receptor. *American Journal of Physiology* **267**, C554-62.
- Prevarskaya, N. B., Skryma, R. N., Vacher, P., Daniel, N., Djiane, J. and Dufy, B.** (1995). Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and JAK2 tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 24292-9.
- Putney, J. W., Jr. and Ribeiro, C. M.** (2000). Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 1272-86.
- Raffo, A. J., Perlman, H., Chen, M. W., Day, M. L., Streitman, J. S. and Buttyan, R.** (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Research* **55**, 4438-45.
- Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J. and Lee, A. S.** (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 20915-24.
- Remontet, L., Esteve, J., Bouvier, A. M., Grosclaude, P., Launoy, G., Menegoz, F., Exbrayat, C., Tretare, B., Carli, P. M., Guizard, A. V. et al.** (2003). Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique* **51**, 3-30.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Brini, M., Chiesa, A., Filippin, L. and Pozzan, T.** (1999). Mitochondria as biosensors of calcium microdomains. *Cell Calcium* **26**, 193-9.
- Robert, V., Pinton, P., Tosello, V., Rizzuto, R. and Pozzan, T.** (2000). Recombinant aequorin as tool for monitoring calcium concentration in subcellular compartments. *Methods in Enzymology* **327**, 440-56.
- Robinette, C. L.** (1988). Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate. *Prostate* **12**, 271-86.
- Rouzair-Dubois, B. and Dubois, J. M.** (1998). K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *Journal of Physiology* **510 (Pt 1)**, 93-102.
- Roy, A. and Wonderlin, W. F.** (2003). The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 4397-403.
- Rui, H., Lebrun, J. J., Kirken, R. A., Kelly, P. A. and Farrar, W. L.** (1994). JAK2 activation and cell proliferation induced by antibody-mediated prolactin receptor dimerization. *Endocrinology* **135**, 1299-306.

- Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. and Korsmeyer, S. J.** (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11357-62.
- Shen, M. R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J. C. and Nilius, B.** (2000). Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *Journal of Physiology* **529 Pt 2**, 385-94.
- Shirota, M., Banville, D., Ali, S., Jolicoeur, C., Boutin, J. M., Edery, M., Djiane, J. and Kelly, P. A.** (1990). Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology* **4**, 1136-43.
- Simon, S. M. and Blobel, G.** (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**, 371-80.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X. L., Van Coppenolle, F., Shuba, Y., Vanden Abele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B. and Prevarskaya, N.** (2000). Store depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *Journal of Physiology* **527 Pt 1**, 71-83.
- Skryma, R., Van Coppenolle, F., Dufy-Barbe, L., Dufy, B. and Prevarskaya, N.** (1999). Characterization of Ca^{2+} -inhibited potassium channels in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Receptors and Channels* **6**, 241-53.
- Sorin, B., Goupille, O., Vacher, A. M., Paly, J., Djiane, J. and Vacher, P.** (1998). Distinct cytoplasmic regions of the prolactin receptor are required for prolactin-induced calcium entry. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 28461-9.
- Suzuki, T. and Takimoto, K.** (2004). Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. *Int J Oncol* **25**, 153-9.
- Takagi, K., Okabe, Y., Yoshimura, K. and Ichikawa, Y.** (1986). Changes in intracellular K^{+} and Na^{+} ion concentrations during cell growth and differentiation. *Cell Structure and Function* **11**, 235-43.
- Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y. et al.** (2005). Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 39423-35.
- Theyer, G., Schirmbock, M., Thalhammer, T., Sherwood, E. R., Baumgartner, G. and Hamilton, G.** (1993). Role of the MDR-1-encoded multiple drug resistance phenotype in prostate cancer cell lines. *Journal d Urologie* **150**, 1544-7.
- Tinel, H., Cancela, J. M., Mogami, H., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V. and Petersen, O. H.** (1999). Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca^{2+} signals. *EMBO Journal* **18**, 4999-5008.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S. F., Hao, Y. H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G. and Bezprozvanny, I.** (2006). Presenilins form ER Ca^{2+} leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* **126**, 981-93.
- Van Coppenolle, F., Le Bourhis, X., Carpentier, F., Delaby, G., Cousse, H., Raynaud, J. P., Dupouy, J. P. and Prevarskaya, N.** (2000). Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride. *Prostate* **43**, 49-58.
- Van Coppenolle, F., Skryma, R., Ouadid-Ahidouch, H., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Dewailly, E., Humez, S., Crepin, A., Gourdou, I. et al.** (2004a). Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K^{+} channel activation. *Biochemical Journal* **377**, 569-78.
- Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Carpentier, F., Le Bourhis, X., Ahidouch, A., Croix, D., Legrand, G., Dewailly, E., Fournier, S., Cousse, H. et al.** (2001). Effects of

hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E120-9.

Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E. and Prevarskaya, N. (2004b). Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *Journal of Cell Science* **117**, 4135-42.

Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Gordienko, D., Beck, B., Panchin, Y. V., Baranova, A. V., Ivanov, D. V., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2006). Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *Journal of Cell Biology* **174**, 535-46.

Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J. B., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2004). Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 30326-37.

Vanden Abeele, F., Roudbaraki, M., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2003). Store-operated Ca²⁺ Current in Prostate Cancer Epithelial Cells. ROLE OF ENDOGENOUS Ca²⁺ TRANSPORTER TYPE 1. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 15381-9.

Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F. and Prevarskaya, N. (2002). Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* **1**, 169-79.

Vanoverberghe, K., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Lepage, G., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2004). Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* **11**, 321-30.

Wang, H., Zhang, Y., Cao, L., Han, H., Wang, J., Yang, B., Nattel, S. and Wang, Z. (2002). HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Research* **62**, 4843-8.

Wang, L. and Duff, H. J. (1996). Identification and characteristics of delayed rectifier K⁺ current in fetal mouse ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* **270**, H2088-93.

Wang, L., Feng, Z. P., Kondo, C. S., Sheldon, R. S. and Duff, H. J. (1996). Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circulation Research* **79**, 79-85.

Wang, Z. (2004). Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)* **448**, 274-86.

Warmke, J., Drysdale, R. and Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* **252**, 1560-2.

Yang, T., Snyders, D. J. and Roden, D. M. (1997). Rapid inactivation determines the rectification and [K⁺]_o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current in cardiac cells. *Circulation Research* **80**, 782-9.

Yao, X. and Kwan, H. Y. (1999). Activity of voltage-gated K⁺ channels is associated with cell proliferation and Ca²⁺ influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sciences* **65**, 55-62.

Yu, S. P. and Choi, D. W. (2000). Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9360-2.