

Université des Sciences et Technologies de Lille

Année 2006

N°d'ordre :

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

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

Discipline : Biologie-Santé

Par

Gabriel BIDAUX

Caractérisation du canal calcique TRPM8 dans la physiopathologie de la prostate humaine

Thèse dirigée par le Prof. Natalia PREVARSKAYA

Soutenue le 7 Décembre 2006

Jury :

Pr. P. Formstecher, Directeur de Recherche INSERM

Président

Dr. F. Cabon, Directeur de recherche INSERM

Rapporteur

Dr. P. Lory, Directeur de recherche CNRS

Rapporteur

Dr. M. Benahmed, Directeur de recherche INSERM

Examineur

Dr. F. Lesage, Directeur de recherche INSERM

Examineur

Dr. M. Roudbaraki, Maître de conférence

Examineur

Pr. R. Skryma, Professeur d'Université

Examineur

Pr. N. Prevarskaya, Professeur d'Université

Examineur

Caractérisation du canal calcique TRPM8 dans la physiopathologie de la prostate humaine

Seconde cause de mortalité par cancer chez l'individu de sexe masculin, le cancer de la prostate présente une incidence croissante liée à l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays développés. Initialement androgéno-dépendant, le carcinome de la prostate évolue vers un état d'androgéno-réfractaire dans les stades avancés du cancer de la prostate et dans les métastases. Cette progression vers l'état androgéno-réfractaire est associée à un mauvais pronostic. C'est pourquoi, la recherche biomédicale se concentre sur la mise au point de nouveaux marqueurs pour caractériser les différents phénotypes des carcinomes de la prostate. Cette recherche a aussi pour but de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques putatives utilisables en recherche clinique pour tenter de guérir le cancer.

Le calcium étant l'un des facteurs de régulation de la différenciation, de la prolifération et de l'apoptose, les modifications de l'homéostasie calcique pourraient participer à l'évolution du cancer de la prostate. Les canaux calciques de la superfamille des TRP (« Transient Receptor Potential ») sont des candidats prometteurs de la régulation du calcium intracellulaire des cellules non excitables. Nous nous sommes plus particulièrement intéressé au canal TRPM8, car son expression est relativement spécifique de la prostate et augmente dans les cellules cancéreuses. Nos résultats montrent que l'expression de TRPM8 est finement régulée par le récepteur des androgènes dans les cellules épithéliales apicales de la prostate et que son apparition coïncide avec la différenciation terminale des cellules apicales épithéliales. Nous démontrons de surcroît que le canal est fonctionnel dans le plasmalemme des cellules épithéliales de la prostate, mais aussi dans la membrane du réticulum endoplasmique. Cependant lors de la différenciation épithéliale, la fonction réticulaire de TRPM8 apparaît plus tôt que sa fonction plasmalemmique révélant ainsi une régulation ciblée de la localisation de TRPM8. Finalement, en corrélant ces travaux avec d'autres réalisés sur des cellules cancéreuses et métastatiques de la prostate, nous avons proposé un modèle d'évolution de l'activité du canal TRPM8 au cours de la différenciation et de l'oncogénèse des cellules de la prostate.

Nous avons, d'autre part, mis en évidence l'existence d'isoformes de TRPM8 dont certaines sont des canaux ioniques fonctionnels alors que d'autres sont de petites protéines tronquées agissant comme sous-unités régulatrices du canal TRPM8. Pour finir, nous avons caractérisé une voie d'activation du canal TRPM8 par la phospholipase A2 indépendante du calcium et nous avons réalisé une étude pharmacologique démontrant l'activation de TRPM8 par une classe de molécules dérivées de l'iciline.

Characterization of the TRPM8 channel in human prostate physiopathology

Prostate cancer is the most commonly diagnosed neoplasm in men and the second cause of cancer-related death in North America and Western Europe. The incidence of prostate cancers increases rapidly with aging. Initial androgen-dependent prostate cancers evolve in androgen-independent high grade carcinoma and metastasis. This evolution of prostate cancer is associated with a bad prognostic. Therefore, it is critical to understand the mechanisms involved in PCa progression in order to develop reliable prognostic markers and define new therapeutic treatment strategies.

The role of calcium in global cancer-related cell signaling pathways is uncontested. Alterations in calcium homeostasis caused increase proliferation, as well as induced differentiation or apoptosis. According to a growing number of articles, Transient Receptor Potential (TRP) cationic channels are key players in calcium homeostasis and cell physiopathology. In recent years, the TRPM8 (TRP, Melastatine member 8) channel has emerged as a promising prognosis marker and putative therapeutic target in prostate cancer. Indeed, high levels of TRPM8 mRNA have been found in both benign prostate hyperplasia and prostate cancer, compared to normal epithelial prostate cells. Our data indicate a tight regulation of the *trpm8* gene by androgen receptor and testosterone during differentiation of apical epithelial prostate cells. Besides, we demonstrated that the TRPM8 channel is functional in both plasma and endoplasmic reticulum membranes. Despite, reticular TRPM8 was expressed and functional early in apical differentiation of epithelial cells, plasma TRPM8 was only expressed in mature secretory apical epithelial cells – highlighting the dual regulation/location of both TRPM8 in plasma and endoplasmic reticulum membranes. Moreover, these data compiled with TRPM8 analysis in prostate cancer cells lead us to propose a hypothetical model which represents dual TRPM8 activities through differentiation and carcinogenesis of prostate cells.

Furthermore, we characterized a new functional TRPM8 isoform specific of endoplasmic reticulum membrane and short TRPM8 variants likely acting as regulatory sub-units of the functional TRPM8 channel. We also show that activation of calcium-independent phospholipase A2 pathway leads to TRPM8 current activation. Finally, we characterized a new class of TRPM8-agonist derived from icilin, which, potentially, could be useful for diagnosis, monitoring and therapy of prostate cancer.

À ma femme et mes parents,

« Doubter de tout ou tout croire sont deux solutions également commodes, qui l'une et l'autre nous dispensent de réfléchir. »

Henri Poincaré.

Aux membres du jury:

Pr. P. Formstecher, Dr. F. Cabon, Dr. P. Lory, Dr. M. Benahmed, Dr. F. Lesage, Dr. M. Roudbaraki, Pr. R. Skryma et Pr. N. Prevarskaya.

Mesdames, Messieurs les membres du jury, veuillez accepter mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté de juger ma thèse.

Ayant bien conscience du temps nécessaire que vous avez consacré à la lecture critique et à l'analyse de ce travail, j'espère, humblement, participer à l'enrichissement de vos connaissances sur les canaux ioniques, plus particulièrement sur TRPM8.

Monsieur le Président,

Vous présidez déjà le jury INSERM/Région Nord-pas-de-Calais m'ayant accordé mon financement de thèse. C'est donc pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de juger ma thèse et de présider ce jury.

Madame le Docteur F. Cabon et Monsieur le Docteur M. Benahmed,

Recevez toute ma gratitude pour nos collaborations passées et pour celles à venir.

Monsieur le Docteur M. Roudbaraki,

Après m'avoir formé aux techniques et à l'esprit de la biologie moléculaire, après m'avoir soutenu et constamment suivi au long de cette thèse, merci de participer à ce jury final.

Madame le Professeur N. Prevarskaya,

Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir fait continuellement confiance tout au long de ces quatre années.

Comme il serait trop long de tous vous citer un par un, je remercie vivement tous les membres du laboratoire pour leur professionnalisme et leur patience que j'ai souvent mis à l'épreuve. J'ai eu l'occasion de collaborer avec la presque totalité d'entre-vous et je dois admettre que ce fut un plaisir de pouvoir ainsi travailler en équipe. Finalement, je vous remercie pour la bonne humeur ambiante qui règne généralement au laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mrs Gilbert Lepage et Philippe Delcourt. J'ai en effet eu la charge, partagée avec le Dr. Morad Roudbaraki, de former Philippe et Gilbert aux techniques de biologie moléculaire. Ce fut un réel plaisir de pouvoir collaborer avec vous deux et je vous remercie pour tout le travail que vous avez accompli, qu'il fut pour moi ou pour les autres membres du laboratoire. Vu l'expansion réussie du groupe de biologie moléculaire au sein du laboratoire d'électrophysiologie, nous vous devons tous une fière chandelle.

Roman : au-delà de vos conseils et de votre grande connaissance de l'électrophysiologie, je vous remercie pour votre humour et pour avoir participé à l'éveil scientifique d'un jeune étudiant de DEUG, il y a de longues années... Vous étiez en effet, l'un des seuls enseignants qui expliquait aux étudiants ce qu'est la recherche et comment réussir une bonne thèse. Alors au delà des différences entre biologie moléculaire et électrophysiologie : merci.

Natacha, durant ces quatre années nous avons eu maintes fois l'occasion de discuter de sciences, de politique, de plongées et autres. J'ai conscience de ce que je vous dois, alors comme les pages me manquent : merci pour votre confiance, votre intérêt, votre patience et surtout votre compréhension.

Morad, comme je sais que tu serais gêné si j'écrivais trop de remerciements, je ferai court : durant ces années où tu m'as formé, compris et soutenu, tu es devenu un ami en plus d'un collègue de travail. Pour tout cela et le reste, je te remercie.

Ben et Matt, ou Matt et Ben : dommage que notre collaboration est commencée si tardivement...en tout cas merci pour votre efficacité, votre passion, votre intérêt et votre amitié tout au long de ces années. Pour leur amitié, et les quelques moments de vie privée partagés, merci à : Lolo, Stéph, Slava, Michou, Alex, Flo, Maria, Charbel...

** : Pour finir, sur les conseils de Roman et avec humour et dérision, je me remercie pour tout le travail accompli durant ces quatre années. J'espère pouvoir dormir plus à l'avenir et passer plus de temps avec ma femme (écrit sous la contrainte).*

Table des matières

<u>Table des matières</u>	1
<u>Glossaire</u>	9
<u>Introduction</u>	14
I) <u>Physiologie et physiopathologie de la prostate</u>	
I.A) <u>La prostate : organe exocrine</u>	
I.A.1) Anatomie générale.....	15
I.A.2) Histologie	
<i>I.A.2.a) Le stroma</i>	16
<i>I.A.2.b) Le tissu glandulaire</i>	17
<i>I.A.2.c) Les cellules neuroendocrines</i>	18
I.A.3) Fonctions de la prostate.....	19
I.A.4) Rôle des androgènes	19
I.B) <u>Aspects cliniques</u>	
I.B.1) Les pathologies	
<i>I.B.1.a) La prostatite</i>	22
<i>I.B.1.b) L'adénome ou hyperplasie bénigne</i>	22
<i>I.B.1.c) L'adénocarcinome de la prostate</i>	22
<i>I.B.1.d) Le cancer neuroendocrine pur</i>	23
I.B.2) La classification oncologique	
<i>I.B.2.a) Le système TNM</i>	24
<i>I.B.2.b) Le score de Gleason</i>	25
I.B.3) Les thérapeutiques	25
I.B.4) Caractéristiques cellulaires et moléculaires du cancer de la prostate	

<i>I.B.4.a) L'origine cellulaire</i>	26
<i>I.B.4.b) Causes moléculaires</i>	26
<i>I.B.4.c) L'échappement hormonal</i>	28
<i>I.B.4.d) La résistance à l'apoptose</i>	29

II) Rôle du calcium dans la cellule

II.A) <u>Compartimentation de l'ion calcique</u>	31
--	----

II.B) « Le signal calcique »

II.B.1) Homéostasie calcique et signal calcique	31
II.B.2) Signature calcique	31
II.B.3) Notion de « calciosome »	33

II.C) Fonction du signal calcique

II.C.1) Régulation moléculaire

<i>II.C.1.a) Transcription</i>	34
<i>II.C.1.b) Activité protéique</i>	36

II.C.2) Régulation des grandes fonctions cellulaires

<i>II.C.2.a) Prolifération</i>	36
<i>II.C.2.b) Apoptose</i>	38
<i>II.C.2.c) Sécrétion</i>	38
<i>II.C.2.d) Différenciation</i>	38

III) Rappels sur les mécanismes de régulation génique

III.A) <u>Les promoteurs alternatifs</u>	40
III.B) <u>L'épissage alternatif</u>	41
III.C) <u>L'ARN interférence</u>	43

IV) La superfamille des canaux calciques TRP

IV.A) <u>Historique : de la drosophile à l'homme</u>	44
--	----

IV.B) <u>Classification et structures communes</u>	44
IV.C) <u>Grandes classes de mécanismes d'activation des canaux TRP</u>	
IV.C.1) ROC, VOC : les oubliés.....	47
IV.C.2) SMOC et SOC	48
IV.C.3) « MOC » : les mécanorécepteurs.....	50
IV.C.4) « TOC » : les thermorécepteurs.....	50
IV.C.5) Les TRP modulés par le voltage.....	52
IV.C.6) Les « Chanzymes »	52
IV.D) <u>Diversité de fonctions des canaux TRP</u>	
IV.D.1) TRPC5 : élongation des neurites	53
IV.D.2) TRPV5, TRPV6 : absorption du Ca ²⁺	54
IV.D.3) TRPM5 : senseur du goût.....	54
IV.D.4) TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV4 : thermorécepteurs.....	55
IV.E) <u>Les canaux TRP dans les pathologies</u>	55
IV.E.1) Surexpression de gènes et cancers (TRPM8, TRPV6)....	56
IV.E.2) Perte de fonction et cancer (TRPM1).....	56
IV.E.3) Mutation et hypomagnésie (TRPM6).....	57
IV.E.4) Polycystine et rein (TRPP)	57
IV.E.5) Sclérose glomérulaire segmentaire focale (TRPC6).....	57
V) <u>Le canal TRPM8</u>	
V.A) <u>TRPM8 : récepteur au froid des neurones thermosensoriels</u>	59
V.B) <u>Régulation de l'activité du canal TRPM8</u>	63
V.C) <u>TRPM8 dans la sphère uro-génitale et le cancer</u>	64
<u>Problématiques et objectifs</u>	66

<u>Matériels et méthodes</u>	69
I) <u>Culture cellulaire</u>	
I.A) <u>Les lignées cellulaires</u>	70
I.B) <u>La culture de cellules primaires</u>	
I.B.1) Protocole par dissociation trypsique	71
I.B.2) Protocole de mise en culture d'explants	72
I.C) <u>Congélation/décongélation</u>	73
I.D) <u>Préparation des milieux spéciaux</u>	
I.D.1) Sérum « déstéroïdé »	74
I.D.2) Milieu standard pour la culture primaire	74
II) <u>Transfection</u>	
II.A) <u>Transfection transitoire</u>	
II.A.1) Lipofection	74
II.A.2) Nucleofection	75
II.B) <u>Etablissement de lignées stables</u>	76
III) <u>Biologie moléculaire</u>	
III.A) <u>RT-PCR</u>	77
III.B) <u>SCRT-PCR</u>	79
III.C) <u>Clonage</u>	
III.C.1) Clonage par PCR	
III.C.1.a) Clonage de long fragment d'ADN (>2 kpb)	80
III.C.1.b) Clonage de fragment d'ADN (< 2 kpb)	81
III.C.2) Clonage par restriction	81
III.D) <u>Mutagenèse dirigée</u>	83

III.E) <u>Bactéries chimio-compétentes, transformation et criblage des bactéries</u>	84
III.F) <u>Extraction de plasmide</u>	88
III.G) <u>Séquençage</u>	88
IV) <u>Immunodétection</u>	
IV.A) <u>Extraction des protéines</u>	89
IV.B) <u>Western-blot</u>	89
IV.C) <u>Immunoprécipitation</u>	90
IV.D) <u>Immunofluorescence</u>	91
IV.E) <u>Immunohistochimie</u>	92
IV.F) <u>Purification de protéines histidinylées</u>	92
IV.G) <u>Coloration au bleu de Coomassie</u>	93
V) <u>Microscopie</u>	
V.A) <u>Microscope inversé en lumière transmise</u>	94
V.B) <u>Microscopie confocale</u>	94
VI) <u>Imagerie calcique</u>	
VI.A) <u>Le fura-2/AM</u>	94
VI.B) <u>Le fluo-4/AM</u>	95
VI.C) <u>Equipement optique</u>	95
VI.D) <u>Charge des cellules en sonde calcique</u>	95
VII) <u>Rappels relatifs à la technique de Patch-clamp</u>	96

VIII) <u>Mesure de viabilité cellulaire et apoptose</u>	
VIII.A) <u>Test de viabilité</u>	99
VIII.B) <u>Comptage Hoechst</u>	99
<u>Résultats</u>	101
I) <u>Régulation de l’expression de TRPM8 et fonctionnalité dans les cellules de la prostate.</u>	104
I.A) <u>Article 1</u>	105
I.B) <u>Article 2</u>	123
I.C) <u>Article 3</u>	138
II) <u>Caractérisation des isoformes de TRPM8</u>	167
II.A) <u>Résultats préliminaires : TRPM8 dans les cellules musculaires lisses de la prostate.</u>	168
II.B) <u>Résultats préliminaires : TRPM8 dans les kératinocytes</u> ...	173
II.C) <u>Article 4</u>	180
II.D) <u>Résultats supplémentaires : clonage de sTRPM8-7b</u>	214
III) <u>Contrôle de l’activité du canal TRPM8</u>	
III.A) <u>Article 5</u>	218
III.B) <u>Article 6</u>	241
<u>Discussion</u>	252
I) <u>Rôle de TRPM8 dans la physiologie de la prostate</u>	

I.A) <u>TRPM8, spécifique de la prostate ?</u>	253
I.B) <u>Rôle de _{PM}TRPM8</u>	253
I.C) <u>Rôle de _{ER}TRPM8</u>	256
II) <u>Rôle de TRPM8 dans la cancérogénèse de la prostate</u>	
II.A) <u>TRPM8 et oncogénèse</u>	259
II.B) <u>TRPM8 : marqueur diagnostique et pronostique du cancer</u>	260
II.C) <u>Quel rôle pour TRPM8 dans le cancer</u>	261
III) <u>Rôles des petites isoformes de TRPM8</u>	
III.A) <u>Dans les cellules de la prostate</u>	263
III.B) <u>Dans les neurones thermosensibles</u>	266
<u>Perspectives</u>	268
I) <u>Description du(es) rôle(s) physiologique(s) de TRPM8 dans la prostate</u>	269
II) <u>Implication de TRPM8 dans la métastatase des cellules de la prostate</u>	270
III) <u>Régulation de l'activité du canal TRPM8</u>	271
IV) <u>Etude des isoformes de TRPM8 dans la peau et le foie humain</u>	272
<u>Conclusion générale de la thèse</u>	274

<u>Publications</u>	276
<u>Nouveau Chapitre de la Thèse 2006 (ABG-ED)</u>	279
<u>Annexes</u>	293
I) <u>Tables des oligonucléotides et siRNA</u>	294
II) <u>Séquences clonées et déposées dans GeneBank</u>	296
III) <u>Carte des vecteurs</u>	297
IV) <u>Composition des solutions</u>	304
<u>Bibliographie</u>	309

Glossaire

5α-DHT	: 5 α -DiHydroTestostérone
Ach	: Acéthylcholine
ADH	: Anti-Diuretic Hormone
ADN / DNA	: Acide DésoxyriboNucléique
ADP	: Adénosine DiPhosphate
AMP	: Adénosine MonoPhosphate
ANM	: Anisomycine
AR	: Androgen Receptor
ARE	: Androgen Response Element
ARN / RNA	: Acide RiboNucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adénosine TriPhosphate
BCA	: Acide Bicinchoninique
Bcl-2	: B-Cell Lymphoma-2
Bet	: Bromure d'éthidium
BPE	: Bovin Pituitary Extract
cADPR	: cyclic ADP ribose
CaM	: Calmoduline
CamKII	: Calmoduline Kinase II
cAMP / APMc ...	: Cyclic Adenosine 5'-MonoPhosphate
CaR	: Calcium Receptor
CCh	: Carbachol
CFP	: Cyan Fluorescent Protein
CHX	: Cycloheximide
CICR	: Calcium-Induced Calcium Release
CIF	: Calcium Influx Factor
cPLA2	: Phospholipase A2 dépendante du calcium
CRAC	: Calcium Release Activated Channel
CRE	: cAMP Respons Element
CREB	: CRE Binding Protein

Ct : Carboxyterminale
CTB : Cholera Toxine sub-unit B
Da : Dalton
DAG : DiAcylGlycerol
ddNTP : DiDeoxy Nucleotide TriPhosphate
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP : Deoxy Nucleotide TriPhosphate
DO/OD : Densité Optique/ Optical Density
DOC : sodium DeOxyCholate
DTT : DiThioThreitol;
ECACC : European Collection of Cell Culture
ECC : Entrée Capacitive de Calcium
EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGF : Epidermal Growth Factor
EGTA : Ethylène Glycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic acid
ERG : Electrorétinogramme
EST : Expressed Sequence Tag
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
G418 : Généticine
GFP : Green Fluorescent Protein
GPCR : G Protein Coupled Receptor/ Récepteur membranaire couplé aux petites protéines G.
HaCaT : kératinocytes humains immortalisé
HBP / BPH : Hyperplasie Bénigne de la Prostate
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HEK-293 : Human Embryonic Kidney 293
HEPES : (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid])
hPCE : human « prostate » Primary Cultured Epithelial cells
hPK : human Primary Keratinocytes
hSMC : human Smooth Muscle Cells
HVA : High voltage activated calcium channel
IGF : Insuline-like Growth Factor
IL-6 : Interleukine-6
IM : Inonmycine
IP3 : Inositol triPhosphate

IP3R..... : IP3 Receptor
iPLA2 : Phospholipase A2 indépendante du calcium
IPTG..... : IsoPropyl β -D-ThioGalactopyranoside
K-(5,8,10,14,18) : Kératines -(5,8,10,14,18)
KD : Knock-Down
K_D : constante de dissociation
kDa : kilo Dalton
KO : Knock-Out
kpb..... : kilo paire de bases
K-SFM..... : Keratinocyte Serum-Free Medium
LB : Luria Bertani medium ou Luria Broth, mais historiquement « Lysogeny Broth » (Bertani, 2004).
LH-RH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LNCaP..... : Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LPA : LysoPhosphatidic Acid
LPC : LysoPhosphatidylCholine
LPI..... : LysoPhosphatidylInositol
LPLs : LysoPhospholipids
LVA..... : Low voltage activated calcium channel
MAPK..... : Mitogenic Activated Proteins Kinase
MCP : Mort Cellulaire Programmée
“MOC”..... : Mechano-Operated Channel
NFAT..... : Nuclear Factor of Activated T-cell
NGF..... : Nerve Growth Factor
NMDA..... : N-Methyl D-Aspartate
NP : Normal Prostate
NSE..... : Neuron-specific Enolase
Nt..... : Aminoterminal
ORF..... : Open Reading Frame
p21 : p21^{Waf1/Cip1} protéine
PAP..... : Promoteurs Alternatifs Putatifs
pb..... : paire de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PC-3..... : human, Caucasian, prostate, adenocarcinoma, grade IV
PCa : Prostate cancer

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PIP₂..... : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou PtdIns(4,5)P₂
PKA : Protéine Kinase AMPC-dépendante
PKC : Protéine Kinase C
PKD1 et 2 : Polycystic Kidney Disease 1 et 2
PLC : Phospholipase C
PM : Plasma Membrane / Plasmalemma
PMA : Phorbol 12-myristate 13 acétate
PMCA : Plasma Membrane Calcium ATPase
PNT1A..... : Prostate Normal Transformed cell line, clone 1A
PrPCa..... : Prostate Primary Cancer cells
PrPE : Prostate Primary Epithelial cells
PS1..... : Prostate Smooth-muscle cell line, clone 1
PSA..... : Prostate Specific Antigen
PSCA..... : Prostate Stem Cell Antigen
PTHrP..... : ParaThyroid Hormone related-Protein
RE / ER..... : Réticulum Endoplasmique
RIPA..... : RadioImmuno Precipitation Assay Buffer
ROC..... : Receptor-Operated Channel
RPMI..... : Roswell Park Memorial Institut media
RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
RyR..... : Ryanodine Receptor
S.O.C. medium . : Super Optimal Catabolite repression (Hanahan, 1983)
SCRT-PCR : Single Cell Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE..... : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SERCA..... : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase
shRNA : short hairpined RNA
siARN : small interfering RNA
SMOC : Second Messenger-Operated Channel
SOC : Store-Operated channel
SOC_{CC} : SOC activé par couplage conformationnel
SOC_{CIF} : SOC activé par le CIF
STIM..... : STromal Interacting Molecule
sTRPM8-7b..... : short TRPM8 isoform 7b

sTRPM8 α : short TRPM8 isoform α
sTRPM8 β : short TRPM8 isoform β
TB..... : Terrific Broth
TG..... : ThapsiGargine
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TNT..... : Tris/NaCl/Tween-20
“TOC”..... : Thermo-Operated Channel
TRP..... : Transient Receptor Potential
TRPA..... : TRP AnkTM1
TRPC..... : TRP Canonical
TRPL..... : TRP-Like
TRPM..... : TRP Melastatin
TRPML..... : TRP Mucolipins
TRPP..... : TRP Polycystin
TRPV..... : TRP Vanilloid
UTR..... : UnTranslated Region
VIP..... : Vasoactive Intestinal Peptide
VOC..... : Voltage-Operated Channel
X-Gal..... : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
YFP..... : Yellow Fluorescent Protein
 β -NAD⁺..... : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

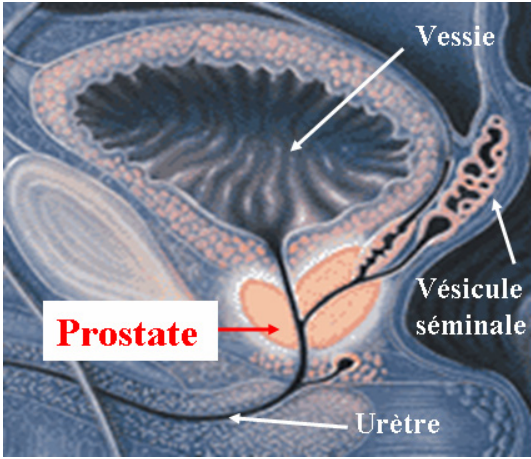
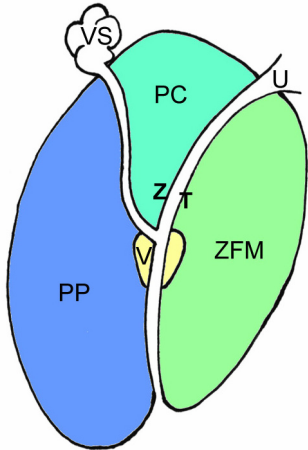
Introduction

I) Physiologie et physiopathologie de la prostate

I.A) La prostate : organe exocrine

I.A.1) Anatomie générale

La prostate (du grec *prostatês*, « qui se tient en avant ») est un petit organe situé en dessous de la vessie et en avant de la vésicule séminale (figure 1A). Cette glande exocrine, appartenant à l'appareil génital masculin, englobe le canal éjaculateur et la partie supérieure de l'urètre. Selon la représentation de McNeal (figure 1B), la prostate est couramment divisée en trois zones distinctes : (1) **la zone centrale**, qui entoure l'urètre et occupe 25 % du volume prostatique; (2) **la zone périphérique** plus volumineuse, qui englobe 70 % de la glande et (3) **la zone pré-prostatique** ou **zone de transition**, fine couche de tissu glandulaire, située de part et d'autre de l'urètre dans la partie centrale de la prostate qui ne représente que 5 % de la glande.

 <p>A sagittal cross-section of the male urogenital system. The bladder (Vessie) is at the top, with the seminal vesicle (Vésicule séminale) below it. The ureter (Urètre) passes through the prostate gland (Prostate), which is highlighted with a red arrow. The ureter is shown entering the bladder from the bottom.</p>	 <p>A schematic diagram of the prostate gland divided into four regions: PC (Prostate Centrale) in green at the top, ZT (Zone de Transition) in yellow in the center, ZFM (Zone Fibro-Musculaire) in light green on the right, and PP (Prostate Périphérique) in blue on the left. The seminal vesicle (VS) is at the top left, and the ureter (U) is on the right.</p>
<p><u>Figure 1.A :</u> Localisation de la prostate au sein de la sphère uro-génitale (section schématique représentative en coupe sagittale).</p>	<p><u>Figure 1.B :</u> répartition géographique des différentes régions de la prostate. La Zone Fibro-Musculaire (ZFM) est la partie antérieure de la prostate, la Prostate Centrale (PC) se situe sous la vessie, la Zone de Transition (ZT) entoure l'urètre. VS : vésicule séminale ; U : urètre.</p>

À la naissance, le tissu prostatique est formé d'un système simple de canaux dispersés dans un abondant stroma fibromusculaire. Avec la puberté, la croissance simultanée des structures glandulaires et du stroma fibromusculaire aboutit à l'aspect de la prostate adulte.

I.A.2) Histologie

La prostate est composée de deux couches histologiques principales : le stroma fibromusculaire et le tissu glandulaire consistant en un épithélium pseudo-stratifié. Ces deux tissus sont séparés l'un de l'autre par une lame basale (figure 2A).

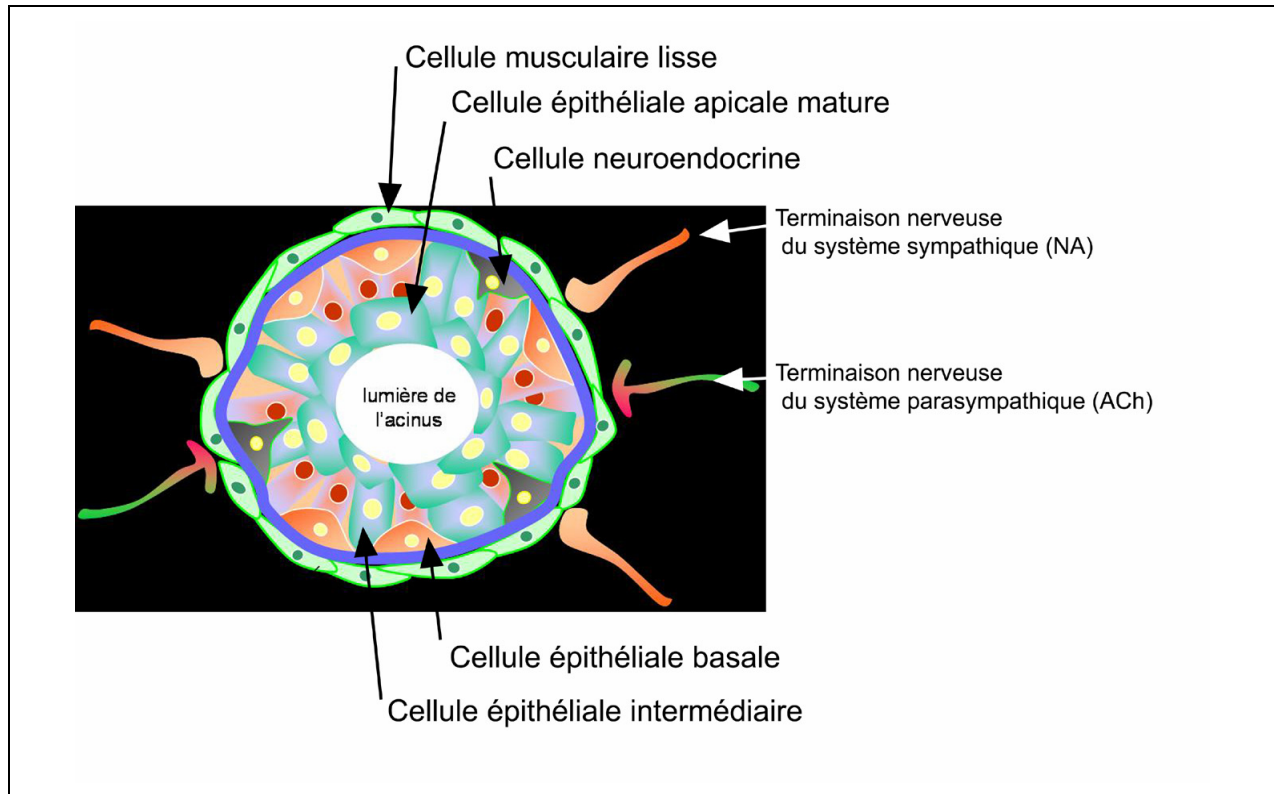


Figure 2 : représentation schématique de la structure cellulaire d'un acinus prostatique.

A noter : le stroma (zone noire) est formé d'un mélange de fibroblastes, de cellules musculaires lisses et de fibres protéiques de type collagène.

Il existe de surcroît un phénotype cellulaire particulier présent dans les deux compartiments précédemment définis : les cellules neuroendocrines.

I.A.2.a) *Le stroma*

Le stroma est principalement composé de fibroblastes et de cellules musculaires lisses. Hormis leur rôle de soutien du tissu glandulaire, ces deux types cellulaires participent au contrôle de la prolifération et au maintien de l'état de différenciation des cellules épithéliales adjacentes par la sécrétion de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF β (Transforming Growth Factor Beta), le NGF (Nerve Growth Factor) (Marengo and Chung, 1994) et d'hormones comme la prolactine (Untergasser et al., 2001), la PTHrP (ParaThyroid Hormone related-Protein (Blomme et al., 1998) et l'adrénaline (Smith et al., 2000). Les cellules musculaires lisses interviennent dans la contraction des zones glandulaires

entraînant la sécrétion du liquide prostatique lors de l'éjaculation. Ces cellules participent aussi à la régulation du débit sanguin dans la prostate lorsqu'elles entourent l'endothélium.

I.A.2.b) Le tissu glandulaire

Le tissu glandulaire de la prostate est formé par un épithélium pseudo-stratifié composé d'une couche jointive de cellules apicales sécrétrices et d'îlots sous-jacents de cellules basales.

- **Les cellules épithéliales basales** sont constituées du stock de cellules souches et de cellules peu différenciées permettant la régénération par différenciation de la couche de cellules luminales. Cette différenciation pourrait être contrôlée par les cellules stromales. Les cellules basales sont « androgéno-réfractaires » (l'ancien terme utilisé était : « androgéno-indépendantes » ; on parle aussi maintenant de « cellules résistantes à la castration ») et expriment des marqueurs spécifiques comme les cytokératines 5 et 14 (van Leenders et al., 2001; van Leenders and Schalken, 2003).

- **Les cellules épithéliales intermédiaires** n'ont ni reconnaissance histologique ni clinique car elles ne sont pas repérables d'un point de vue histologique. Le concept de cellule intermédiaire est né de l'idée que la différenciation est un processus séquentiel et dynamique (figure 3). Ainsi lors de leur différenciation en cellules épithéliales apicales, les cellules épithéliales basales acquièrent progressivement le récepteur des androgènes et les cytokératines 8 et 18 (marqueurs des cellules apicales), alors qu'elles expriment encore la cytokératine 5 (Schalken and van Leenders, 2003). Les cellules intermédiaires précoces possèdent le plus fort taux de prolifération du compartiment épithélial et sont dénommées « transit amplifying cells » (Heer et al., 2006; Peehl, 2005). Au contraire, les cellules intermédiaires plus tardives ne prolifèrent plus et expriment un fort taux d'AR fonctionnel qui induit alors la différenciation (Whitacre et al., 2002). La description de ce phénotype revêt toute son importance lors de l'étude des cellules cancéreuses de la prostate qui présentent généralement un phénotype très proche de celui des cellules épithéliales intermédiaires. Par exemple, les cellules intermédiaires et les cellules cancéreuses expriment toutes deux le PSCA (Prostate Stem Cell Antigen), initialement caractérisé dans les cellules souches de l'épithélium (Gu et al., 2000; Tran et al., 2002). Le modèle de souris KO pour PTEN (suppression courante dans les métastases de la prostate) développe des tumeurs exprimant des marqueurs de cellules épithéliales intermédiaires (PSCA et cytokératines 5, 8 et 18) (Wang et al., 2003; Wang et al., 2006).

La description de ce phénotype intermédiaire n'a pas modifié l'étude histopathologique des tissus mais a considérablement fait avancer le concept du phénotype cancéreux trop longtemps décrit comme homologue à celui des cellules apicales matures.

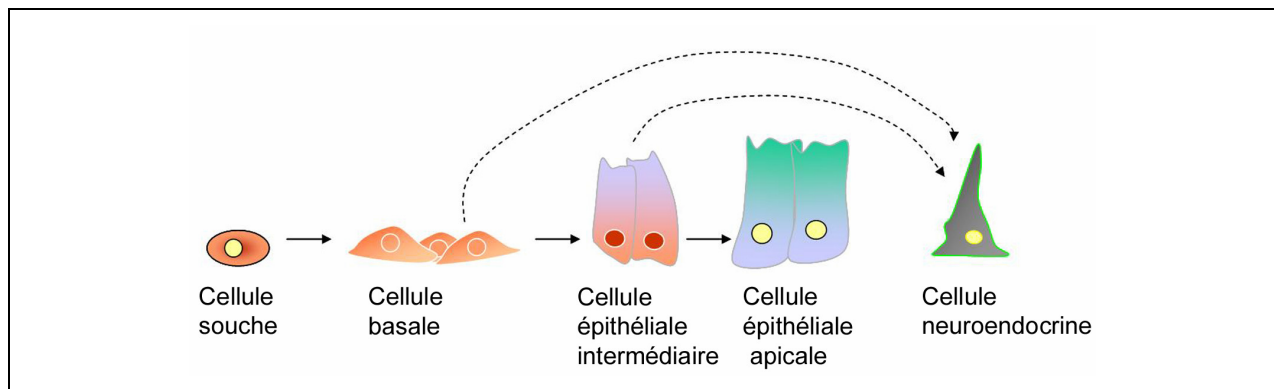


Figure 3 : représentation schématique de la différenciation cellulaire de l'épithélium prostatique. L'origine des cellules neuroendocrines dans les cas de cancers neuroendocrines purs fait toujours débat et est donc représentée ici par les deux flèches pointillées.

- **Les cellules épithéliales apicales** (aussi appelées **luminales**) bordent la lumière des acini. Elles sont dites androgéno-dépendantes car les androgènes (principalement la testostérone) contrôlent aussi bien leur prolifération que leur survie ou leur différenciation (Isaacs, 1999). Ces cellules sont principalement des cellules sécrétrices matures. Elles synthétisent et sécrètent les produits constitutifs du plasma séminal incluant la kalikréine 3 ou PSA (Prostate Specific Antigen), des phosphatases spécifiques de la prostate, des polyamines, mais aussi du citrate et des ions (Murphy et al., 1992).

I.A.2.c) Les cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines représentent le troisième phénotype présent dans la prostate. Ces cellules, peu nombreuses, sont isolées et dispersées dans le stroma et l'épithélium. Ces cellules sont d'origine ectodermique, plus exactement des crêtes neurales, alors que le reste de la prostate est d'origine endodermique. Elles produisent des substances semblables aux neurohormones comme la calcitonine, la sérotonine, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et renferment également des granules sécrétoires. D'autre part, elles expriment des marqueurs de type neuroendocrinien tels que la NSE (neuron-specific enolase), un marqueur couramment utilisé pour caractériser ces cellules (Schmechel et al., 1978), ainsi que la chromogranine A (Karlsson, 2001). Le rôle de ces cellules dans la physiologie de la prostate reste flou, mais certains travaux suggèrent que les cellules neuroendocrines participeraient au maintien des autres phénotypes. Certaines publications portant sur la transdifférenciation suggèrent que les cellules neuroendocrines cancéreuses puissent se former par transdifférenciation soit à partir des cellules épithéliales basales, soit à partir des cellules épithéliales intermédiaires, ou encore à partir des cellules épithéliales apicales lors de la perte d'activité du récepteur des androgènes (Bang et al., 1994; Mariot et al., 2002; Wright et al., 2003; Zelivianski et al., 2001). La question n'est toujours

pas tranchée et une autre étude a démontré que la transformation spécifique des cellules neuroendocrines de la prostate saine provoquait l'apparition d'un cancer neuroendocrine pur (Garabedian et al., 1998).

I.A.3) Fonctions de la prostate

- **Ejaculation** : de par sa localisation sous la vessie et comme elle entoure l'urètre, la prostate bénéficie d'une place privilégiée pour intervenir dans le processus mictionnel. Ces sphincters intra-prostatiques, situés autour de l'urètre, ferment l'urètre lors de l'éjaculation .

- **Sécrétion** : la partie glandulaire de la prostate est le siège d'une sécrétion exocrine intense représentant environ 30% du sperme. Les composés du liquide prostatique sont nombreux (cf. § I.A.2.c) ; parmi ceux-ci, au moins le zinc, le PSA et la neutral α -glucosidase interviennent directement dans l'activation des spermatozoïdes (Carpentier et al., 2004; Elzanaty et al., 2002). La prostate possède donc bien un rôle indirect, souvent méconnu, dans la reproduction.

I.A.4) Rôle des androgènes

Les androgènes sont par définition l'ensemble des hormones impliquées dans l'acquisition, le maintien et le fonctionnement des caractères mâles chez les individus. Ce sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol, c'est pourquoi elles présentent un caractère fortement hydrophobe leur conférant la capacité de diffuser librement à travers les membranes afin d'atteindre leurs récepteurs dans le cytoplasme ou le noyau des cellules. L'androgène prépondérant chez l'individu mâle est la testostérone. Synthétisée par les cellules de Leidig dans les testicules puis sécrétée dans le sang, la testostérone circule liée ou non à sa protéine de transport jusqu'à atteindre les organes cibles comme la prostate. Arrivée dans les cellules épithéliales intermédiaires, apicales épithéliales matures ou musculaires lisses, l'hormone est réduite par la 5α -réductase en sa forme active : la 5α -DiHydroTestostérone (5α -DHT), qui peut alors exercer son action sur les protéines cibles.

Les androgènes contrôlent principalement la différenciation des cellules apicales intermédiaires en cellules apicales épithéliales matures. D'autre part, ils limitent la prolifération des cellules normales mais stimulent celle des cellules cancéreuses. Les androgènes contrôlent aussi l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et participe ainsi à la résistance à l'apoptose (Berger et al., 2004; Nantermet et al., 2004; Whitacre et al., 2002; Zegarra-Moro et al., 2002). Ces contrôles physiologiques interviennent majoritairement par les effets génomiques des androgènes. Néanmoins quelques auteurs ont reporté l'existence d'effets non-génomiques.

- Effets génomiques.

Le mode d'action le plus connu et reconnu des androgènes s'exerce par un effet génomique. La 5 α -DHT se lie au récepteur des androgènes (AR) qui est alors transloqué dans le noyau où il agit comme facteur de transcription en régulant la transcription de ses gènes cibles. L'AR est un homodimère possédant une forte affinité pour une séquence nucléotidique spécifique aussi appelée « Androgen Response Element » (ARE). L'ARE est formé de deux hémi-sites de six nucléotides dont le second a pour séquence consensus « 5'-TGTTCT-3' » (Roche et al., 1992; Schoenmakers et al., 2000). Les gènes androgéno-dépendants (dont le promoteur est directement régulé par le récepteur des androgènes) possèdent souvent plusieurs ARE répartis sur leur promoteur proximal et/ou leur promoteur distal. Les gènes androgéno-dépendants les plus célèbres dans la prostate sont les gènes encodant le PSA et la probasine. Cependant, la voie des androgènes contrôle de nombreux autres gènes comme celui de l'IGF-BP3 (IGF Binding Protein 3) (Marcelli et al., 1995; Nantermet et al., 2004), du récepteur à l'IGF1 (Pandini et al., 2005), de la calréticuline (Zhu and Wang, 1999), ou encore celui de la protéine p53 (Nantermet et al., 2004).

Le récepteur des androgènes est donc un acteur essentiel de la détermination du transcriptome et donc, *in fine*, du phénotype des cellules androgéno-dépendantes. Néanmoins, beaucoup d'autres facteurs interviennent dans la modulation de l'activité du récepteur des androgènes, expliquant ainsi les différences de réponse entre les gènes cibles (cinétique, amplitude, sens de la régulation). Ainsi, la voie de l'interleukine 6 peut inhiber l'action du récepteur des androgènes en diminuant sa stabilité sur son ARE (Culig, 2003). Au contraire, l'interaction de la protéine Ca²⁺-calmoduline avec le récepteur des androgènes est une condition *sine qua non* à son bon fonctionnement (Cifuentes et al., 2004). En outre, de nombreux coactivateurs sont impliqués dans la régulation de l'activité du récepteur des androgènes. L'expression de ces coactivateurs fluctue au cours de l'oncogénèse de la prostate entraînant une régulation différentielle des gènes cibles de l'AR (Mestayer et al., 2003).

En conclusion, le récepteur des androgènes est un facteur de transcription majeur pour les cellules androgéno-dépendantes de la prostate, dont l'activité contrôle ou module indirectement les grandes fonctions physiologiques que sont la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

- Effets non génomiques.

Connus au plus tard depuis 1982 (Orsini, 1982), les effets non-génomiques ou non-génotropiques des androgènes sont relativement peu étudiés et donc beaucoup moins décrits que les effets génomiques. Par définition, les effets non-génomiques des androgènes signifient que les androgènes *via* ou non le récepteur des androgènes peuvent déclencher des effets biologiques

sans agir sur la régulation transcriptionnelle. La caractéristique première de ces effets non-génomiques est leur cinétique. Contrairement, aux effets génomiques qui sont détectables après plusieurs minutes (voire quelques heures), les effets non-génomiques déclenchent des réactions quasi-immédiates. D'autre part ces effets ne nécessitent pas de maturation préalable des stéroïdes par des aromatasés. Ainsi, la testostérone stimule des effets non-génomiques qui sont plus importants que ceux produits par la 5 α -DHT. Enfin, les concentrations nécessaires varient de 1 nM à 100 nM selon les modèles, mais restent dans les normes physiologiques.

L'effet non-génomique des androgènes le plus fréquemment reporté consiste en une activation d'un récepteur membranaire de type récepteur membranaire couplé aux petites protéines G (GPCR). L'activation de ce GPCR stimule une petite protéine G, sensible à la toxine pertussique, laquelle active alors la phospholipase C (Estrada et al., 2006). Cette enzyme dégrade ensuite le Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en Diacylglycerol (DAG) et en Inositol triPhosphate (IP3). L'IP3 provoque la vidange des stocks réticulaires de calcium suivie d'une Entrée Capacitive de Calcium (ECC) depuis le milieu extracellulaire (Estrada et al., 2006). Une caractéristique intéressante de ce phénomène est son comportement oscillatoire (fréquence d'environ 22 mHz) d'amplitude relativement stable (Estrada et al., 2006). Ce type d'effet a été décrit dans divers types cellulaires dont les neurones, les lymphocytes T, les macrophages, les ostéoblastes (Benten et al., 1999a; Benten et al., 1999b; Estrada et al., 2006; Lieberherr and Grosse, 1994).

Une étude portant sur les artères coronaires de rat a démontré que la testostérone provoquait une vasodilatation des artères en antagonisant l'entrée de calcium nécessaire à la constriction (Jones et al., 2004). Cet effet des androgènes bloquant une entrée de calcium depuis la matrice extracellulaire a aussi été reporté dans les cardiomyocytes de rat dans lesquels la testostérone diminue la probabilité d'ouverture (P_0) du canal calcique voltage-dépendant de type-T (Michels et al., 2006). Dans un travail similaire, Hall *et coll* avaient reporté l'inhibition du canal calcique voltage-dépendant de type-L dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Hall et al., 2006).

Dans la prostate, Bonaccorsi *et coll* ont mis en évidence que sous l'action des androgènes, AR interagit directement avec l'EGF récepteur (EGFR) et diminue son autophosphorylation (Bonaccorsi et al., 2006). Cette modulation de l'activation de la voie EGF est corrélée avec une diminution de l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate (Bonaccorsi et al., 2004).

I.B) Aspects cliniques

I.B.1) Les pathologies

Les pathologies les plus fréquentes, affectant la prostate, sont les prostatites (inflammations d'origine bactérienne), les adénomes (hyperplasies bénignes de l'épithélium) et les adénocarcinomes (cancers de l'épithélium).

I.B.1.a) La prostatite

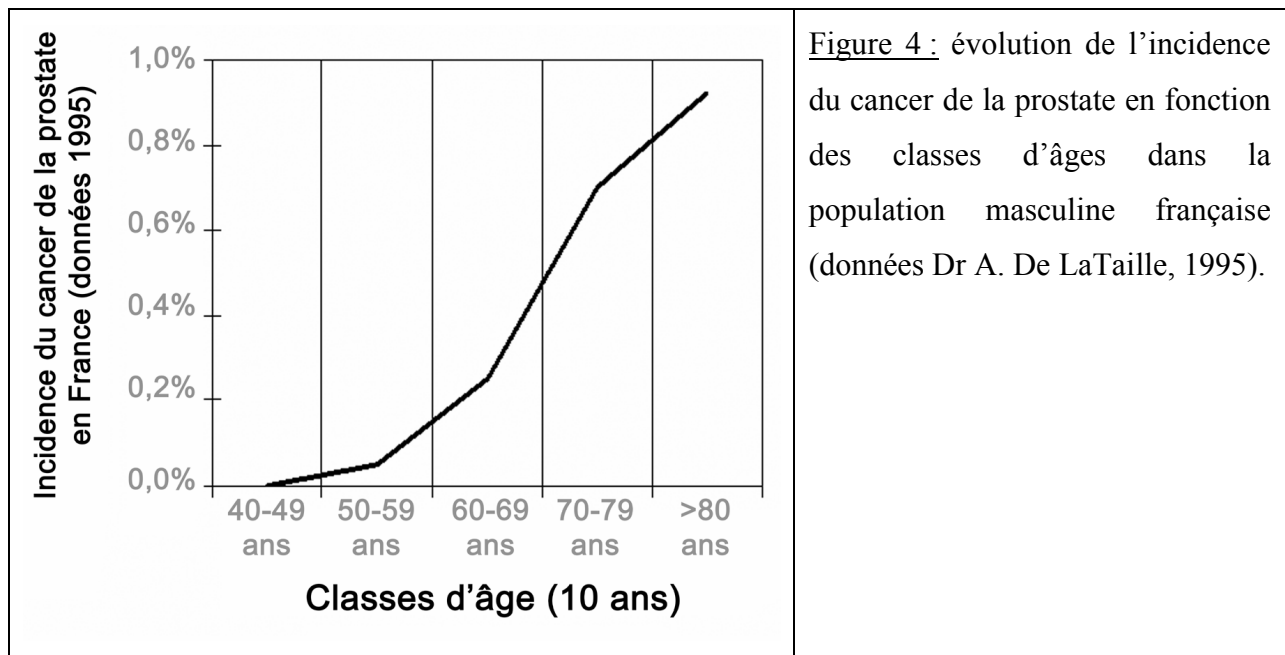
La prostatite est une atteinte inflammatoire souvent d'origine bactérienne. Elle est généralement traitée par des antibiotiques.

I.B.1.b) L'adénome ou hyperplasie bénigne

L'adénome, ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP), est une tumeur bénigne touchant de nombreux hommes vers la cinquantaine. Cette pathologie résulte d'une modification méconnue de l'organe et touche principalement la zone transitionnelle de la glande (figure 1.B). L'adénome est caractérisé par une augmentation de la taille des cellules glandulaires ce qui entraîne le grossissement de la prostate. Cette transformation de la glande prostatique provoque une irritation ainsi qu'une obstruction de l'urètre entraînant une gêne symptomatique lors de la miction.

I.B.1.c) L'adénocarcinome de la prostate

Avec plus de 40 309 cas déclarés et environ 10 004 décès par an en France (Remontet et al., 2003), le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'individu de sexe masculin et représente la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme après le cancer du poumon. Dans les pays développés, l'incidence du carcinome de la prostate augmente exponentiellement avec l'âge (figure 4) et le nombre de cas déclarés croîtra inéluctablement avec l'allongement de l'espérance de vie dans les sociétés occidentales.



Cependant, l'épidémiologie a récemment mis en exergue l'importance de facteurs environnementaux sur l'apparition de la maladie tels que le mode alimentaire, (réf: livre, « pourquoi ce lourd tribut payé au cancer »). Ainsi pour une classe d'âge allant de 35 à 64 ans, le Japon possède une incidence 11 fois inférieure à celle de la population Hawaïenne. Pour la même tranche d'âge à San Francisco, la population noire présente une incidence de $7,24.10^{-4}$ contre $3,18.10^{-4}$ pour la population blanche.

Ce cancer glandulaire se développe principalement dans la zone périphérique de l'organe, ainsi que dans la zone transitionnelle (15%) et 5% des cas dans la zone centrale (figure 1.B). D'évolution plutôt lente, ce cancer, tout d'abord *in situ*, peut sortir de la capsule dans les stades plus avancés pour donner des métastases locorégionales puis lointaines. Le diagnostic de ce cancer est généralement basé sur un toucher rectal, un dosage du PSA circulant, une échographie avec biopsie et étude histopathologique pour caractériser le grade et le stade cancéreux en fonction soit du score de Gleason soit du système TNM (cf. § I.B.2). La présence de plus de 4 ng/ml de PSA total circulant est généralement associée à un risque tumoral. Cependant, un taux de PSA entre 2 à 4 ng/ml est parfois aussi associé à un cancer. Or la valeur du PSA total de 4 ng/ml est souvent utilisée comme seuil de risque. De nouvelles études ont montré que le calcul du ratio du PSA libre sur le PSA total permettait d'affiner le diagnostic (Pelzer et al., 2005). Bien qu'ayant considérablement amélioré le dépistage du cancer de la prostate, le dosage du PSA n'est pas suffisant pour affirmer la présence d'un cancer.

I.B.1.d) Le cancer neuroendocrine pur

Cette pathologie rare (<5% de tous les cancers de la prostate) touche les sujets plus précocement que l'adénocarcinome (entre 30 et 40 ans) et est généralement associée à un très

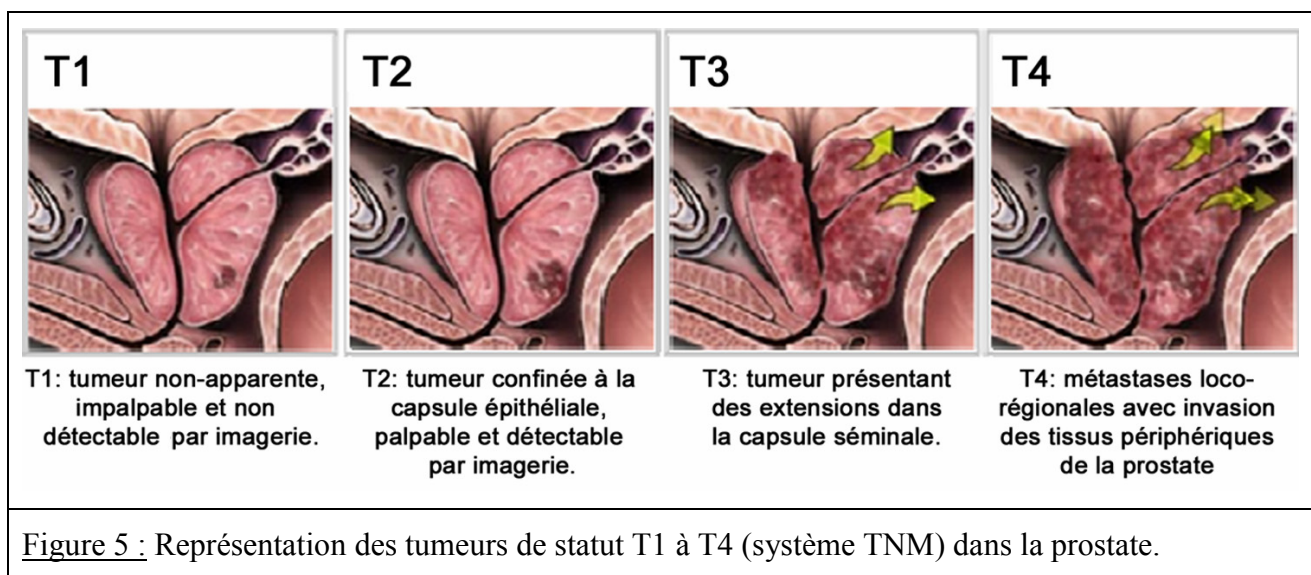
mauvais pronostic (Freschi et al., 2004). Les causes de la transformation de ces cellules neuroendocrines sont inconnues et les traitements anti-androgéniques sont sans effets, les cellules neuroendocrines étant hormono-réfractaires.

I.B.2) La classification oncologique

Deux systèmes de gradation sont couramment utilisés pour classer les cancers en fonction de leur degré oncologique : le système Tumeur, Node, Metastasis (TNM) qui évalue la localisation et la taille de la tumeur et le score de Gleason qui prend en compte l'état de différenciation du tissu cancéreux. Je décrirai brièvement ces deux systèmes afin de mieux appréhender leur signification.

I.B.2.a) Le système TNM

Le système de gradation TNM a été développé en 1977 par Ammon *et coll* (Ammon *et al.*, 1977), mais n'est couramment utilisé que depuis les années 90. Ce système évalue la taille de la tumeur et sa propagation extra-capsulaire (T), dans les ganglions lymphatiques (N) et dans les métastases lointaines (M) (figure 5).

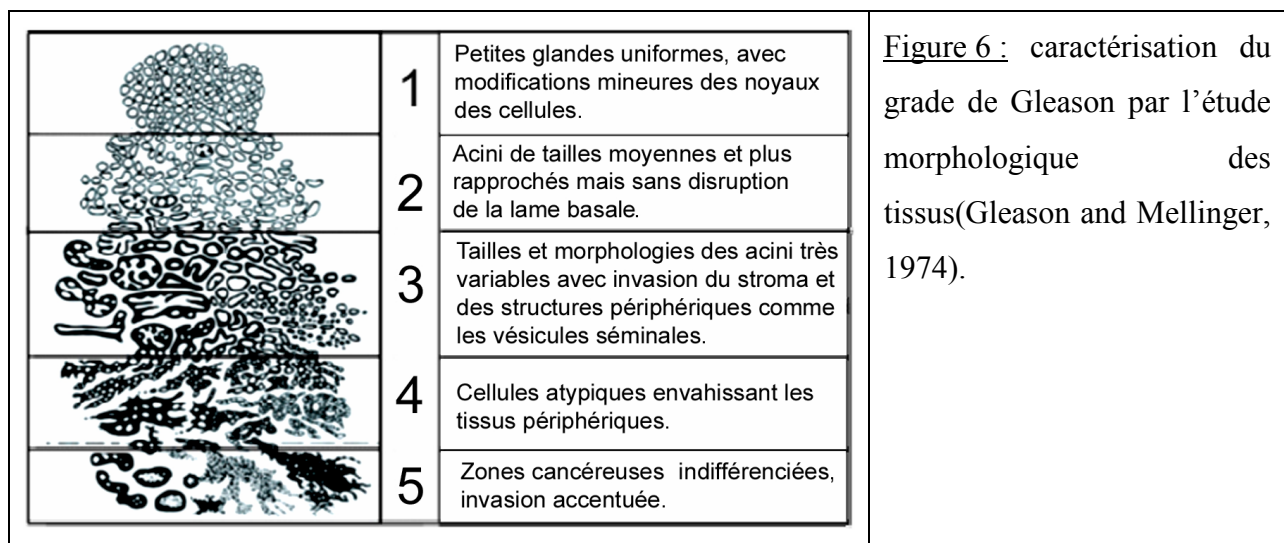


Les différents stades T1 (de a à c) caractérisent de petites tumeurs impalpables et difficilement détectables par échographie. Les tumeurs de stade T2 sont plus étendues, mais confinées à la capsule épithéliale. Elles sont détectables par palpation et peuvent être prélevées par une aiguille à biopsie. Le stade T3 représente des tumeurs ayant outrepassées la barrière de la lame basale et se propageant dans la prostate et dans les vésicules séminales. Le dernier stade (T4) définit les métastases locorégionales, c'est-à-dire les métastases ayant gagné les organes périphériques tels la vessie. La propagation des métastases loco-régionales aux ganglions lymphatiques est définie par le statut N (N0-N3) en fonction de leur taille et de la distance de

propagation, alors que le statut M (M0-M1) représente les métastases lointaines dans les organes comme le foie, les os ou le cerveau.

I.B.2.b) Le score de Gleason

En 1974, Gleason et Mellinger créèrent leur système de gradation du cancer de la prostate (Gleason and Mellinger, 1974). Ce système repose sur le degré de différenciation des cellules et sur l'anaplasie cellulaire. Le score de Gleason (2-10) est obtenu par la somme des deux grades les plus élevés (1-5), dans le tissu pathologique (figure 6). Les scores de Gleason de 2 à 4 caractérisent des cancers de bas grades, les scores 5-7 représentent les grades médians alors que les scores supérieurs à 7 définissent les cancers les plus avancés.



I.B.3) Les thérapeutiques

Les techniques utilisées pour soigner l'HBP sont des techniques de chauffage de la prostate par sonde rectale ou urétrale et par ultrasons focalisés. Quant à la chirurgie, elle consiste à retirer l'adénome central en conservant la capsule prostatique. Selon la taille de l'adénome, deux types d'interventions peuvent être employés : la résection endoscopique et l'adénomectomie par voie haute réservée aux prostatites très volumineuses.

Dans le cas du cancer, le traitement le plus utilisé reste la prostatectomie radicale par chirurgie. Cependant, dans certaines configurations, l'utilisation d'un traitement anti-androgénique peut s'avérer plus adéquate. Ces thérapies visent soit à diminuer les taux sériques d'androgènes (castration ou rétrocontrôle par des analogues de la LH-RH), soit à inhiber la 5 α -réductase responsable de l'activation de la testostérone en sa forme active la 5 α -DHT, soit à utiliser des antagonistes des androgènes (Casodex®). Le retrait des androgènes entraîne la « mort cellulaire programmée » (MCP) ou « apoptose », des cellules prostatiques androgéno-

dépendantes (Colombel et al., 1996). Cependant, il n'est pas rare que ces traitements provoquent l'émergence de cancers hormono-indépendants devenant incurables par cette même stratégie.

I.B.4) Caractéristiques cellulaires et moléculaires du cancer de la prostate

La cancérogénèse de la prostate est un processus mêlant mutations géniques, modifications phénotypiques et sélection clonale. Cette transformation a pour conséquence principale d'augmenter la résistance à l'apoptose des cellules de la prostate. Au cours de l'évolution du cancer vers les stades les plus avancés, les cellules se dédifférencient et acquièrent des mutations pro-prolifératives (Amirghofran et al., 2004). Puis, le cancer localisé évolue vers la métastase.

I.B.4.a) L'origine cellulaire

L'origine cellulaire porte encore à débat et deux grands scénarios s'affrontent : une transformation maligne des cellules épithéliales apicales ou une transformation des cellules souches épithéliales. Le phénotype des cellules de l'adénocarcinome de la prostate correspond principalement au phénotype apical sécrétoire mature (van Leenders and Schalken, 2003), c'est pourquoi le cancer est caractérisé par une augmentation du taux de PSA. Dans les stades les plus avancés ou lorsque l'hormono-indépendance s'installe, le phénotype intermédiaire devient majoritaire (van Leenders et al., 2002; van Leenders et al., 2001). Cependant quelques cancers sont des amalgames regroupant des cellules sécrétrices matures et des cellules apicales intermédiaires présentant parfois l'expression des marqueurs de cellules souches comme le « Prostate Stem Cell Antigen » (PSCA) (Gu et al., 2000; Wang et al., 2006). La première hypothèse stipule donc que les cellules apicales sécrétrices acquièrent un pouvoir prolifératif. La seconde hypothèse stipule que des dérégulations du cycle cellulaire des cellules souches basales et/ou des cellules apicales intermédiaires puissent induire une hyperprolifération de l'épithélium. Notons que ce mécanisme n'exclut pas le maintien de la différenciation apicale des cellules luminales.

I.B.4.b) Causes moléculaires

Selon le schéma habituel de la cancérisation, les cellules accumulent entre 4 et 5 événements de mutation avant leur transformation. Les mutations et autres dérégulations génétiques s'accumulent, faisant alors évoluer le cancer vers la métastase. Un répertoire des gènes subissant des altérations et intervenant dans le développement de la tumeur est décrit ci-après :

<p>Normal prostate cells</p> <ul style="list-style-type: none"> Presence of predisposing alleles (e.g. <i>RNASEL</i>, R462Q) Methylation of TSG promoters leading to epigenetic gene silencing Chromosome 8p loss AR CAG repeat alterations Vit D Receptor reduced activity 5αreductase (<i>SRD5A2</i>) increased activity CAPB (1p36) mutation HPC1 (1q24-25) mutation PCAP (1q42.2-43) mutation MSR1 (8p22-23) mutation KLF6 (10p15) mutation ELAC2 (17p11.2) mutation HPC20 (20q13) mutation HPCX mutation <p>↓</p> <p>Localised prostate cancer</p> <ul style="list-style-type: none"> Chromosome 16q loss Altered E-cadherin expression (16q) <i>RB1</i> (13q) loss p53 (17p) inactivation <i>GSTP1</i> (11q13) inactivation <p>↓</p> <p>Metastatic prostate cancer</p> <ul style="list-style-type: none"> Over expression of EZH2 polycomb protein Transcriptional silencing of many genes by histone deacetylation Increased BCL-2 expression Increased availability of adrenal steroids Loss of KAI-1 (11p) <i>PTEN</i> mutation <i>AR</i> gene amplification <i>AR</i> mutation <p>↓</p> <p>Androgen-independent prostate cancer</p> <ul style="list-style-type: none"> Abnormal phosphorylation of AR by 2nd messenger systems <hr/> <p>Selon: MK Karayi & AF Markham, Prostate Cancer and Prostatic Diseases (2004)</p>	<p><u>Tableau 1</u> : Répertoire des gènes connus pour subir des modifications (mutations, dérégulation de l'activité promotrice...) au cours des différentes phases de l'oncogénèse de la prostate (Karayi and Markham, 2004).</p>
---	---

Cette liste n'est en rien exhaustif, mais représente les modifications moléculaires reportées et connues pour participer à l'oncogénèse. Néanmoins, cette liste décrit les deux points importants de la cancérogénèse de la prostate : 1) il s'agit d'un mécanisme évolutif d'acquisition de mutations et de dérégulations géniques, et 2) affectant de nombreux gènes.

Le dernier stade de la cancérisation voit le développement de métastases migrant, en majorité, dans les ganglions lymphatiques proximaux et dans le tissu osseux. Ces cellules métastatiques acquièrent de très nombreuses mutations et présentent un génotype bouleversé. Elles sont souvent très agressives, ont un fort taux de prolifération et une grande résistance à l'apoptose. Ces cellules présentent, entre autre, une amplification de l'AR et/ou des mutations activatrices de cette protéine. Ces modifications jouent un rôle prépondérant dans le développement des métastases.

L'AR n'est pas oncogénique par lui-même. La génération de souris surexprimant l'AR a permis de démontrer que ces animaux développaient des néoplasies mais en aucun cas d'adénocarcinomes (Stanbrough et al., 2001). Ainsi, bien que stimulant la prolifération d'une

lignée cancéreuse de prostate en culture (Zegarra-Moro et al., 2002), l'AR n'a pas pour rôle primaire que le contrôle de la prolifération. En fait, il semblerait que le pouvoir « oncogénique » de l'AR provienne de la synergie d'action avec d'autres gènes régulant la prolifération (ex : *myc* et la famille *ets*). Une analyse massive par puces à ADN a récemment démontré que l'AR régule des gènes intervenant dans la physiologie des cellules apicales différenciées et que la diminution d'efficacité de la voie des androgènes dans les cancers tardifs et les métastases entraîne une réexpression de gènes contrôlant la prolifération et la résistance à l'apoptose (Hendriksen et al., 2006). C'est pourquoi, le traitement le plus souvent utilisé consiste soit à inhiber la synthèse de testostérone, soit à bloquer la fixation des androgènes sur leur récepteur.

I.B.4.c) L'échappement hormonal

Les cancers précoces sont, à l'origine, hormono-dépendants mais deviennent hormono-insensibles puis hormono-indépendants lors de l'évolution normale du cancer ou sous l'action d'un traitement anti-androgénique. L'échappement hormonal consiste donc bien en une perte de la régulation de l'AR par les androgènes et à la prévalence des régulations dites ligand-indépendantes. Ce mécanisme d'adaptation permet aux cellules devenues androgéno-réfractaires de continuer à croître malgré l'ablation des androgènes. C'est pourquoi le pronostic de ce cancer est très mauvais.

Il arrive aussi que les cellules cancéreuses perdent l'expression du RA. Dans ce cas, elles perdent l'expression des gènes régulés par l'AR et subissent alors des modifications phénotypiques très importantes. Ces cellules deviennent alors, par définition, androgéno-réfractaires bien que leur génotype soit fondamentalement différent de celui des cellules androgéno-réfractaires exprimant le RA.

Du point de vue moléculaire, l'échappement hormonal peut s'expliquer par différents mécanismes affectant le AR:

- Une augmentation de l'expression de l'AR consécutive à une amplification génique.
- Un changement de régulation de son promoteur.
- Des mutations du récepteur entraînant une activation constitutive indépendante du ligand ou une perte de spécificité de l'AR pour son ligand.

L'échappement hormonal s'accompagne souvent d'une évolution de la sécrétion paracrine vers la sécrétion autocrine. Ainsi, l'augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance ou du nombre de récepteurs tyrosine kinase participerait à la transformation des cellules en stimulant l'AR de manière ligand-indépendante (Fong et al., 1992; Montano and Djamgoz, 2004; Prewett

et al., 1996). Par exemple, un taux élevé d'IGF-1 dans les tumeurs prostatiques, accroît leur prolifération et peut stimuler l'activité de l'AR (Stattin et al., 2004).

I.B.4.d) La résistance à l'apoptose

La résistance à l'apoptose est l'une des caractéristiques les plus marquantes des cellules métastatiques de la prostate. L'apoptose ou mort cellulaire programmée (MCP) est un mécanisme physiologique tenant un rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (McConkey and Orrenius, 1997). En effet, l'apoptose est le garde-fou empêchant les tissus à forte régénération, comme les épithélia, de devenir hyperprolifératifs. L'apoptose intervient aussi lors de l'embryogénèse afin d'éliminer les cellules surnuméraires comme les neurones, les ovocytes ou encore le tissu interdigital. Ce mécanisme implique de nombreux gènes et protéines formant un réseau dynamique sensible aux stimuli externes et internes. L'altération d'une infime partie de ce réseau peut conduire au dysfonctionnement général de la MCP, immortalisant partiellement les cellules et générant un tissu devenu hyperprolifératif par défaut d'apoptose. Ce processus a été décrit dans le cas du cancer de la prostate (Thompson, 1995), dans lequel la surexpression de l'oncogène Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) entraîne une protection excessive des cellules cancéreuses contre la MCP (Chaudhary et al., 1999). Cette protection intervient *via* l'inhibition du déclenchement de l'apoptose par la voie mitochondriale. En outre, des travaux de notre laboratoire ont démontré que cette surexpression de la protéine Bcl-2 entraînait de profonds changements dans l'homéostasie calcique des cellules cancéreuses de la prostate (Vanden Abeele et al., 2002). Cependant, Bcl-2 n'est pas la seule protéine pro ou anti-apoptotique à être dérégulée dans le cancer. Par exemple, les protéines IAP (Inhibitor of apoptosis proteins) : les cIAP1 et 2 (cellular IAP), la XIAP (chromosome X linked IAP) et la survivine présentent toutes une expression fortement augmentée dans le carcinome de la prostate (Krajewska et al., 2003). Ces protéines IAP sont en fait des inhibiteurs endogènes des principales enzymes effectrices de la MCP : les caspases.

En résumé, les cellules cancéreuses de la prostate détournent les protéines anti-apoptotiques afin de survivre. Cette transformation des cellules leur permet d'accumuler toujours plus de mutations jusqu'à leur transformation en cellules métastatiques.

Conclusion :

Bien qu'étant une glande annexe de l'appareil reproducteur masculin, la prostate n'en reste pas moins un organe complexe. En effet, la synergie de fonctionnement des différents types cellulaires conduit, en partie, au bon déroulement de la reproduction et de la miction. D'un point

de vue moléculaire, le chef d'orchestre de cette symphonie cellulaire, apparaissant à la puberté, est le récepteur des androgènes et son ligand naturel la testostérone. Néanmoins, le temps altérant le bon fonctionnement des cellules, l'influence du récepteur des androgènes est « contournée » pour favoriser l'anarchie appelée cancer.

Les espoirs de la recherche actuelle sont nombreux, passant de la compréhension des phénomènes moléculaires de la cancérisation et son évolution vers l'échappement hormonal, à la recherche de nouveaux marqueurs diagnostiques et de cibles thérapeutiques. Nos travaux s'inscrivent dans cette démarche multi-modale en se focalisant spécifiquement sur le petit monde du calcium. S'appuyant sur de récentes études indiquant que les altérations de l'homéostasie calcique joueraient un rôle important dans la régulation des grandes fonctions cellulaires, nous allons introduire les notions de calcium, calciosome et homéostasie calcique.

II) Rôle du calcium dans la cellule

II.A) Compartimentation de l'ion calcique

L'ion divalent calcique (Ca^{2+}) est la plus petite « molécule » à être aussi bien compartimentée dans la cellule. Sa concentration est de l'ordre de 1 mM dans la matrice extracellulaire et dans le réticulum endoplasmique, mais oscillant de 100 nM à $>1 \mu\text{M}$ dans le cytosol. Cependant, sa répartition dans un compartiment n'est jamais homogène. En effet, il est présent sous forme libre et sous forme chélatée par des protéines. Ces protéines chélatrices sont présentes aussi bien dans le réticulum endoplasmique (ex : la calréticuline, la calbindine) que dans le cytosol (ex : la calmoduline, la calcineurine).

Cette compartimentation pourrait paraître stable si on mesurait la concentration de Ca^{2+} cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]$) pour un temps d'observation de plusieurs minutes ou de quelques heures. Néanmoins, une durée plus courte (secondes ou milliseconde) révélerait une dynamique insoupçonnée, conférant ainsi à l'ion Ca^{2+} un rôle de messager primordial.

II.B) « Le signal calcique »

II.B.1) Homéostasie calcique et signal calcique

L'homéostasie calcique est par définition un équilibre entre influx, efflux et stockage des ions Ca^{2+} . Elle est responsable du maintien de la compartimentation du calcium dans la cellule et par conséquent du maintien de la potentialité de créer un signal calcique. Ce signal calcique consiste en un ou plusieurs flux de calcium entre compartiments (généralement dans le sens du gradient de concentration) et est porteur d'un message « moléculaire ». Une fois ce message interprété par un réseau hiérarchisé, il entraîne l'activation ou la modulation d'une fonction cellulaire (prolifération, transcription...).

II.B.2) Signature calcique

La signature calcique d'une fonction biologique cellulaire ou moléculaire reflète les propriétés intrinsèques d'un ou plusieurs signaux calciques. C'est-à-dire que la signature calcique est définie par la cinétique, l'amplitude et la localisation subcellulaire du ou des signaux calciques.

- **Localisation** : outre la provenance du calcium (milieu extracellulaire ou stocks intracellulaires), l'étendue du signal calcique (événements localisés, vagues calciques intracellulaires, vagues calciques intercellulaires) définit directement le nombre et la spécificité des mécanismes induits (Berridge, 1993; Clapham and Sneyd, 1995). Les événements élémentaires, c'est-à-dire confinés à une petite région pré-membranaire définie, interviennent

dans des processus fins comme la sécrétion de neurotransmetteurs dans la synapse. Les vagues calciques intracellulaires correspondent à la diffusion d'une grande concentration de calcium et à l'ouverture de transporteurs répartis dans toute la cellule. Ces phénomènes régulent aussi bien les grandes fonctions cellulaires que la sécrétion des cellules épithéliales polarisées (Cancela et al., 2002) ou la contraction d'un cardiomyocyte. Enfin, les vagues intercellulaires entraînent une synchronisation entre les cellules permettant par exemple la contraction d'un organe. Cependant, vu la vitesse de diffusion du calcium et sa portée, ces vagues sont souvent le fait de la diffusion d'autres messagers comme l'Inositol TriPhosphate (IP3) qui provoque la vidange du Ca^{2+} réticulaire par les récepteurs IP3 (Berridge et al., 1998; Berridge et al., 2000a; Berridge et al., 2000b). La vidange réticulaire de Ca^{2+} est un phénomène transitoire n'excédant pas 100 sec et entraînant une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ d'une amplitude variant entre 200 et 500 nM (Lewis, 2001). La vidange réticulaire de Ca^{2+} est complétée par le phénomène d'Entrée Capacitive de Calcium (ECC). De fait, la vidange du calcium réticulaire est parallèle à la libération d'un mécanisme moléculaire, dont la nature reste l'objet de vifs débats dans la communauté scientifique. Ce mécanisme active les canaux membranaires de type SOC (« Store-Operated Channels ») dont l'ouverture entraîne le phénomène d'ECC. Cette ECC déclenche une entrée massive de calcium (jusqu'à quelques μM) dans toute la cellule participant ainsi à la vague calcique intracellulaire. Contrairement à la vidange transitoire du Ca^{2+} réticulaire, l'ECC est un phénomène soutenu qui peut perdurer plus d'une heure après la stimulation, alors même que le taux d'IP3 retourne à son niveau basal en 10 min (Lewis, 2001). Une étude récente a démontré que cette prolongation de l'activité de l'ECC était en partie due au relargage lent mais soutenu du Ca^{2+} absorbé par les mitochondries lors de la déplétion initiale des stocks de Ca^{2+} réticulaires (Hoth et al., 2000). Finalement, la vidange de Ca^{2+} peut aussi se produire spécifiquement dans le noyau. En effet, la continuité des membranes nucléaires et réticulaires définit un ensemble de citernes réticulaires. La localisation spécifique des canaux ioniques sur la membrane nucléaire permet donc de limiter spatialement l'augmentation du calcium libre cytosolique et ainsi induire un effet spécifique (cf. chapitre II.C.1.A).

- Cinétique : la régulation temporelle des signaux calciques est un élément essentiel de la définition du signal calcique. Ainsi, comme présenté dans la figure 7 (p36), il est généralement admis que des signaux calciques transitoires modulent aussi bien la sécrétion que la prolifération (Dolmetsch et al., 1998), alors qu'une augmentation soutenue de la concentration calcique cytosolique et la diminution conséquente du taux de Ca^{2+} dans la lumière du réticulum déclenche la MCP des cellules (Vanden Abeele et al., 2002; Vanoverberghe et al., 2004).

- Amplitude :

Les phénomènes calciques élémentaires sont souvent tributaires de leur nombre et de leur cinétique. En effet, c'est l'intégration globale de leurs activités en un signal d'amplitude supérieure au seuil d'activation des protéines effectrices qui promulgue la fonction biologique (PA, sécrétion, prolifération ou apoptose). Chaque protéine senseur de calcium possède une affinité spécifique pour le calcium qui détermine un seuil de concentration en calcium à partir duquel suffisamment de protéines senseur pourront être activées. Par exemple, la Ca^{2+} -calmoduline possède deux sites senseurs de calcium ayant une affinité différente pour le calcium. Ainsi en fonction du signal ou de la somme des signaux calciques, un des deux lobes ou les deux pourront être activés et ainsi jouer leurs rôles respectifs (Liang et al., 2003). En outre, le nombre de protéines calmoduline directement disponibles par canal calcique définira la facilité avec laquelle un message ionique sera intégré (en fonction de son amplitude). Plus le rapport calmodulines/canal ionique est important, plus la vitesse de régulation du canal et l'intégration du message ionique sera rapide (Mori et al., 2004). Cependant cette stoechiométrie perd de son importance avec l'augmentation de l'amplitude du flux ionique. En effet, lorsque la concentration de calcium libre devient localement saturante (concentration supérieure à la constante de dissociation des sites protéiques à affinité pour le calcium), toutes les protéines senseurs seront activées.

Rapportée au cas du cancer de la prostate, la notion de signature calcique signifie que des cancers différents pourront présenter des signatures calciques différentes sous l'action d'un même stimulus (hormone, facteur de croissance). Cette différence de signature calcique aboutit au déclenchement d'une fonction physiologique différente. Ainsi pour un stimulus externe identique, une cellule cancéreuse intégrera différemment le message ionique et réorientera sa réponse vers une fonction qui lui est nécessaire (ex : prolifération ou résistance à l'apoptose).

II.B.3) Notion de « calciosome »

Nous définirons "**LE CALCIOSOME**" comme étant le répertoire des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique et/ou une signature calcique. Ce calciosome est donc un ensemble de protéines caractérisables et potentiellement utilisables comme cibles dans l'optique de modifier une signature calcique donnée dans une pathologie donnée.

Le calciosome est constitué de trois groupes de protéines : les transporteurs (de type canal ou non) assurant la diffusion facilitée ou le transport actif des ions, les protéines chélatrices permettant de contrôler le taux de calcium libre et les protéines senseurs de calcium.

Les transporteurs calciques comme le canal Calcium Récepteur (CaR), les pompes calciques PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) et SERCA (SarcoEndoplasmic Reticular Calcium ATPase) et les cotransporteurs (échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) sont des protéines transmembranaires présentes dans toutes les membranes de la cellule (plasmique, endoplasmique, nucléaire et mitochondriales). Elles régulent directement les influx et les efflux de calcium entre les différents compartiments.

Les protéines chélatrices sont soit des protéines cytosoliques soit membranaires, elles sont aussi bien représentées dans le cytoplasme que dans la lumière du réticulum. Ces chélateurs protéiques interviennent dans la modulation spatiale et temporelle des concentrations de calcium libre et agissent donc en complément des transporteurs. Par définition, toute protéine pouvant interagir avec le calcium se comporte comme un chélateur.

Finalement, les senseurs calciques sont des protéines possédant des affinités variables pour le calcium et qui présentent la particularité de voir leur activité régulée par leur interaction avec l'ion calcique. Ces protéines sont présentes sur toute la voie de signalisation du calcium. Elles peuvent aussi bien intervenir dans la régulation de l'activité des transporteurs (ex : la calmoduline sur le canal calcique dépendant du voltage, de type L) que dans l'intégration du signal calcique aboutissant à la transcription de nombreux gènes (ex : la calcineurine fixe le calcium déclenche l'activation de la voie Nuclear Factor of Activated T-cell ; NFAT).

Le travail de cette thèse se focalise sur l'étude d'un gène encodant un transporteur calcique non sélectif présent à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane réticulaire.

II.C) Fonction du signal calcique

Aussi petit soit-il, l'ion calcique porte en lui la potentialité de participer à l'homéostasie cellulaire. Nous entendons par là qu'il est le messenger privilégié de bon nombre de stimuli contrôlant les mécanismes moléculaires (régulation génique, régulation protéique) impliqués directement dans les grandes fonctions physiologiques cellulaires (prolifération, différenciation et apoptose)

II.C.1) Régulation moléculaire

II.C.1.a) Transcription

La régulation de l'expression des gènes par le calcium est, en règle générale, initiée par les protéines senseurs de calcium dans le cytoplasme. Le principal senseur de calcium, la Ca^{2+} -calmoduline, est capable une fois activé de stimuler des kinases comme la CamK (Calmoduline-kinase) ou la PKA (Protein Kinase cAMP-dépendant). Ces enzymes peuvent alors phosphoryler le facteur de transcription CREB (cAMP-Response Element Binding) qui, en se fixant sur ces

séquences géniques spécifiques (CRE pour CREB Response Element), induit une augmentation de la transcription par stabilisation de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène. La signature calcique activant cette voie définit le niveau de la transcription des gènes cibles avec une extrême finesse (Cochran, 1993; van Haasteren et al., 1999).

L'autre voie impliquant la Ca^{2+} -calmoduline est celle de la calcineurine. Lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dépasse le seuil d'activation de la Calmoduline, la Ca^{2+} -calmoduline se lie à la phosphatase Calcineurine et l'active. La calcineurine déphosphoryle NFAT qui est alors transloqué dans le noyau en quelques minutes. Le facteur de transcription NFAT participe alors à l'augmentation du taux de transcription de ces gènes cibles dont certains gènes encodant des protéines participant au cycle cellulaire (Crabtree, 2001). Dès la diminution du taux de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, NFAT est rephosphorylé par une kinase et réexporté dans le cytosol en quelques minutes. L'hypersensibilité de ce complexe à la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ et la cinétique rapide d'import/export de NFAT nécessite un signal calcique tout aussi fin. L'activité de NFAT croît dès que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dépasse 150 nM et atteint son activité maximale pour une $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de 500 nM. Cependant, toute la complexité du système vient de la nature oscillatoire des signaux calciques. En effet, ce contrôle de la prolifération nécessite que l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ soit transitoire et répétitive afin de stimuler l'activité de NFAT de manière optimale et spécifique (Lewis, 2003).

D'autres voies ont été décrites comme celles des tyrosines kinases, celle du couple NF κ B/I κ B (Lewis, 2003; Sawami et al., 1992), mais ne seront pas l'objet de plus amples explications dans ce manuscrit.

Dans le cas de la prostate, la Ca^{2+} -calmoduline est prépondérante pour le bon fonctionnement de la voie du RA. En effet, il a été décrit que ces deux protéines interagissaient l'une avec l'autre et que la suppression de cette interaction bloquait la translocation du RA, même en présence de 5 α -DHT (Cifuentes et al., 2004; Reddy et al., 2006).

Etant donnée la répartition des transporteurs calciques dans la membrane nucléaire et la continuité des enveloppes réticulaires et nucléaires, il est aussi probable que le calcium puisse être directement libéré dans le noyau dans lequel des senseurs activeraient directement les facteurs de transcription sans nécessiter de translocation nucléaire depuis le cytosol. En 2003, Echevarria *et coll* ont démontré l'existence d'un réticulum nucléoplasmique, c'est-à-dire de boucles de membrane réticulo-nucléaires s'invaginant profondément dans le noyau des cellules (Echevarria et al., 2003). Nous avons observé ce type de structures dans notre récent travail sur un nouveau type de jonction GAP fonctionnelle dans la membrane réticulaire (Vanden Abeele et al., 2006). Plusieurs études ont démontré la présence de PLC, de récepteurs IP3 dans la membrane nucléaire. L'utilisation récente de la technique de « décaage » par microscopie

confocale a permis de démontrer que l'IP3 intranucléaire déclenchait une vidange depuis les boucles de réticulum nucléoplasmique (Echevarria et al., 2003). Un travail complémentaire a prouvé que les IP3R nucléaires étaient fonctionnels et possédaient une affinité plus forte pour l'IP3 que les IP3R cytosoliques, permettant ainsi leur activation par des concentrations plus faibles d'IP3 (Leite et al., 2003).

L'existence de ce double système contrôlant la $[Ca^{2+}]_n$ (depuis le réticulum endoplasmique *via* le cytosol ou depuis le réticulum nucléoplasmique) multiplie les variables de contrôle de la régulation génique calcium-dépendante et augmente la spécificité du système.

II.C.1.b) Activité protéique

La Ca^{2+} -calmoduline peut interagir avec de nombreuses protéines par des domaines spécifiques. Ces domaines d'interaction protéine-protéine sont dépendants du calcium. Dans le cas du canal calcique voltage-dépendant de type L, l'interaction du canal avec la calmoduline liée au calcium entraîne une inactivation du canal et module par conséquent la signature calcique du stimulus (Mori et al., 2004).

Intervenant en amont de la régulation génique, l'activation de kinases par la Ca^{2+} -calmoduline est aussi dépendante du calcium (cf. §II.C.1.a).

Ces mécanismes démontrent à quel point le calcium est un messager prépondérant dans le contrôle des fonctions physiologiques.

II.C.2) Régulation des grandes fonctions cellulaires

Bien que le calcium soit impliqué dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires spécifiques (comme la contraction musculaire), nous nous limiterons à l'introduction de son rôle dans la prolifération, l'apoptose et la sécrétion.

II.C.2.a) Prolifération

En réponse à des stimuli mitogéniques, la cellule génère des signaux calciques oscillants. Il a été démontré que ces signaux ont une action directe sur la prolifération lors de l'activation des lymphocytes T (Berry and Nishizuka, 1990; Partiseti et al., 1994) et dans les cellules de la prostate (Humez et al., 2004; Legrand et al., 2001). Alternativement, la diminution du taux de Ca^{2+} réticulaire favorise la prolifération des cellules prostatiques, alors qu'une augmentation des stocks réticulaires de Ca^{2+} sensibilise les cellules à l'arrêt de croissance provoqué par l'ATP (Vanoverberghe et al., 2003).

Cependant, il est clairement établi dans de nombreux modèles que le calcium augmente la transcription de gènes encodant des facteurs de transcription (ex : *myc*, *c-fos* et *c-jun*) impliqués

dans le contrôle de la synthèse de gènes clés du cycle cellulaire comme la cycline D1 (See et al., 2004). Des études ont caractérisé le rôle de certains canaux calciques TRP dans la prolifération de modèles hétérologues (Schwarz et al., 2006), ou dans des modèles endogènes comme les cellules épithéliales de la prostate (Thebault et al., 2006; Thebault et al., 2003).

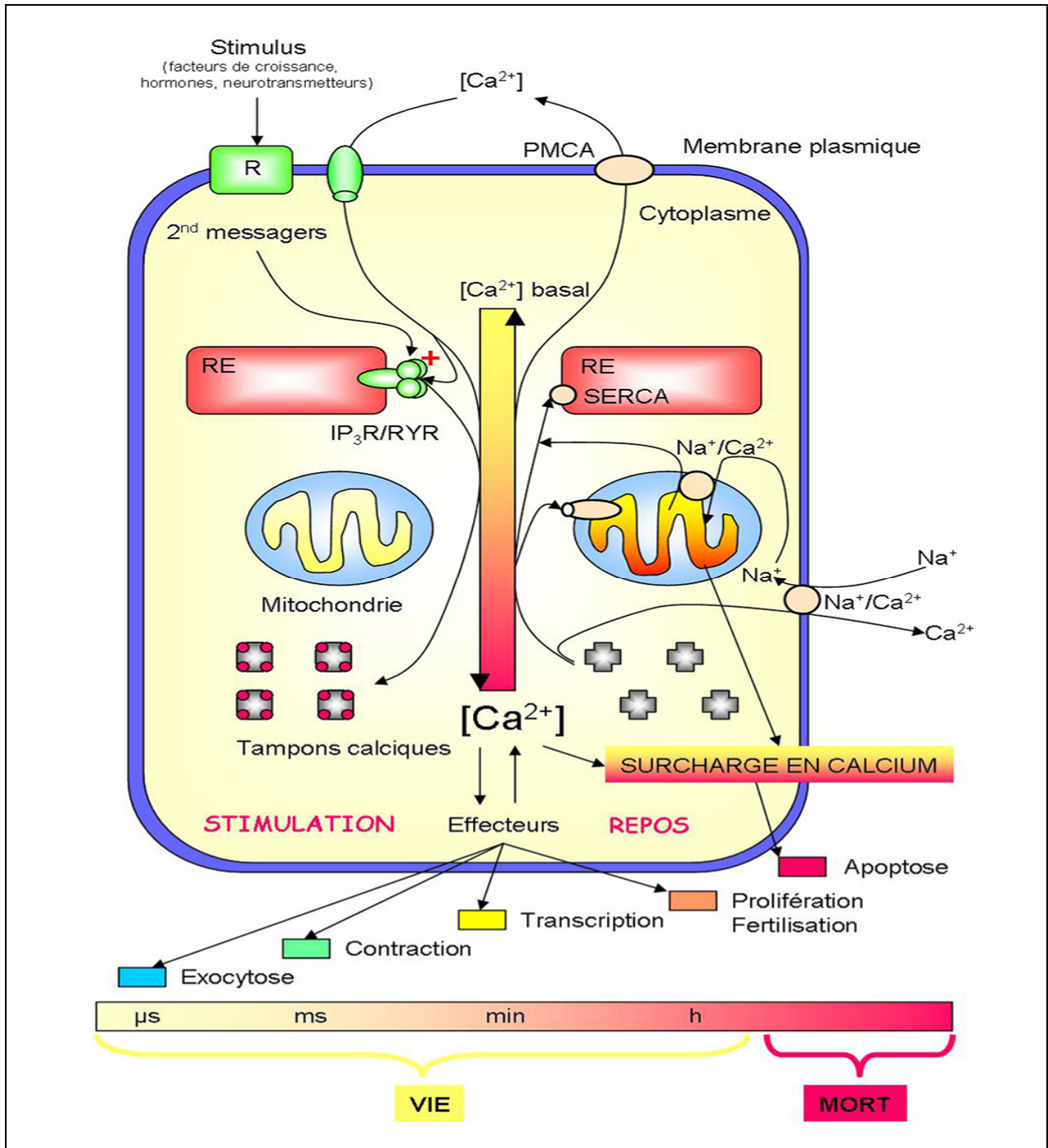


Figure 7: représentation schématique de la propagation des signaux calciques et de l'effet physiologique de la signature calcique en fonction de ces propriétés (cinétique, amplitude). Adapté de Berridge (Berridge et al., 2003).

II.C.2.b) Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène bien décrit faisant intervenir de nombreuses protéines. Plusieurs voies principales sont répertoriées comme étant inductrices de l'apoptose. On peut citer la voie des récepteurs à domaine de mort activés par leurs ligands spécifiques (TGF- β , Fas ligand) et la voie mitochondriale impliquant les protéines de la famille Bcl-2. Ces deux voies, une fois activées, font intervenir des aspartate-protéases appelées Caspases. Ces enzymes orchestrent alors la mort de la cellule.

Néanmoins plusieurs travaux ont démontré que le calcium pouvait induire l'apoptose. Deux grands phénomènes sont utilisés par les cellules, en synergie ou non : la vidange des stocks calciques réticulaires et l'ECC (figure 7). En effet, l'ECC et/ou la vidange réticulaire de calcium sont responsables de plusieurs phénomènes conduisant à l'apoptose : la surcharge mitochondriale en calcium, l'activation de la calcineurine activant par déphosphorylation la protéine pro-apoptotique bad et la vidange prolongée du Ca^{2+} réticulaire laquelle induit un stress réticulaire (Mariot et al., 2000; Pinton et al., 2001; Skryma et al., 2000; Tombal et al., 2000; Vanoverberghe et al., 2004; Wang et al., 1999). Pour finir, des travaux du laboratoire ont démontré que la surexpression de la protéine Bcl-2 diminuait la capacité d'induction de l'apoptose par la vidange du réticulum endoplasmique dans les cellules métastatiques LNCaP (Vanden Abeele et al., 2002). Ce phénomène est expliqué par la diminution de la quantité des stocks calciques réticulaires mobilisables dans les cellules surexprimant Bcl-2. Ainsi, la vidange de calcium réticulaire dans ces cellules reste d'amplitude inférieure au seuil de déclenchement de l'apoptose.

II.C.2.c) Sécrétion

Les synapses des neurones représentent le meilleur modèle du rôle joué par le calcium dans la sécrétion. Sous l'impulsion d'une variation de potentiel membranaire, les canaux calciques voltage-dépendant de type HVA ou LVA s'activent. Le calcium entre depuis la matrice extracellulaire et entraîne l'activation de petites protéines G déclenchant la libération des vésicules de sécrétion (Giancippoli et al., 2006; Mansvelder and Kits, 2000).

Dans les cellules neuroendocrines de la prostate, des travaux du laboratoire ont démontré le fonctionnement du canal calcique voltage-dépendant $\alpha 1H$ qui pourrait être impliqué dans le mécanisme de sécrétion régulée de ces cellules (Mariot et al., 2002).

II.C.2.d) Différenciation

La concentration de Ca^{2+} libre externe a un impact très important sur l'état de différenciation des cellules. Le modèle le mieux décrit est la différenciation calcium-dépendante des kératinocytes. Au cours de leur transformation en cornéocytes, les kératinocytes évoluent

d'un milieu extracellulaire initial ayant moins de 0,1 mM de Ca^{2+} libre contre environ 2 mM dans les couches supérieures de l'épiderme (Pillai et al., 1990; Yuspa et al., 1989). Le calcium participe à la différenciation des kératinocytes en modulant l'expression des gènes (cf. § II.C.1). Les cellules épithéliales pigmentaires rétinienne sont aussi caractérisées par une différenciation calcium-dépendante (Rak et al., 2006).

Conclusion :

Le calcium est un messager ubiquitaire encodant de nombreuses informations grâce aux propriétés intrinsèques des flux calciques dans la cellule ainsi qu'à ses interactions avec son environnement. L'homéostasie calcique permet, de surcroît, de constamment maintenir la potentialité d'action du calcium. Le signal calcique comme son homéostasie sont directement déterminés par le calciosome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines intervenant dans la voie de signalisation du calcium, de l'inducteur à l'effecteur. De fins changements qualitatifs et/ou quantitatifs de ce calciosome peuvent expliquer les décalages de réponses obtenues pour un même stimulus dans des cellules différentes (figure 7). Ainsi, on peut tout à fait imaginer que la stimulation de cellules par l'EGF induise une signature calcique participant à la différenciation dans un modèle cellulaire et à la prolifération cellulaire dans un autre modèle. C'est pourquoi les recherches actuelles s'évertuent à caractériser les différents calciosomes de tous les phénotypes cellulaires. Dans le cas précis de la prostate, la connaissance des différents calciosomes des cellules épithéliales apicales aux différents stades de leur différenciation ou au cours de l'oncogénèse est une condition *sine qua non* à l'établissement des différentes signatures calciques contrôlant la prolifération ou encore la résistance à l'apoptose.

Récemment, la découverte d'une nouvelle famille de transporteurs ioniques, celle des canaux TRP (Transient Receptor Potential), a encore complexifié l'étude du calciosome.

III) Rappels sur les mécanismes de régulation génique

De la mouche *Drosophila* aux mammifères, la diversification génétique a principalement utilisé la multiplication des gènes afin d'accroître les types de protéines et leurs fonctions. Cependant cette règle ne peut en aucun cas expliquer les différences entre l'être humain et les autres mammifères. En effet, la découverte, quelque peu décevante, des 25 000 gènes du génome humain nous a enseigné que le nombre de gènes n'est pas en rapport direct avec la complexité des organismes vivants. La génétique évolutive a alors fait appel à d'autres mécanismes moléculaires pour expliquer les différences entre les espèces.

Les deux principaux mécanismes permettant la génération de diversité protéique, avant leurs modifications post-traductionnelles, sont la transcription à partir de promoteurs alternatifs et l'épissage alternatif. Ces deux mécanismes permettent de varier les combinaisons entre exons et modifient ainsi en profondeur la séquence primaire des protéines.

Finalement, la complexité atteint son apogée lorsque s'entremêlent la synthèse des isoformes et la balance entre les différentes isoformes au sein d'un réseau de protéines.

Ces notions étant de première importance pour comprendre le fonctionnement des canaux TRP, quelques rappels des notions de promoteurs alternatifs et d'épissage alternatif sont présentés ci-après. Un bref rappel sera aussi réalisé à propos de l'ARN interférence afin de bien appréhender son utilisation dans les expériences d'extinction génique.

III.A) Les promoteurs alternatifs

Un promoteur alternatif est un promoteur secondaire qui conduit à l'obtention de plusieurs transcrits indépendamment du mécanisme d'épissage alternatif. Dans un article récent, Kimura *et coll* (Kimura et al., 2006) ont reporté une analyse de masse visant à détecter des promoteurs alternatifs putatifs (PAP). Ils ont ainsi mis en évidence qu'environ 52% des 14 628 gènes de l'étude possédaient des PAP. Ces gènes présentaient en moyenne 3,1 PAP. Extrapolé à l'ensemble du génome humain, estimé à environ 25 000 gènes, cette analyse suggère l'existence de quelques 40 300 ARN provenant d'autant de promoteurs différents. Cette étude démontre donc bien l'importance des promoteurs alternatifs dans la génération de la diversité génétique.

L'utilisation de promoteurs alternatifs peut avoir trois conséquences :

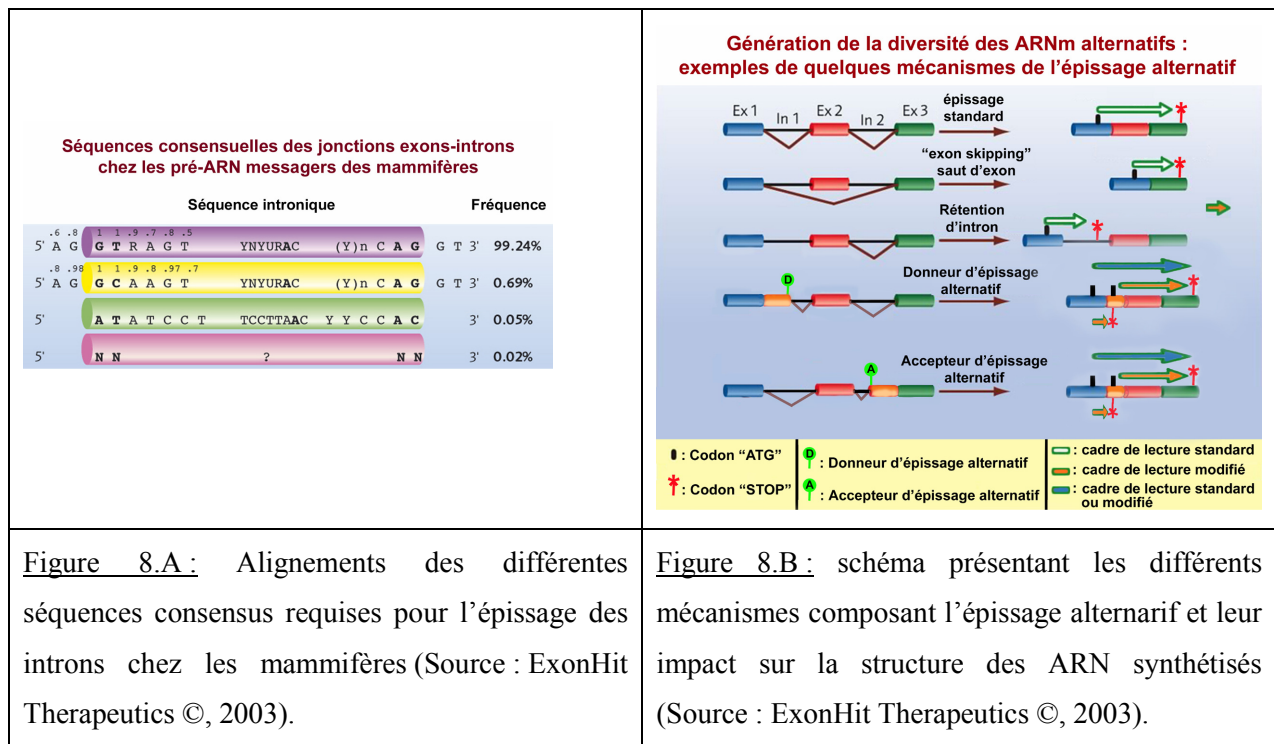
- La seule utilisation d'un promoteur régulé différemment du promoteur principal, c'est-à-dire ayant des sites de réponses à des facteurs de transcription différents, permet de maintenir ou de renforcer la transcription d'un ARNm codant pour la même protéine.

- La suppression du ou des premiers exons de l'ARN conduit à une modification de la séquence UTR 5' (UnTranslated Region). Ceci entraîne généralement une modification de la stabilité de l'ARNm permettant ainsi d'augmenter ou de diminuer sa durée de vie. Ce mécanisme permet donc de moduler la quantité d'ARNm traduit en protéine.
- Finalement, la variation obligatoire du premier ou des premiers exons de l'ARN peut aussi modifier la partie aminoterminal de la protéine. Or cette séquence aminoterminal participe souvent à la séquence dite « d'adressage », laquelle définit la localisation intracellulaire de la protéine. En fonction du promoteur alternatif utilisé, la phospholipase γ , par exemple, sera transloquée soit dans la membrane du RE, soit dans la mitochondrie soit dans les péroxysomes (Mancuso et al., 2004).

La famille des canaux TRP n'échappe pas à la règle du promoteur alternatif. Ainsi, un ARN alternatif de TRPM3 humain possède l'exon 1, alors que les 6 autres formes ne le possèdent pas. Les auteurs expliquent cette différence par la présence de deux promoteurs alternatifs (Oberwinkler et al., 2005). Les données fonctionnelles n'étant pas disponibles, nul ne connaît encore l'importance de ce premier exon sur la fonction du canal TRPM3.

III.B) L'épissage alternatif

L'épissage alternatif est le mécanisme permettant l'élimination des séquences introniques dans l'ARN néotranscrit. Ce processus intervient soit de concert avec la transcription soit juste après pour les plus grands ARN. Le complexe multiprotéique dénomé « spliceosome » commence par reconnaître des séquences spécifiques délimitant les introns et les exons, appelées donneur et accepteur d'épissage (figure 8.A), clive le côté 5' de l'intron puis catalyse une première réaction de transestérification. Le spliceosome clive alors l'extrémité 3' de l'intron puis catalyse la seconde réaction de transestérification afin de relier les deux exons. L'épissage alternatif provoque soit la délétion soit la rétention d'un exon ou d'une partie d'exon. Ces deux mécanismes peuvent produire de simples variations dans la séquence protéique (addition ou délétion), mais peut aussi entraîner un décalage du cadre de lecture provoquant un changement radical de la séquence protéique primaire en aval du décalage (figure 8.B). L'apparition d'un codon « stop » précoce et/ou l'apparition d'un codon « start » alternatif génèrent des isoformes possédant des variations à leurs extrémités (figure 8.B). Enfin, l'épissage alternatif d'un même exon peut varier en fonction de la présence de plusieurs sites « donneur d'épissage » ou « accepteur d'épissage » (figure 8.B).



L'épissage alternatif est un mécanisme essentiel au bon fonctionnement des protéines. En effet, environ 15% des maladies génétiques sont dues à des mutations des sites donneurs ou accepteurs d'épissage conduisant à une modification irréversible de la protéine synthétisée (Krawczak et al., 1992). Ainsi la myotonie dystrophique, le syndrome de Marfang ou encore la déficience en OCT (Ornithine Carbamoyltransférase) sont toutes dues à des mutations affectant directement l'épissage alternatif des protéines responsables de ces pathologies (Liu et al., 2001; Liu et al., 1997; Matsuura et al., 1995).

La composition moléculaire du spliceosome varie en fonction du phénotype cellulaire et/ou des stimuli externes. Elle est généralement décrite comme étant un assemblage de petites ribonucléoprotéines et de plus de 100 protéines (Faustino and Cooper, 2003). Cette variation induit des modifications dans la capacité du spliceosome à reconnaître les séquences à épisser, générant par conséquence des ARN alternatifs. Des dérégulations de l'expression de certaines de ces protéines ont été reportées dans certains cancers (Nissim-Rafinia and Kerem, 2002; Philips and Cooper, 2000). Il est alors très probable que ces variations qualitatives de la composition du spliceosome aient un impact direct sur l'épissage de certains ARNm.

Dans la prostate, il a été démontré que l'AR contrôlait en partie l'expression de facteurs protéiques appartenant au spliceosome (Nantermet et al., 2004). Ainsi des modifications de l'activité de l'AR provoquent des variations de l'activité des promoteurs cibles, mais aussi des changements qualitatifs de l'épissage des ARNm.

Les gènes *trp* codent pour de nombreux ARNm alternatifs générés par l'utilisation de promoteurs alternatifs et par le mécanisme d'épissage alternatif (cf. § IV.B « classification et structures communes »).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai recherché d'éventuelles isoformes du canal TRPM8.

III.C) L'ARN interférence

L'ARN interférence est un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle impliqué aussi bien dans la défense anti-virale, que contre l'expansion des transposons ou plus simplement dans la régulation du taux d'ARN (Fire et al., 1998; Hannon, 2002; Timmons and Fire, 1998; Zamore, 2001). Ce mécanisme, présent chez tous les organismes eucaryotes, permet de détruire spécifiquement un ARNm cible. Le principe repose sur l'utilisation de petits ARN double brin de 21 à 23 nucléotides. Ces ARN proviennent soit d'ARN viraux soit d'ARN eucaryotes possédant une structure secondaire en « tige et boucle », qui sont clivés par le complexe endonucléasique Dicer (figure 9). Ces petits ARN double brin de 21 à 23 nucléotides sont ensuite pris en charge par le complexe enzymatique RISC (RNA-Induced Silencing Complex). En consommant de l'ATP, ce complexe RISC dissocie les deux brins d'ARN pour ne conserver que le brin anti-sens qui devient par définition le petit ARN interférent (siARN). Le complexe siARN-RISC interagit alors avec l'ARN homologue, reconnu par son interaction avec le siARN. Le complexe RISC peut alors cliver l'ARNm de chaque côté du siARN entraînant ainsi la destruction de l'ARNm.

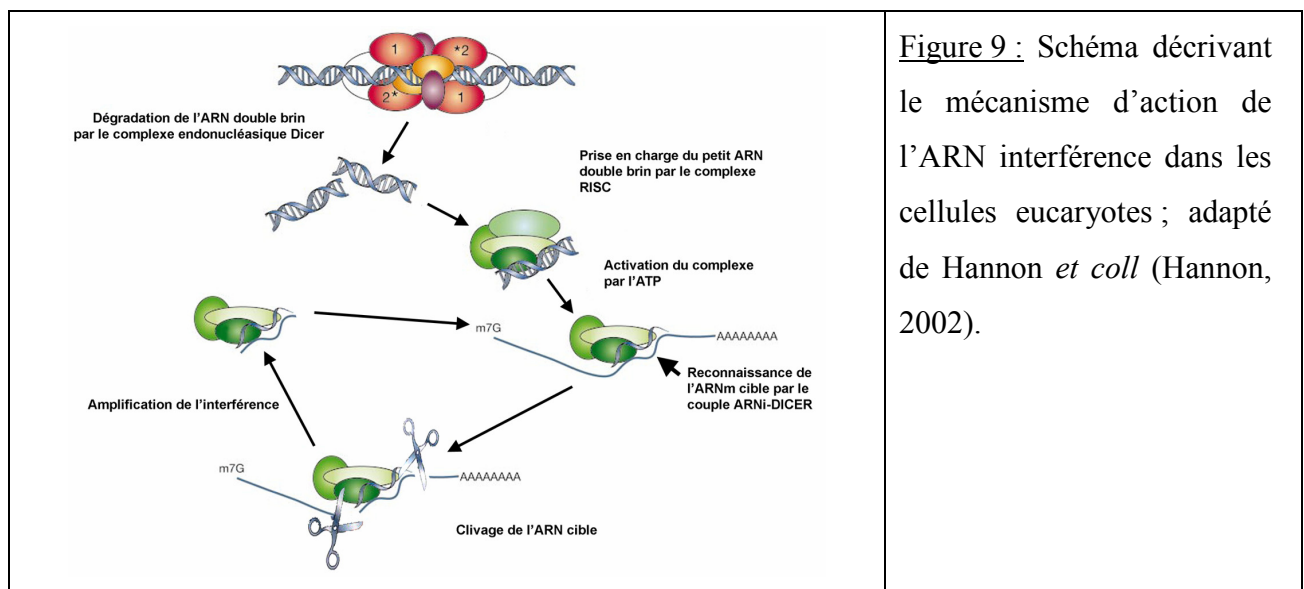


Figure 9 : Schéma décrivant le mécanisme d'action de l'ARN interférence dans les cellules eucaryotes ; adapté de Hannon *et coll* (Hannon, 2002).

Au-delà de son rôle physiologique, la découverte de ce mécanisme et son utilisation en recherche a profondément modifié les possibilités techniques d'études des gènes. Ainsi, dans ce travail, j'ai utilisé cette technologie afin d'étudier le rôle de TRPM8 dans la signalisation calcique des cellules de la prostate.

IV) La superfamille des canaux calciques TRP

IV.A) Historique : de la drosophile à l'homme

Le mot TRP prend son origine dans la caractérisation d'un mutant de la Drosophile présentant des problèmes de vision. En fait, le mutant présentait une réponse altérée du processus de photo-transduction (Minke, 1977). Ce mécanisme a été étudié par l'obtention d'un électrorétinogramme (ERG) correspondant à un enregistrement extracellulaire de la somme de l'activité électrique oculaire du nerf optique lors de l'illumination prolongée de l'œil. Le mutant présentait sur son ERG une dépolarisation transitoire conduisant à la cécité. Chez la drosophile, la rhodopsine (pigment photosensible) est couplée à une PLC- β par l'intermédiaire d'une protéine G_q et entraîne l'ouverture d'un canal situé sur la membrane plasmique. Les mutants présentant un ERG transitoire possédaient en fait une mutation sur le gène codant le canal ionique impliqué dans la transduction de l'information lumineuse. Ce gène fut donc appelé *trp* pour « Transient Receptor potential ».

Différents travaux ont ensuite démontré que le canal TRP fonctionnait en synergie avec un canal TRP-Like (TRPL) chez la drosophile (Montell, 1997; Xu et al., 1997). Les recherches se sont portées sur la caractérisation des orthologues des canaux TRP et TRPL chez les mammifères. Dans un premier temps, sept gènes furent clonés auxquels plus de vingt furent ajoutés en quelques années (Harteneck et al., 2000; Hofmann et al., 2000; Montell, 2001; Wes et al., 1995). Plus récemment, la découverte de nombreux ARNm alternatifs issus des gènes *trp* a démultiplié le nombre de protéines-canal TRP (Freichel et al., 2001; Sakura and Ashcroft, 1997).

IV.B) Classification et structures communes

L'analyse phylogénétique de tous ces gènes a permis de les classer par groupes (Clapham et al., 2001; Montell, 2001). Chez les Mammifères, les 32 gènes ont été classés en 7 sous-familles ((Birnbaumer et al., 2003), figure 10.A) :

- **TRPC (1-7)** pour « Canonique » ou « Classique » en raison de leur forte homologie avec la protéine TRP originelle de la drosophile ;
- **TRPV (1-6)** en référence au premier membre de cette famille (TRPV1 ou récepteur aux « Vanilloïdes ») qui fut identifié comme un canal activé par le principal composant irritant du piment rouge : la capsaïcine ;
- **TRPM (1-8)** en référence également au premier membre de cette famille (TRPM1 ou « Mélastatine ») qui fut initialement cloné à partir d'une lignée cellulaire murine de mélanome ;

- **TRPML (1-3)** pour les « Mucolipines » ;
- **TRPP (1-5)** issus à l'origine de deux gènes *polycystic kidney diseases 1* et *2* (PDK1 pour TRPP1, et PDK2 pour TRPP2) regroupent actuellement cinq membres chez l'Homme ;
- **TRPN** qui ne comprend actuellement qu'un seul membre chez l'Homme et se distingue des autres TRP par la présence au niveau de son extrémité aminoterminale de nombreux domaines ankyrines répétés (Montell, 2003) ;
- **TRPA1** (ou « ANKTM1 »), un membre éloigné de la famille TRP (Story et al., 2003).

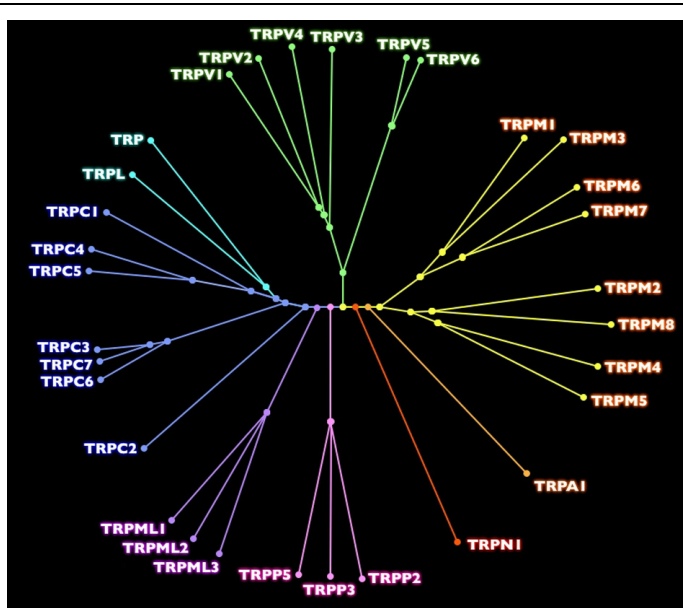


Figure 10.A : arbre phylogénétique des canaux de la famille TRP. Chaque couleur est associée avec une sous-famille ou groupe : TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPA, TRPN.

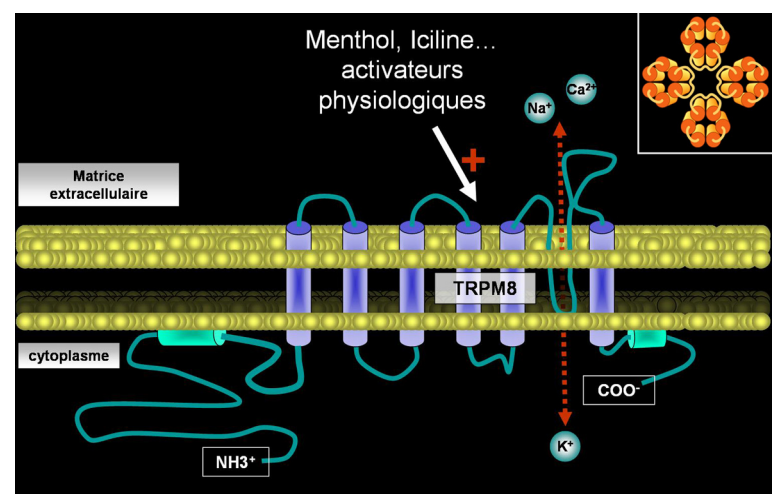


Figure 10.B : représentation schématique de la structure secondaire générale d'un monomère de TRP (ici TRPM8) : 6 segments transmembranaires (cylindres bleus), les deux boucles terminales sont cytosoliques et la boucle-P formant le pore ionique se situe entre les deux derniers segments transmembranaires. Chaque boucle terminale cytosolique comprend une zone hautement hydrophobe (cylindre vert). Dans l'encart supérieur droit, vue du dessus d'un tétramère de TRP.

Les canaux d'un même groupe possèdent une structure protéique primaire et secondaire proche. La structure générale d'un canal TRP comprend 6 segments transmembranaires hydrophobes, chacun séparé par de petites boucles hydrophiles (figure 10.B). Les deux boucles carboxy- et aminotermiales sont cytoplasmiques et contiennent 1 à 2 zones hydrophobes relativement bien conservées ainsi que des structures en hélice alpha. La séquence comprise entre les segments transmembranaires 5 et 6 comprend une boucle P (« P-loop »), partiellement conservée par rapport à celle des canaux potassiques voltage-dépendants « Shaker », et forme le filtre de sélectivité du pore ionique. Contrairement aux canaux calciques voltage-dépendants, aucun senseur de voltage n'a été détecté dans le segment 4 des canaux TRP. Cette analyse est en accord avec les résultats démontrant que les canaux de type TRP ne sont pas, *stricto sensu*, voltage-dépendants. Un petit segment qualifié de domaine TRP, adjacent au 6^{ème} segment transmembranaire, est conservé dans les canaux TRP et TRPL de la drosophile ainsi que dans les groupes C et M chez les mammifères. Ce segment serait impliqué dans la régulation de l'activité des canaux par certains lipides comme le PIP2 (Liu and Qin, 2005; Liu and Liman, 2003; Rohacs et al., 2005). Enfin certains domaines protéiques bien connus comme les domaines ankyrines, principalement impliqués dans l'ancrage des canaux au cytosquelette, sont conservés dans la boucle aminotermiale des familles C et V.

La structure quaternaire des canaux TRP a été déduite de leur homologie avec les canaux potassiques voltage-dépendants, puis démontrée pour les canaux TRPV1 et TRPM8 par western-blot en condition non dénaturante (Dragoni et al., 2006; Kedei et al., 2001). Ainsi, les canaux TRP seraient soit des homotétramères (figure 10.B, encart) soit des hétérotétramères. Par exemple, les monomères de TRPC1 peuvent s'associer avec les monomères de TRPC3,4,5 et 6 (Amiri et al., 2003; Strubing et al., 2001), alors que les monomères de TRPM6 peuvent former un canal fonctionnel avec des monomères de TRPM7 (Chubanov et al., 2004). Bien que l'association de monomères provenant de familles différentes n'ait jamais été démontrée, les auteurs s'accordent à penser qu'elle est très peu probable vu les différences structurales existant entre ces familles.

Finalement, de nombreux ARNm alternatifs ont été clonés pour certains TRP, ex : 4 pour TRPV1, 2 pour TRPV4, 9 pour TRPM3 (Arniges et al., 2006; Chu et al., 2005; Oberwinkler et al., 2005). Ces ARNm issus d'épissage alternatif codent pour soit des protéines tronquées soit des protéines présentant des insertions. Ces isoformes se comportent soit comme des canaux fonctionnels à part entière soit comme des dominants négatifs bloquant la fonction de la forme « classique ». Ainsi, une petite isoforme de TRPM1, surexprimée dans le mélanome, est capable

de s'associer avec la forme complète pour bloquer la translocation du canal vers la membrane plasmique.

Malgré des caractères très conservés, les canaux TRP présentent de nombreuses différences fondamentales et leur structure tétramérique comme l'existence de nombreuses isoformes laissent entrevoir un nombre conséquent de combinaisons préfigurant la diversité de leurs mécanismes d'activation.

IV.C) Grandes classes de mécanismes d'activation des canaux TRP

L'ancienne classification générale des canaux ioniques était représentée par quatre grandes classes : ROC (Receptor-Operated Channels), VOC (Voltage-Operated Channels), SMO (Second Messenger-Operated Channels) et SOC (Store-Operated Channels) dont les modes d'activation (récepteur, voltage, second messenger et déplétion de Ca^{2+} réticulaire) suffisaient à grouper les canaux. La découverte des canaux TRP et d'autres dont des canaux potassiques comme TRAK et TREK a agrandi la famille avec deux nouveaux groupes : « TOC » (Temperature- Operated Channels) et « MOC » (Mechanoreceptor- Operated Channels). A ces deux modes d'activation des canaux TRP, se sont adjoints des modes de régulation comme une activité enzymatique ou le voltage. Ainsi, il est à ce point essentiel de bien séparer les mécanismes opérateurs (« operated ») et les mécanismes modulateurs (« modulated »). Cependant, il est parfois difficile de bien délimiter la frontière ; certains canaux sont activés par un mécanisme et modulés par un autre.

IV.C.1) ROC, VOC : les oubliés

Les canaux de type ROC (Receptor-Operated Channels) sont par définition des canaux-récepteurs. Parmi les exemples le plus connus, nous citerons le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (Ach) et les récepteurs au NMDA (N-Methyl D-Aspartate). Lorsqu'ils interagissent directement avec leur ligand, ces canaux s'ouvrent. L'ouverture du canal ne nécessite donc pas d'activation de voie de signalisation intracellulaire.

Les canaux voltage-dépendants sont des canaux dont l'ouverture se produit de façon concomitante au changement du potentiel de membrane. Ces canaux interviennent dans la création du potentiel d'action (PA) des cellules excitables, mais jouent aussi un rôle dans les cellules dites non excitables (ne générant pas de PA consécutif à une dépolarisation de la membrane). Ces canaux possèdent souvent un seuil d'activation ou une fenêtre de potentiels à laquelle le canal est ouvert. C'est par exemple le cas du canal calcique voltage-dépendant $\alpha 1H$ dans les cellules neuroendocrines de la prostate (Gackiere et al., 2006).

Malgré la grande diversité de leurs modes d'activation, les canaux TRP n'appartiennent pas (ou pas encore) à ces deux grandes classes de canaux.

IV.C.2) SMOC et SOC

Les canaux de type SMOC (Second Messenger-Operated Channels) sont activés par l'intermédiaire de seconds messagers générés par l'activation d'un récepteur membranaire. Par exemple, l'activation du récepteur muscarinique M3 par le carbachol entraîne l'activation de la Phospholipase C (PLC) qui catabolise le PIP2 en Inositol triPhosphate (IP3) et DiAcylGlycérol (DAG). Le DAG peut alors agir comme second messenger et activer le canal SMOC. Ce cas de figure a été reporté pour le canal TRPC6 lors de l'application de noradrénaline sur des cellules épithéliales de la prostate (Thebault et al., 2003). L'activation du récepteur muscarinique M3 est aussi connue pour engendrer l'activation d'une phospholipase A2 dont l'activité produit en retour de l'acide arachidonique (Shuttleworth et al., 2004). Cet acide arachidonique est un autre second messenger qui active le courant I(ARC). Bien que la nature moléculaire de l'I(ARC) ne soit pas encore connue, ce courant ionique activé par l'acide arachidonique appartient à la catégorie de SMOC.

Les canaux de type SOC (Store-Operated Channels) sont, par définition, activés lors de la déplétion des stocks de calcium libre du réticulum endoplasmique et leur activité est responsable de l'entrée capacitative de calcium (ECC). Cependant, malgré cette définition simple, la nature moléculaire ainsi que les mécanismes d'activation de ces canaux restent obscurs. Plusieurs mécanismes différents sont sujets à d'intenses débats afin de savoir lequel est le mécanisme responsable de l'activation du SOC (Figure 11). Il reste cependant très probable que tous soient impliqués et qu'ils puissent agir de concert en fonction des stimuli. Ces mécanismes sont décrits ci-dessous et présentés dans le schéma de la figure 11.

Une étude réalisée au sein du laboratoire (Vanden Abeele et al., 2004) a démontré que dans les cellules épithéliales de la prostate, coexistaient deux mécanismes d'activation de ces canaux : le couplage conformationnel et la voie du CIF (Calcium Influx Factor).

Le premier mécanisme requiert une interaction entre le récepteur IP3 (IP3R) et les canaux SOC appelés alors SOC_{CC} : la fixation de l'IP3 sur son récepteur au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique provoquerait une variation de conformation de l'IP3R. Ce changement de conformation vers un état plus stable induirait un transfert d'énergie (sous forme de contraintes mécaniques) vers les partenaires de l'IP3R. Par effet thermodynamique, les canaux SOC_{CC}, initialement fermés, deviendraient instables et évolueraient alors vers leur état « ouvert », devenu plus stable que l'état « fermé ». Dans le cas des canaux TRP, une activation

de TRPC1 par interaction conformationnelle avec l'IP3R par l'intermédiaire de protéines de la famille Homer a été reportée (Yuan et al., 2003)

Le second mécanisme propose que la vidange du calcium réticulaire soit accompagnée de la libération d'un facteur diffusible : le CIF, de nature encore inconnue, qui active les canaux SOC, alors appelés SOC_{CIF}. Selon le mécanisme décrit par Bolotina *et coll*, le CIF active la phospholipase A2 calcium-indépendante groupe VIA (ou iPLA2 β) qui génère alors des lysophospholipides capables d'activer directement les canaux SOC (Smani et al., 2004).

Cependant, des études récentes sont venues bousculer le « petit monde des SOC ». En effet, une étude menée sur des cellules lymphocytaires humaines ne présentant pas ECC a permis de mettre en évidence le rôle central de la protéine STIM (STromal Interacting Molecule). Cette protéine se trouve sur toute la membrane du RE et possède un domaine « EF hand » qui lui permet de fixer le calcium. Ainsi, selon les hypothèses actuelles, STIM serait capable de détecter une baisse de la concentration de Ca²⁺ dans le RE, ce qui provoquerait le regroupement de STIM dans des îlots de membrane réticulaire, appelés « *puncta* », distants du plasmalemme de quelques nanomètres. La proximité de STIM avec les canaux SOC leur permettrait d'interagir, ce qui induirait l'activation de ces derniers (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Par ailleurs, un autre travail récent a démontré que la protéine ORAI (transmembrane protein 142A, CRACM1) constitue le canal SOC des cellules lymphocytaires (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006b). En outre, plusieurs travaux ont démontré que lors de la vidange calcique réticulaire, les protéines STIM situées dans la membrane du RE interagissent directement avec des multimères de ORAI (Prakriya et al., 2006; Vig et al., 2006a; Yeromin et al., 2006). Ces travaux renforcent l'hypothèse de la nécessité d'un couplage conformationnel pour l'activation des canaux SOC.

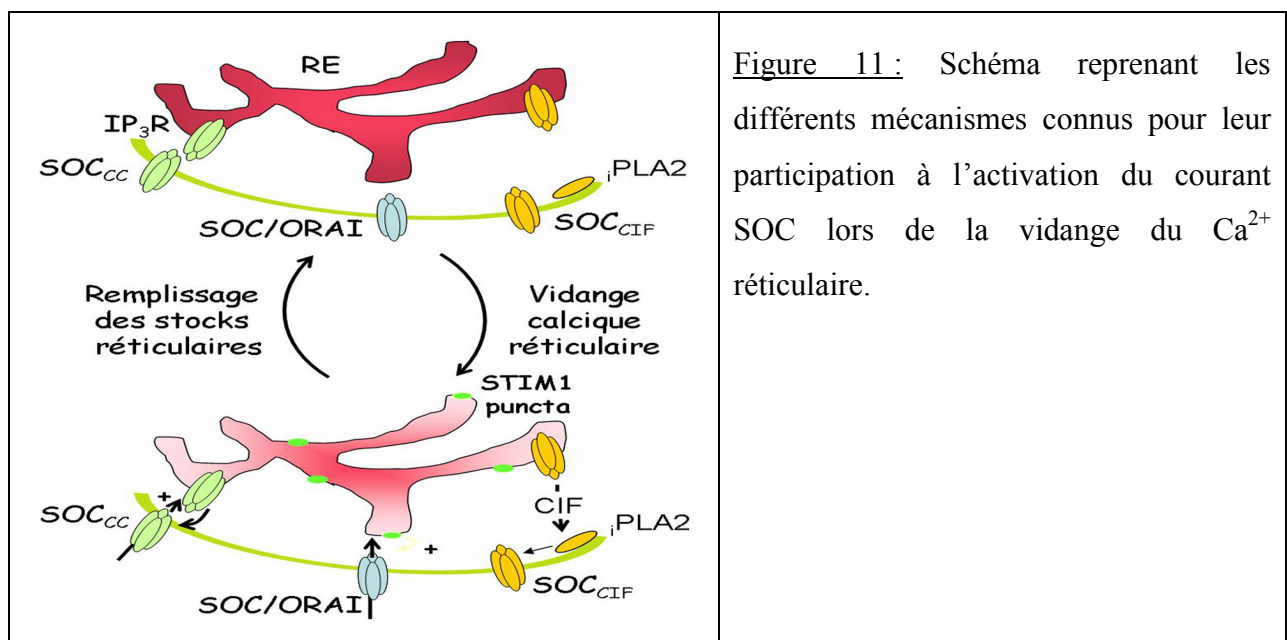


Figure 11 : Schéma reprenant les différents mécanismes connus pour leur participation à l'activation du courant SOC lors de la vidange du Ca²⁺ réticulaire.

IV.C.3) « MOC » : les mécanorécepteurs

Le terme de « Mechano-Operated Channel » n'est pas couramment utilisé dans la classification des modes d'activation des canaux ioniques. Cependant, nous l'utiliserons par analogie avec les termes de SOC, SMOC, ROC, VOC.

Les MOC sont, par définition, des canaux activés par l'augmentation de pression sur la membrane plasmique. Cette augmentation de pression peut être une contrainte mécanique (comme pour les mécanorécepteurs du derme) ou une augmentation locale d'osmolarité (la plupart des cas physiologiques). Depuis les années 90, les canaux potassiques, TRAAK, TREK-1, TREK-2 ont été caractérisés comme étant des mécanorécepteurs (Lesage et al., 2000a; Lesage et al., 2000b; Maingret et al., 1999a; Maingret et al., 1999b).

Parmi les canaux TRP, le canal TRPV4, l'orthologue de Osm-9 chez *Caenorhabditis elegans*, pourrait être classé parmi les MOC. En effet, chez *C. elegans*, un gène mutant d'*osm-9* provoque une perte de la sensation de pression (mécanique et osmotique) dans la partie antérieure du vers (Colbert et al., 1997). Par analogie, la souris TRPV4^{-/-} présente un défaut de régulation de la tonicité systémique, induisant alors une augmentation de la pression osmotique, une diminution de l'hydratation de l'animal et une réduction de la sécrétion de l'hormone anti-diurétique (ADH) (Liedtke, 2005; Liedtke et al., 2000; Liedtke and Friedman, 2003; Liedtke et al., 2003). Bien que tous ces résultats démontrent le rôle essentiel de TRPV4 dans la régulation osmotique, le mécanisme agissant comme senseur de pression n'est pas connu. TRPA1 présente la même incertitude que TRPV4 quant à sa nature intrinsèque de mécanorécepteur. En effet, un travail récent a montré que la souris TRPA1^{-/-} présentait une diminution significative de la sensibilité à la pression mécanique nociceptive (Kwan et al., 2006). En outre, les propriétés biophysiques du canal TRPA1 présentent une grande homologie avec celles du mécanorécepteur à *haut seuil* (canal ionique connu uniquement pour ses propriétés électrophysiologiques). Néanmoins, la démonstration que le canal TRPA1 soit intrinsèquement un mécanorécepteur n'a pas encore été réalisée (Hu et al., 2006).

IV.C.4) « TOC » : les thermorécepteurs

Le terme de « Thermo-Operated Channel » n'est pas couramment utilisé dans la classification des modes d'activation des canaux ioniques. Nous l'utiliserons cependant par analogie avec les termes de SOC, SMOC, ROC, VOC.

La thermosensation a longtemps été étudiée par l'enregistrement des dépolarisations membranaires induites par une variation de température ou par l'utilisation de substances

mimant l'effet d'une variation de température, comme le menthol ou la capsaïcine. Le clonage des canaux TRP a enfin permis de caractériser les protéines impliquées dans ce phénomène de thermosensibilité. Pas moins de 6 canaux TRP présentent cette fonction. TRPA1 (ou ANKTM) et TRPM8 (ou CMR1 pour Cold/Menthol Receptor 1) sont tous deux activés par une diminution de température (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a; Story et al., 2003). Les canaux TRPV1,2,3 et 4 sont sensibles à une augmentation de température (Benham et al., 2003; Caterina et al., 1999; Cortright et al., 2001; Delany et al., 2001; Peier et al., 2002b). Ces canaux couvrent une gamme de température allant de 8 à 50 degrés (Figure 12) et sont inextricablement liés au phénomène de nociception pour les canaux sensibles aux températures seuil de la nociception (Dhaka et al., 2006; Park et al., 2006; Story et al., 2003). Le détecteur de température se situe dans la boucle carboxy terminale des canaux. Ainsi l'inversion des boucles Ct de TRPV1 et TRPM8 a permis de strictement inverser leurs propriétés de thermosensibilité (Brauchi et al., 2006).

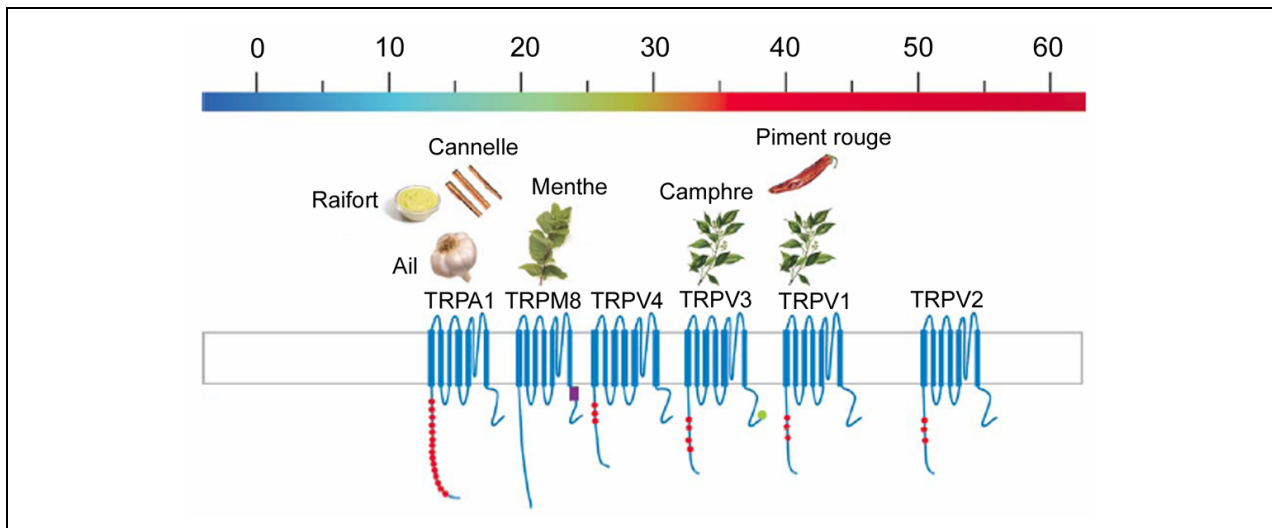


Figure 12 : schéma représentant l'alignement des thermorécepteurs TRP en fonction de leurs températures d'activation. Sont ajoutées les substances mimant les effets de la chaleur ou du froid, et parfois déclenchant la nociception. Figure adaptée de Daka A *et coll* (Dhaka et al., 2006).

Plusieurs auteurs ont tenté d'expliquer le phénomène d'activation des canaux par la température. De manière synthétique, il apparaît qu'à partir d'une température seuil la conformation du canal change en modifiant ainsi sa probabilité d'ouverture. D'un point de vue thermodynamique, la variation de température vers une température activant le canal provoque la transition du canal de son état *fermé* vers son état *ouvert* avec une entropie de valeur négative signifiant que le canal évolue vers un état plus stable. Ainsi, à 37°C, le canal est plus stable dans son état fermé, alors qu'à sa température d'activation la conformation ouverte devient plus stable que la conformation fermée (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004).

L'analyse biophysique la plus poussée a permis à Brauchi *et coll* de déterminer que la probabilité d'ouverture maximale atteinte par le canal TRPM8 pour une température de 10°C était de l'ordre de 0,7 (Brauchi et al., 2004). La thermoactivation du canal TRPM8 ne permet donc pas d'activer le canal au maximum, suggérant ainsi qu'il pourrait y avoir des mécanismes d'activation complémentaires.

IV.C.5) Les TRP modulés par le voltage

L'absence de senseur de voltage dans le segment transmembranaire 4 met en exergue le fait que cette « voltage-dépendance » ne fonctionne pas de la même manière que celle du canal potassique KV1.2 (Aggarwal and MacKinnon, 1996; Long et al., 2005a; Long et al., 2005b). Les résultats expérimentaux suggèrent qu'il s'agisse plutôt d'une modulation de l'activité du canal par le potentiel de membrane, sous-entendant ainsi que l'activation par le voltage agisse préférentiellement en synergie avec un autre mécanisme.

Le cas particulier du canal TRPM8 répond bien à cette hypothèse. Ainsi, le schéma d'activation de TRPM8, maintenant admis, consiste en une synergie de sa thermosensibilité et de sa « voltage-dépendance ». Brauchi *et coll* ont ainsi récemment proposé un modèle comprenant 8 états (4 de fermeture et 4 d'ouverture) répondant à des modifications allostériques pour expliquer les différentes transitions du canal de l'état ouvert à l'état fermé (Brauchi et al., 2004). Ce modèle, certes complexe, relate bien l'activation thermodépendante et voltage-indépendante du canal (par exemple par l'iciline) tout en tenant compte de son activation thermodépendante et voltage-modulée (cas de l'activation par le menthol).

En définitive, la thermosensibilité de TRPM8 est un bel exemple pédagogique pour expliquer qu'un canal ionique est un intégrateur moléculaire dont la stabilité conformationnelle est définie par ces stimuli environnementaux et dont l'activité subséquente définit une réponse adéquate par l'intermédiaire d'un signal calcique.

IV.C.6) Les « Chanzymes »

Les « chanzymes », pour « channels »+« enzymes », présentent la particularité d'être des canaux ioniques TRP possédant une fonction enzymatique sur leur extrémité carboxyterminale. Cette famille inclut les canaux TRPM2, TRPM6 et TRPM7.

Les canaux TRPM6 et TRPM7 présentent une forte perméabilité aux métaux divalents tels que le Mg^{2+} et le Zn^{2+} (Monteilh-Zoller et al., 2003; Nadler et al., 2001; Schmitz et al., 2003), ainsi une mutation de TRPM6 entraîne une hypomagnésie sévère, démontrant le rôle primordial de ce canal dans l'homéostasie du magnésium (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Les travaux de Chubanov *et coll* ont complété ces résultats en montrant que le canal hétéromultimérique TRPM6/TRPM7 est fonctionnel et impliqué dans l'absorption rénale de

Mg²⁺ (Chubanov et al., 2004). Ces deux canaux ont la particularité de posséder une alpha-kinase dépendante du Mg²⁺-ATP (Adénosine Tri-Phosphate activée par le magnésium). Cette alpha-kinase peut autophosphoryler la boucle aminoterminal du canal afin de moduler son activation par le complexe Mg²⁺-ATP (Schmitz et al., 2005) + (Schmitz et al., 2003). L'alpha-kinase peut de surcroît phosphoryler une protéine partenaire du canal comme l'annexine (sur sa Ser⁵) et pourrait ainsi entraîner une modulation de l'interaction de l'annexine avec ses partenaires (Dorovkov and Ryazanov, 2004).

Le canal TRPM2 possède, lui, une activité ADP-ribose pyrophosphatase (Perraud et al., 2001) qui lui confère une sensibilité à l'ADP ribose cyclique (cADPR) et au Nicotinamide Adénine Dinucléotide (β -NAD⁺). Cependant cette activation est thermodépendante et n'a lieu que pour des températures supérieures à 36°C (Togashi et al., 2006). Ce canal n'est donc pas, par définition, un thermorécepteur mais son activation par le cADPR peut être modulée par la température environnante. D'autre part, la suppression du domaine « NUDIX » encodant l'ADP-ribose pyrophosphatase de TRPM2 empêche l'activation du canal par le cADPR comme par le β -NAD⁺, démontrant le rôle de la fonction enzymatique du canal dans son ouverture (Hara et al., 2002; Togashi et al., 2006).

IV.D) Diversité de fonctions des canaux TRP

La liste des fonctions physiologiques des canaux TRP est longue et régulièrement mise à jour dans les revues (Owsianik et al., 2006; Ramsey et al., 2006). Le but de ce chapitre est uniquement de donner quelques exemples (choisis arbitrairement) de la diversité de fonctions de cette famille de canaux.

IV.D.1) TRPC5 : élongation des neurites

La modulation de la concentration de calcium cytosolique était connue pour affecter la morphologie des cellules. Bezzierides *et coll* ont démontré que la quantité de canaux TRPC5 à la surface des neurones en culture primaire affectait directement la longueur des neurites (Bezzierides et al., 2004). Ces auteurs ont mis en évidence que la régulation de la quantité de canaux TRPC5 à la surface membranaire était contrôlée par le phénomène de translocation rapide de vésicules sous-membranaires au plasmalemme. Ce phénomène étant directement contrôlé par les facteurs de croissance comme le NGF, les auteurs ont proposé que le canal TRPC5 participe au phénomène d'extension des neurites connu pour être contrôlé par le NGF.

IV.D.2) TRPV5, TRPV6: absorption du Ca^{2+}

TRPV5 et TRPV6 sont les seuls canaux TRP à être hautement sélectifs pour le calcium $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$ contre $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} < 9$ pour les autres TRP (den Dekker et al., 2003). Ils sont, de surcroît, tous deux activés par la diminution de calcium libre cytosolique. Il a été démontré que TRPV5 par sa localisation luminale dans les cellules épithéliales de l'intestin et son interaction avec des protéines senseurs de la concentration de calcium libre, comme la calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$, était le principal transporteur calcique intervenant dans la réabsorption du calcium intestinal. D'autre part, TRPV5 intervient dans la résorption du calcium osseux par les ostéoclastes (van der Eerden et al., 2005).

IV.D.3) TRPM5 : senseur du goût

Le canal TRPM5 est un canal à sélectivité monovalente (comme son homologue TRPM4). Il est exprimé dans les papilles gustatives de la langue. Les animaux $\text{TRPM5}^{-/-}$ ne présentent plus de réponse à la stimulation des papilles gustatives par le sucre, les acides aminés ou encore les composés pimentés (Zhang et al., 2003). Il a été démontré que l'activation des récepteurs T1R et T2R par le sucre ou les acides aminés entraîne l'activation de la Phospholipase C, sous-unité $\beta 2$ ($\text{PLC}\beta 2$) qui stimule la déplétion en PIP_2 et la vidange des stocks calciques réticulaires par le IP_3R (Liu and Liman, 2003). Ces deux mécanismes entraînent l'ouverture du canal TRPM5 dont l'activité génère un potentiel récepteur dépolarisant (Figure 13).

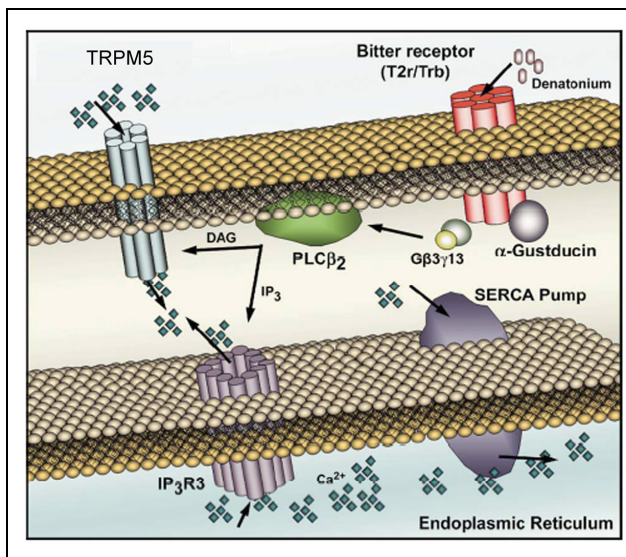


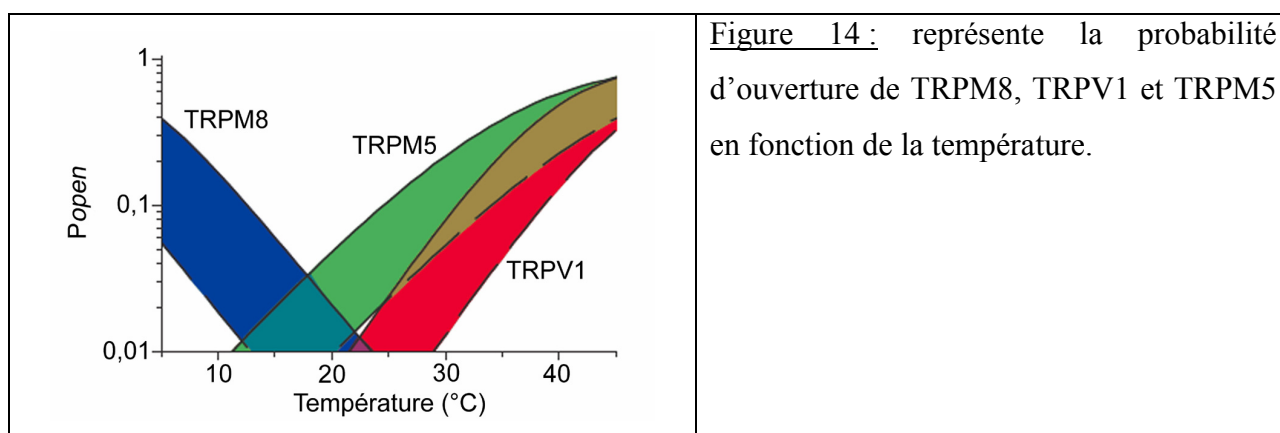
Figure 13 : représentation de la voie d'activation de TRPM5 dans les cellules papillaires de la langue. Liu, D *et coll.* (Liu and Liman, 2003)

TRPM5 n'est pas un thermorécepteur *stricto sensu*, mais il possède tout de même des propriétés de thermosensation. En effet, l'activité de TRPM5 est élevée à la température corporelle et décroît avec la diminution de cette température (Figure 14). Il a été démontré que la sensibilité de la détection du sucre par les papilles gustatives était parfaitement corrélée à la

thermodépendance de TRPM5 (Talavera et al., 2005). Les auteurs expliquant ainsi pourquoi la qualité de gustation était meilleure pour un aliment à 37°C par rapport à un aliment froid.

IV.D.4) TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV4 : thermorécepteurs

Alors que les canaux TRPM5 et TRPM2 sont des canaux thermosensibles ou thermodépendants, les canaux TRPM8 et TRPV1 sont qualifiés de thermorécepteurs car ils sont directement activés par des températures respectivement inférieures et supérieures à la température corporelle (Figure 14). De ce fait, une de leur fonction propre est de quantifier la température environnante, alors que cette même température ne fait que moduler l'activité des canaux TRPM5 et TRPM2.



De La Penna E. *et coll.* ont démontré que la surexpression de TRPM8 dans des cultures primaires de neurones permettait d'observer le déclenchement de potentiels d'action (PA) lors de l'application de menthol ou lors d'une diminution de température (de la Pena et al., 2005). Ils reportèrent que l'activation de TRPM8 entraînait une dépolarisation moyenne de 19 mV, laquelle dépassant le seuil de déclenchement des PA provoquant *in fine* la génération d'un train de PA dans certains neurones.

Ainsi, TRPM8 agit bien comme senseur de température en permettant le déclenchement d'un message nerveux consécutif à son activation.

IV.E) Les canaux TRP dans les pathologies

Ce chapitre reprend quelques exemples connus d'implication de canaux TRP dans certaines pathologies. Cette liste n'est en aucun cas exhaustive et vise seulement à montrer l'importance des canaux ioniques TRP sur la physiologie de l'organisme humain. Nombre de revues ont régulièrement mis à jour les connaissances et les spéculations sur l'implication des canaux TRP dans diverses pathologies (Hoenderop and Bindels, 2005; Inoue et al., 2006; Li et al., 2003; Nilius et al., 2005b; Wang, 2005).

IV.E.1) Surexpression de gènes et cancers (TRPM8, TRPV6)

Les deux candidats les plus prometteurs dans la famille des TRP pour le développement de marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques pour l'adénocarcinome prostatique sont les gènes *trpv6* et *trpm8*.

Le gène *trpv6* n'est que peu ou pas du tout exprimé dans la prostate saine et/ou dans l'adénome bénin. Son expression croît lors de la cancérogénèse et semble particulièrement élevée dans les métastases de la prostate, ainsi que dans les cancers hormono-indépendants (Peng et al., 2001; Wissenbach et al., 2001).

Le gène *trpm8*, initialement défini comme *trp-p8* (TRP-Prostate), présente une forte expression dans la prostate saine et une surexpression dans l'adénocarcinome (Tsavaler et al., 2001). Deux autres études ont démontré que l'expression de l'ARNm de TRPM8 décroît au cours de l'évolution du cancer du stade T2 au stade T3 puis T4 (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003). En résumé, le gène *trpm8* est surexprimé dans les cancers intracapsulaires et son expression diminue au cours de l'apparition des métastases locorégionales. Finalement, Henshall et coll ont démontré que la diminution d'expression de TRPM8 était associée à un mauvais pronostic lors de la rechute d'un cancer de la prostate (Henshall et al., 2003).

En conclusion, il semblerait que la dérégulation d'expression des gènes *trpv6* et *trpm8* au cours de l'oncogénèse de la prostate puisse permettre d'améliorer la « cartographie » moléculaire des tumeurs de la prostate.

IV.E.2) Perte de fonction et cancer (TRPM1)

Le gène *mélastatine* (*mlsn-1*) dont l'expression était connue pour augmenter au cours de l'oncogénèse du mélanome, code pour en fait la première protéine TRP du groupe M : TRPM1. Duncan et coll ont démontré qu'il existait une corrélation entre la diminution d'expression de l'ARNm de *trpm1* et le mélanome métastatique (Duncan et al., 1998). Une autre étude a mis en évidence l'existence d'une isoforme tronquée de TRPM1 (Fang and Setaluri, 2000). Cette isoforme tronquée, résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm de TRPM1, ne possède pas la région du pore ionique et est par conséquent cytosolique. Cette isoforme agit comme un dominant négatif sur l'activité de TRPM1 en bloquant l'export de la protéine fonctionnelle vers la membrane.

En conclusion, les cellules du mélanome présentent une expression diminuée de la forme « normale » de TRPM1 et transcrivent un dominant négatif responsable de la perte de fonctionnalité du canal TRPM1.

IV.E.3) Mutation et hypomagnésie (TRPM6)

Le canal TRPM6, comme nous l'avons précédemment décrit, est un chanzyme très perméable au magnésium. Schlingmann *et coll* ont démontré que l'hypomagnésie autosomale récessive avec une hypocalcémie secondaire était génétiquement corrélée à sept mutations ponctuelles du gène *trpm6* (Schlingmann et al., 2002). Cinq d'entre elles entraînent la formation d'un codon stop précoce aboutissant à la synthèse de protéines tronquées avant le domaine transmembranaire. Une des mutations provoque la délétion de l'exon 19 par la suppression d'une séquence consensus acceptrice d'épissage. Enfin, la dernière mutation consiste en la substitution de la sérine 141 en leucine. Chubanov *et coll* ont alors démontré que cette mutation ponctuelle était suffisante pour abolir la formation d'homotétramères de TRPM6 ainsi que la formation d'hétérotétramères TRPM6/TRPM7 entraînant une diminution de l'absorption de magnésium par la cellule (Chubanov et al., 2004).

IV.E.4) Polycystine et rein (TRPP)

Les canaux TRPP ou PKD2 (Polycystic Kidney Disease), au nombre de 3 : TRPP 2, 3 et 5, sont des canaux ioniques non-sélectifs agissant comme mécanorécepteurs des cellules ciliées de l'épithélium rénal (Cai et al., 1999; Luo et al., 2003; Nauli et al., 2003). Leurs mutations provoquent un syndrome rénal sévère (Deltas, 2001; Gonzalez-Perrett et al., 2001). De nombreuses mutations ont été détectées chez les familles atteintes de cette maladie autosomale dominante. Ainsi plus de 20 mutations de type délétion/insertion sont connues, environ 8 modifient l'épissage normal de l'ARNm de TRPP2 et 3 mutations non-sens sont répertoriées (Deltas, 2001).

IV.E.5) Sclérose glomérulaire segmentaire focale (TRPC6)

La sclérose glomérulaire segmentaire focale est une pathologie du rein dont la rigidification de certains glomérules conduit inexorablement à la perte de fonction de la filtration rénale. Cette maladie est une maladie autosomale dominante, mais présente aussi des cas sporadiques. Plusieurs mutations du canal TRPC6 (P112Q, R895C et E897K) dans les podocytes sont responsables d'une augmentation de fonction importante de TRPC6 (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005). Intervenant dans la filtration rénale, les podocytes possèdent des senseurs de pression leur permettant d'ajuster leur position à la pression capillaire. Ainsi, le signal calcique consécutif à la détection de la variation de pression devient inapproprié et peut conduire à une mauvaise fonction biologique et peut-être même au déclenchement de l'apoptose (Kriz, 2005). En outre, des mutations de l' α -actinine 4 et de la chaîne lourde de la myosine non-musculaire ont été reportées chez les patients présentant les mutations de TRPC6. Il est donc probable que les

causes moléculaires de la maladie fassent intervenir toute la voie de transduction allant de la détection de la pression aux changements de structure du cytosquelette des podocytes nécessaires pour contrebalancer la pression capillaire (Kriz, 2005).

Conclusion :

Environ 32 gènes humains et plus de 70 protéines sont présents dans les bases de données et forment la super-famille des canaux TRP. Cette profusion de canaux affiche toute sa variété quand on s'intéresse à leurs voies d'activation. SOC, SMOC, « TOC » ou « MOC », les canaux TRP se classent dans ces quatre grandes classes de mode d'activation. Certains TRP ont même été décrits comme étant des SOC dans un modèle cellulaire et des SMOC dans d'autres. Du thermorécepteur, à l'élongation des neurites, en passant par la sécrétion d'insuline, les canaux TRP semblent partout. En outre, la distribution des canaux TRP et de leurs isoformes dans les différents tissus composant l'organisme humain augmente encore la complexité de leur fonctionnement et de leurs rôles biologiques. Cette grande diversité chez les canaux TRP trouve son origine dans l'évolution et le besoin de développer de nouvelles fonctions afin d'assurer la survie de l'espèce.

V) Le canal TRPM8

Dans ce dernier chapitre, nous ferons la synthèse de l'ensemble des recherches portant sur le canal TRPM8 et présentes dans la littérature. Nous commencerons par récapituler le fonctionnement du récepteur au froid dans les neurones thermosensoriels, puis nous répertorierons les données traitant de la régulation de l'activité du canal. Pour terminer, nous rappellerons brièvement les résultats des études réalisées sur le gène *trpm8* dans la prostate et la vessie.

V.A) TRPM8 : récepteur au froid des neurones thermosensoriels

Le canal TRPM8 est exprimé dans les fibres afférentes A δ et C des ganglions de la racine postérieure de la moëlle épinière ainsi que dans les neurones afférents des ganglions trigéminaux (innervant l'arrière de la bouche) et fonctionne comme récepteur au froid et au menthol dans ces neurones (Kobayashi et al., 2005; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). L'activation du canal TRPM8 par la diminution de température (initiée vers 30°C, maximale entre 10 et 15°C) dans les neurones thermosensoriels induit une dépolarisation membranaire qui, lorsqu'elle dépasse le seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants, provoque le déclenchement d'un message nerveux sous forme de train de PA (de la Pena et al., 2005). TRPM8 est exprimé dans 44% des neurones thermosensibles de « *bas seuil* » dont le déclenchement de la réponse calcique intervient dès que la température tombe sous 29°C (Nealen et al., 2003), et dans environ 9% des neurones présentant une sensibilité de « *haut seuil* » (vers 20°C) (McKemy et al., 2002; Nealen et al., 2003). Il est intéressant de remarquer que 4% des neurones à *haut seuil*, présents dans les fibres nociceptives C, coexpriment le récepteur à la chaleur TRPV1 et le récepteur au froid TRPM8 (Kobayashi et al., 2005; Thut et al., 2003; Xing et al., 2006). Le courant TRPM8 dans ces neurones à *haut seuil* est de plus faible amplitude que celui des neurones à *bas seuil* et la réponse calcique induite est plus lente mais ne subit pas de désensibilisation contrairement à la réponse calcique des neurones à *bas seuil* (Nealen et al., 2003). L'ensemble de ces données suggère que le canal TRPM8 des fibres A δ est responsable de la détection de la sensation de froid, alors que celui exprimé dans les fibres C pourrait être impliqué dans la détection de la nociception. En effet, une température de 15°C est suffisante pour déclencher une réaction de nociception. Cependant, c'est le canal TRPA1, possédant une sensibilité au froid comprise entre 15 et 5°C, qui participe à la nociception du froid intense et à l'hyperalgésie (Kwan et al., 2006; Obata et al., 2005). Au contraire, TRPM8 participe à

l'analgésie due au froid par un mécanisme de rétrocontrôle glutaminergique des neurones thermosensibles sur les neurones nociceptifs (Figure 15, (Proudfoot et al., 2006)).

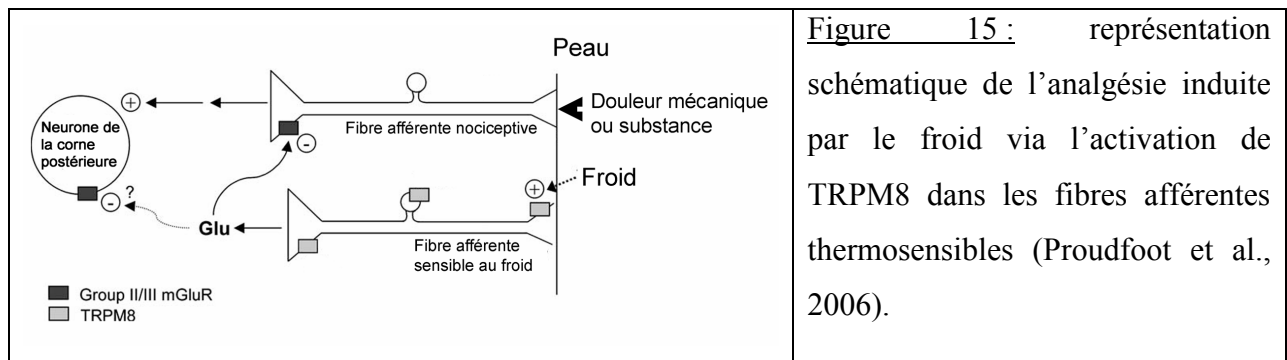
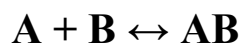


Figure 15 : représentation schématique de l'analgésie induite par le froid via l'activation de TRPM8 dans les fibres afférentes thermosensibles (Proudfoot et al., 2006).

La question la plus intrigante au sujet de TRPM8 reste sans conteste l'explication biophysique de la thermosensation. L'équipe du Dr. Nilius à Louvain a réussi à expliquer le principe de thermosensibilité en terme de thermodynamique (Voets et al., 2004). Le principe repose sur la loi d'Arrhénius qui décrit la relation entre la vitesse des réactions chimiques en fonction de la température et de l'énergie. Pour une réaction donnée :



Le déplacement de la réaction d'un côté ou de l'autre dépendant alors des constantes de vitesse k_1 et k_2 . Selon loi d'Arrhénius, la constante de vitesse k est égale à :

$$k = A \cdot e^{-E_a/T}$$

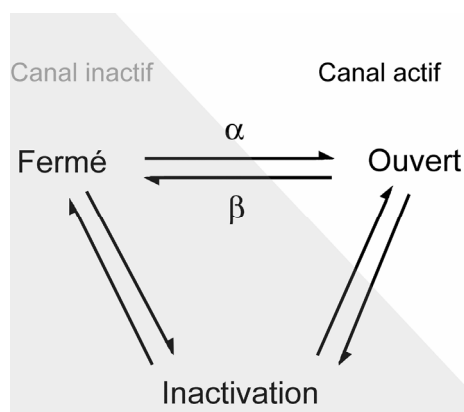
k : constante de vitesse

A : facteur d'orientation

E_a : énergie d'activation de la réaction (énergie minimale requise pour que la réaction se déplace).

T : température de la réaction

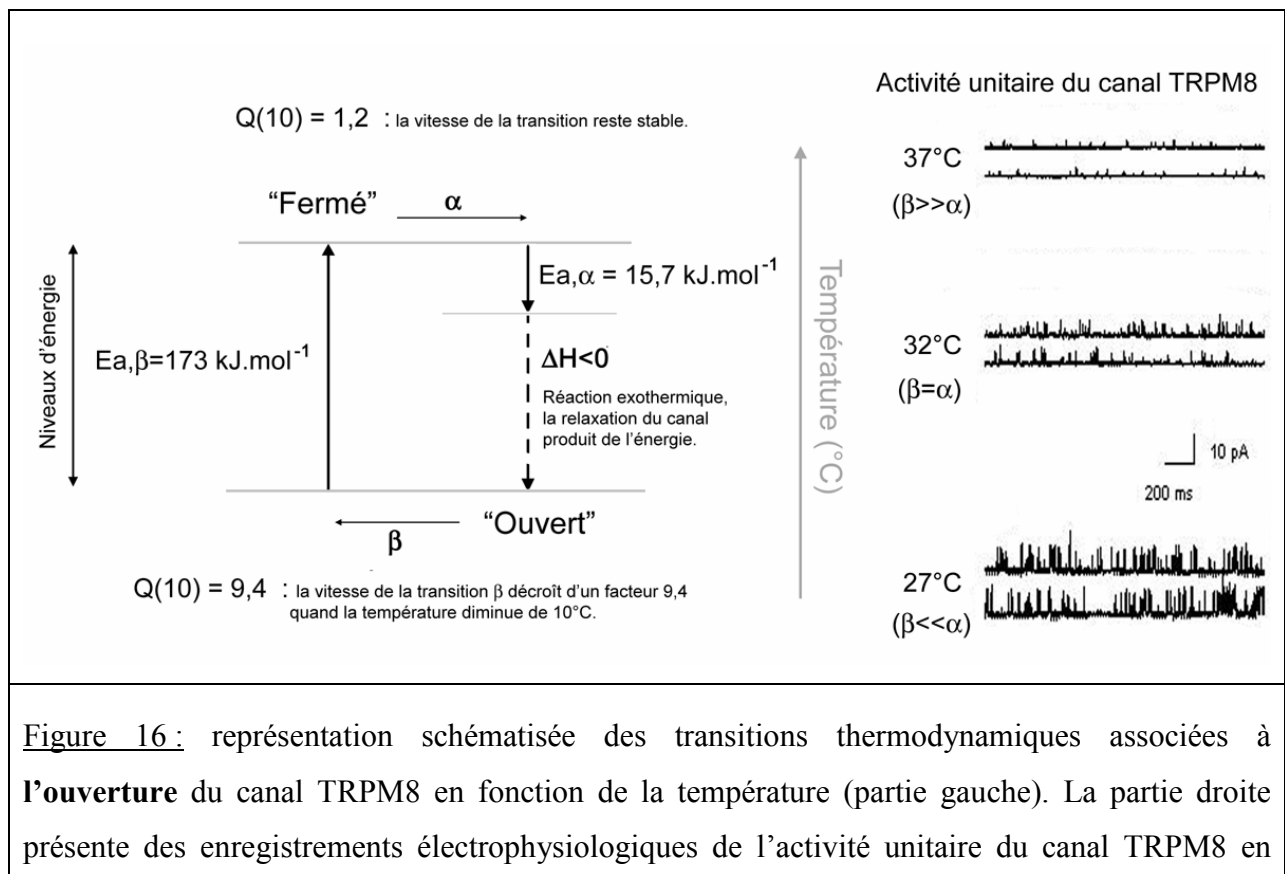
Appliquée à l'ouverture d'un canal ionique, cette formule est représentée ainsi :



Les constantes α et β représentent la vitesse de déplacement de la réaction chimique (sec^{-1}). Le rapport α/β définit le sens de déplacement de la réaction : $\alpha/\beta > 1$ déplacement vers l'état d'ouverture, mais si $\alpha/\beta < 1$ déplacement vers l'état fermé c'est-à-dire que le canal ne peut pas s'ouvrir. Quand $\alpha/\beta = 1$, la probabilité d'ouverture du canal est de 0,5. **Le canal a alors autant de chances de s'ouvrir que de rester fermé.**

Les constantes de vitesse α et β définissent le sens de la réaction (ici, du changement conformationnel du canal). Ces constantes possèdent leur propre énergie d'activation, respectivement : $E_{a,\alpha}$ et $E_{a,\beta}$. En terme de thermodynamique, l' E_a représente la « barrière énergétique » que doit surpasser le système pour effectuer une transition d'un état à l'autre.

Le travail de Voets *et coll* a consisté à démontrer que les canaux thermosensibles ne possèdent pas les mêmes $E_{a,\alpha}$ et $E_{a,\beta}$, contrairement aux canaux non thermosensibles pour lesquels $E_{a,\alpha} / E_{a,\beta} = 1$ (Voets et al., 2004). Finalement, ils ont mis en évidence que les canaux sensibles au froid sont caractérisés par $E_{a,\alpha} / E_{a,\beta} < 1$ (respectivement 2,98 kJ.mol⁻¹ et 32,70 kJ.mol⁻¹ pour TRPM8) alors que si $E_{a,\alpha} / E_{a,\beta} > 1$, les canaux seront sensibles à une augmentation de température (respectivement 39,32 kJ.mol⁻¹ et 4,39 kJ.mol⁻¹ pour TRPV1). Ces données suggèrent que la fermeture du canal TRPM8 requiert presque 10 fois plus d'énergie que son ouverture. D'après les mesures de Brauchi *et coll* (Brauchi et al., 2004), l'enthalpie (ΔH) de la transition fermé-ouvert est de valeur négative et est donc une réaction exothermique. Cette émission d'énergie génère ainsi une partie de l'énergie nécessaire à la transition, diminuant d'autant le niveau de la « barrière énergétique » $E_{a,\alpha}$ (Figure 16).



fonction de la température, obtenus par la technique de Patch-clamp en configuration « cellule-attachée » (Données non publiées du laboratoire).

Selon les principes de la thermodynamique, plus la valeur de E_a est élevée plus sa vitesse de réaction varie avec la variation de température. Appliqués à TRPM8, ces principes relatent le fait que qu'une variation de 10°C modifie d'un facteur 1,2 la vitesse de la réaction d'ouverture et d'un facteur 9,4 la vitesse de la réaction de fermeture (Voets et al., 2004). Cela signifie concrètement que l'état d'ouverture du canal TRPM8 n'est pas influencé par la variation de température, mais que la transition vers l'état « fermé » est très sensible à cette variation de température (Figure 16). De fait, lors de l'activation de TRPM8 par la diminution de température, la transition β devient inférieure à la transition α , la conformation « ouvert » devient alors plus stable que la conformation « fermé ».

Le changement d'énergie vers l'état ouvert provoque une modification de la voltage-dépendance de TRPM8 avec un décalage de la courbe d'activation vers les potentiels plus négatifs (Figure 17). Ce phénomène provoque une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal pour des potentiels de membrane identiques au potentiel de repos des cellules (Pour plus d'explications, voir chapitre « rappels relatifs à la technique de Patch-clamp » dans la partie Matériels et Méthodes).

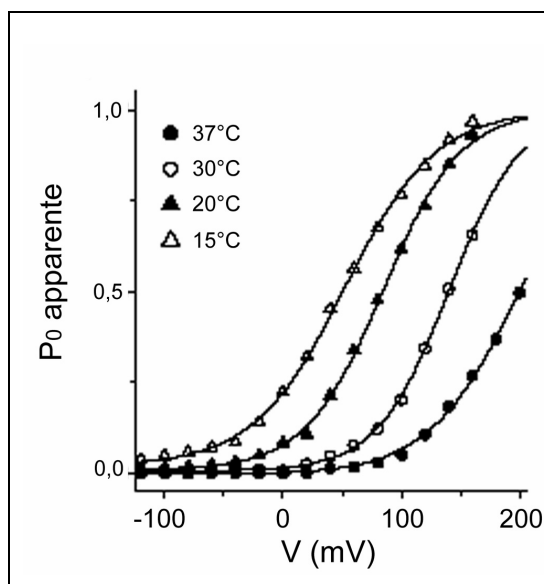


Figure 17 : évolution de la probabilité d'ouverture (P_0) apparente du canal en fonction du potentiel membranaire pour différentes températures (Voets et al., 2004). Notez le décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs (rappel : le potentiel de repos des cellules varie, en général, entre -70 mV et -30 mV).

Cette activation thermodynamique de TRPM8 n'a, pour l'heure, que peu de bases moléculaires. Néanmoins, Brauchi *et coll* ont publié des résultats essentiels portant sur le rôle de la boucle cytosolique carboxyterminale du canal dans la thermosensation (Brauchi et al., 2006). En effet, ces auteurs ont démontré que l'échange des boucles cytosoliques carboxyterminales des canaux TRPM8 et TRPV1 inversait parfaitement leurs propriétés de thermosensibilité et leurs

caractéristiques thermodynamiques, le canal TRPM8(Ct-TRPV1) devenant ainsi un récepteur à la chaleur. Cependant, les auteurs concluaient que la sensibilité thermodynamique était diminuée en comparaison des canaux « sauvages ». La boucle cytosolique carboxyterminale du canal joue-t-elle donc le rôle de thermosenseur bien que d'autres segments du canal soient impliqués dans la sensibilité thermodynamique ?

V.B) Régulation de l'activité du canal TRPM8

Deux voies physiologiques de régulation de l'activité de TRPM8 sont aujourd'hui répertoriées : l'inhibition par la Protéine Kinase C (PKC) et le phénomène de « run-down » dépendant des stocks de Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2).

La régulation de TRPM8 par la PKC est relativement paradoxale puisque qu'il a été démontré que l'activation de cette kinase entraîne une diminution du taux de phosphorylation de TRPM8 (Premkumar et al., 2005). Les auteurs suggèrent que l'activation de la PKC stimulerait l'activité d'une phosphatase qui diminuerait en conséquence le niveau de phosphorylation de TRPM8. Cette diminution de phosphorylation provoquerait à son tour une diminution de la P_0 du canal TRPM8 et limiterait donc l'amplitude du courant macroscopique (courant global au niveau de la cellule). Dans les neurones DRG, cette activation de la PKC diminue le nombre d'événements dépolarisants post-synaptiques nécessaire au déclenchement d'un PA.

Le phénomène de « run-down » représente la décroissance du courant TRPM8 activé par le menthol ou la température. Le mécanisme sous-jacent a récemment été expliqué : l'entrée de calcium par le canal TRPM8 provoque l'activation d'une phospholipase C (PLC) activable par le calcium (ex : la PLC δ 1) qui hydrolyse les stocks de PIP2 (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005). Cette chute de la concentration locale de PIP2 réduit alors l'activité du canal.

Une caractéristique primordiale de l'action du PIP2 sur TRPM8 est la relation entre la concentration de PIP2 nécessaire au développement de 50% de l'activité du canal ($[PIP2]_{50}$) et la variation de température. En effet, les auteurs ont reporté que la diminution de température induit une diminution de la $[PIP2]_{50}$ (Rohacs et al., 2005). On peut ainsi imaginer que la diminution de température active TRPM8 en augmentant sa sensibilité au PIP2. En outre, les sites d'interactions du PIP2 avec le canal seraient situés dans la boucle carboxyterminale du canal, comme le senseur de température (Brauchi et al., 2006; Rohacs et al., 2005).

La question reste donc de savoir si l'interaction entre la boucle carboxyterminale du canal TRPM8 (chargée positivement) et le PIP2 (chargé négativement) se comporte comme un senseur thermodynamique répondant aux variations d'énergie de l'environnement en influençant la conformation du canal.

V.C) TRPM8 dans la sphère uro-génitale et le cancer

Le premier article traitant du gène *trpm8* (précédemment appelé *trp-p8*) reportait le clonage de ce gène par une analyse soustractive d'ADNc issus de lots de prostate saine et de lots de prostate cancéreuse (Tsavaler et al., 2001). L'analyse de la structure hypothétique de la séquence protéique prédisait que la protéine produite devait être un canal ionique appartenant à la famille des TRP. Comparativement aux autres TRPM, la découverte tardive de TRPM8 lui a valu d'être le dernier membre de ce groupe à être cloné. Tsavaler *et coll* démontrèrent, dans leur article fondateur, l'expression de TRPM8 dans la prostate, les testicules, et faiblement dans le sein. Sa surexpression en cas de cancers a été détectée dans la prostate, le sein, le poumon, le mélanome et l'adénocarcinome colorectal (Tsavaler et al., 2001). D'autres études utilisant d'autres techniques ont confirmé la surexpression de TRPM8 dans le cancer de la prostate intracapsulaire (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003; Schmidt et al., 2006). En outre, Henshall *et coll* ont mis en évidence l'androgéno-dépendance de TRPM8, ce qui a été confirmé par Zhang *et coll* (Henshall et al., 2003; Zhang and Barritt, 2004). La fonctionnalité de TRPM8 dans les cellules cancéreuses prostatique a été mise en évidence par l'enregistrement de variation de la concentration de calcium libre dans ces cellules lors de l'application de menthol (Zhang and Barritt, 2004). Cependant, l'absence d'études électrophysiologiques n'a pas permis de démontrer que l'entrée de calcium depuis le milieu externe transitait par le canal TRPM8 dans la plasmalemme. De plus, ces auteurs ont suggéré que TRPM8 soit nécessaire à la survie des cellules cancéreuses de la prostate.

Les données portant sur l'expression de TRPM8 dans les testicules se limitent à quelques résultats de PCR ou d'immunohistochimie (Stein et al., 2004; Tsavaler et al., 2001). Ni la fonctionnalité de TRPM8 dans ces cellules ni son rôle n'ont été démontrés pour le moment.

Depuis les années 1990, l'application intravésicale de menthol ou d'un liquide froid est connue, pour engendrer une contraction réflexe du detrusor (système musculaire lisse de la vessie) (Fall et al., 1990). Ce réflexe fait intervenir un récepteur au froid présent sur les fibres afférentes A δ et C. Or, depuis quelques temps, l'expression de TRPM8 dans la vessie a été démontrée par immunohistochimie dans les fibres afférentes C et A δ innervant la vessie ainsi que dans l'urothélium (Mukerji et al., 2006; Stein et al., 2004; Tsukimi et al., 2005). Ces travaux ont démontré que l'augmentation du nombre d'axones afférents exprimant TRPM8 est corrélée à des syndromes de vessie douloureuse et d'hyperactivité du detrusor. Les auteurs ont donc proposé que TRPM8 soit impliqué dans l'hyperalgésie au froid et la douleur de la vessie. Cependant, cette hypothèse est en opposition avec la démonstration du rétrocontrôle des fibres

Aδ sur les fibres nociceptives C lors de l'activation de TRPM8 sur ces fibres Aδ (Προυδφοοτ ετ αλ., 2006).

Le rôle de TRPM8 dans les cellules urothéliales reste, quant à lui, un mystère.

Problématiques et objectifs

Depuis six ans, le petit monde des canaux cationiques TRP n'a cessé de croître autant en terme de publications que d'équipes impliquées. Ainsi, au moment de mon DEA, seuls 3 articles traitant du canal TRPM8 étaient parus (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a; Tsavaler et al., 2001) contre une cinquantaine d'articles et une dizaine de revues fin septembre 2006. Cependant, en se basant d'une part sur les questions soulevées par ces trois articles initiaux et d'autre part sur le savoir-faire du laboratoire dans l'étude électrophysiologique des cellules cancéreuses de la prostate, nous avons bâti mon projet de thèse sur les idées suivantes :

- 1] La compréhension des mécanismes impliqués dans la cancérisation de la prostate, et son évolution vers l'androgéno-indépendance qui pourrait aboutir au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques suppléant l'hormonothérapie.
- 2] Des dérégulations du calciosome pourraient être en partie responsables de l'apparition et de l'évolution du cancer de la prostate
- 3] En cherchant un nouveau marqueur pronostique du cancer de la prostate, Tsavaler et ses collègues ont découvert un nouveau canal calcique hypothétique appelé TRPM8 (Tsavaler et al., 2001). Peier et McKemy ont, par la suite, démontré que le canal TRPM8 était aussi exprimé dans les neurones thermosensibles et qu'il s'agissait en fait du canal CMR1 (« Cold/Menthol Receptor ») aussi connu sous le terme de « récepteur au froid » (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a).
- 4] La lignée cellulaire androgéno-dépendante LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) exprime l'ARNm de TRPM8, alors que les lignées cellulaires androgéno-réfractaires PC-3 et DU145 ne l'expriment pas (Tsavaler et al., 2001).
- 5] Nos premiers résultats électrophysiologiques démontraient que le courant ionique activé par le menthol (activateur du canal TRPM8) dans les cellules LNCaP ne présentait pas du tout les propriétés du courant TRPM8 classiques présent dans les neurones.

Comme ces problématiques étaient larges et le sujet méconnu, notre champ d'investigation en était d'autant plus important. Ainsi nos deux principaux objectifs, définis dans le projet de recherche soumis à l'INSERM et à la région Nord-Pas-de-Calais, étaient d'une part de comprendre le mode d'expression du gène *trpm8* dans la prostate humaine et d'autre part d'étudier l'activité du canal et sa régulation au cours de l'oncogénèse de la prostate.

Contrôle de l'expression du gène *trpm8* et de sa protéine dans les cellules de la prostate humaine

- Quel est le phénotype des cellules exprimant TRPM8 dans la prostate humaine ?
- Quelle est la relation entre le phénotype androgéno-dépendant et l'expression du gène *trpm8* ? Pourquoi *trpm8* n'est-il plus exprimé dans les cellules androgéno-réfractaires ?
- L'expression du canal TRPM8 est-elle identique dans les cellules épithéliales issues de prostates saines et cancéreuses ?

Les mécanismes de régulation/activation du canal TRPM8

- Quels sont les activateurs physiologiques et les modulateurs du canal cationique TRPM8 dans la prostate normale ?
- Quelle est la composition du tétramère TRPM8 fonctionnel ?
- Existe-t-il des variations de composition de la structure quaternaire du canal dans les cellules cancéreuses ?
- Quelles en seraient les conséquences sur l'activité du canal TRPM8 ?

L'objectif général de cette thèse est donc l'étude du gène *trpm8* et de sa protéine-canal dans le but de supputer, si ce n'est de comprendre, le rôle de TRPM8 dans la physiologie et la physiopathologie de la prostate humaine.

Matériels et méthodes

Avant propos.

Cette partie « matériels et méthodes » inclut quelques résultats qui sont utilisés pour imager les différentes techniques de biologie moléculaire et cellulaire, mais aussi pour présenter quelques expériences contrôles qui ne sont toujours pas décrites dans les articles.

Mon travail personnel dans cette thèse et au sein du laboratoire s'est focalisé sur les expériences de biochimie, biologie moléculaire et cellulaire et microscopie confocale. J'ai réalisé quelques expériences d'imagerie calcique, mais la plupart des expériences présentées dans cette thèse proviennent de collaborations internes. Pour finir, je n'ai pas réalisé d'expériences de Patch-clamp. Toutes les expériences d'électrophysiologies présentées dans cette thèse ont donc été réalisées par des collègues du laboratoire à l'occasion de collaborations internes. Cependant, la nécessité de compréhension de l'électrophysiologie et ma brève expérience d'enseignement (Travaux Dirigés d'électrophysiologie) m'ont permis de bien appréhender ces techniques. Afin de clarifier pour tous, les résultats d'électrophysiologie présentés dans cette thèse, le dernier point de ce chapitre consistera en un bref rappel des notions importantes d'électrophysiologie et de la technique de patch-clamp.

I) Culture cellulaire

I.A) Les lignées cellulaires

Les différentes lignées cellulaires utilisées au cours de cette thèse ont été rassemblées dans le tableau suivant afin d'en simplifier la lecture. Les milieux de culture, annotés *CdN* (Conditions Normales), ont été complétés avec 100 µg/ml de kanamycine, 1% de L-glutamate et 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Les milieux de culture particuliers sont décrits dans le point I.C de la section Matériels et Méthodes.

Nom	Définition	Origine	Milieu de culture	Conditions ou caractéristiques particulières
HEK	Human Embryonic Kidney	ATCC	DMEM <i>CdN</i>	Cellules humaines de rein embryonnaire transformées par l'adénovirus.
HEK-Trex	Human Embryonic Kidney	Invitrogen	DMEM <i>CdN</i>	Expression du répresseur Tétracycline
HEK-TRPM8	Human Embryonic	Labo	DMEM <i>CdN</i>	HEK-Trex avec insertion génomique du vecteur TRPM8/pcDNA4. Le gène <i>trpm8</i>

	Kidney			est mis sous le contrôle du répresseur Tet. L'ajout de tétracycline (1 µg/ml) dans le milieu de culture permet d'induire l'expression de TRPM8.
HEK-TRPM8/sTRPM8α et sTRPM8β	Human Embryonic Kidney	Labo	DMEM <i>CdN</i>	HEK-TRPM8 avec insertion génomique du vecteur sTRPM8α/pcDNA3 ou sTRPM8β/pcDNA3.
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate	ATCC	RPMI <i>CdN</i>	Cellules de prostate humaine métastasées dans un ganglion lymphatique. Cette lignée exprime le récepteur des androgènes et le PSA (Antigène spécifique de la prostate).
PNT1A	Prostate Normal Transformed cells	ECACC	DMEM <i>CdN</i>	Cellules de prostate normale humaine transformées par l'antigène grand T du virus simien SV40. Cellules initialement décrites comme androgéno-dépendantes, mais ayant perdues l'expression du récepteur des androgènes après quelques passages en culture.
PC-3	Prostate carcinoma	ATCC	RPMI <i>CdN</i>	Cellules de prostate humaine métastasées dans l'os. Cette lignée androgéno-indépendante présente le phénotype des cellules épithéliales intermédiaires précoces.
DU-145	Prostate carcinoma	ATCC	RPMI <i>CdN</i>	Cellules de prostate humaine métastasées dans la glie. Cette lignée est androgéno-indépendante.
HaCaT	Kératinocyte s	Laboratoires Pierre Fabre	DMEM <i>CdN</i>	Lignée de kératinocytes humains auto-immortalisée en culture primaire.

I.B) La culture de cellules primaires

I.B.1) Protocole par dissociation trypsique

- Dans du milieu DMEM complet, enlever le tissu conjonctif et couper les nodules épithéliaux en petits fragments (< 1mm³) avec des lames de scalpel stériles.

- Incuber les fragments de tissu dans 5 ml de milieu DMEM sans sérum et en présence de trypsine (0,1%) pendant 10 minutes à 37°C (bain marie). Agiter régulièrement le flacon.
- Ajouter l'inhibiteur de trypsine (1 mg/ml) et incuber à 37°C pendant 5 minutes.
- Ajouter la désoxyribonuclease de type 1 (DNase I, 20 µg/ml) et 5 ml de milieu DMEM complet (pour stopper totalement la réaction trypsique et détruire l'ADN génomique libéré). Incuber 5 minutes dans le bain marie à 37°C.
- Centrifuger 5 minutes à 800*g.
- Suspendre le culot dans 5 ml d'une solution HBSS (Hank's balanced salt solution) sans Ca²⁺, ni Mg² et contenant 2 mM EDTA. Incuber pendant 5 minutes à 37°C, puis prélever les fragments en solution avec une pipette de 5 ml et faire plusieurs allers-retours de manière à dissocier les fragments.
- Centrifuger 5 minutes à 800*g.
- Laver le culot dans 5 ml d'une solution HBSS avec 1 mM de Ca²⁺. Incuber pendant 5 minutes à 37°C, puis prélever les fragments en solution avec une pipette de 5 ml et faire plusieurs allers-retours de manière à dissocier les fragments.
- Centrifuger 5 minutes à 800*g.
- Pour finir suspendre les cellules dans 4 ml de milieu KSF complétement pour la culture de cellules épithéliales. Prélever les fragments en solution avec une pipette de 5 ml et faire plusieurs allers-retours de manière à dissocier les fragments. Laisser les fragments tomber par gravité et prélever le surnageant contenant les cellules isolées.
- Déposer les cellules dans de petites gouttes de milieu afin d'augmenter l'efficacité de l'adhésion.
- Laisser les cellules adhérer à la boîte pendant un à deux jours sans que les gouttes ne sèchent, puis compléter le milieu au volume adapté au type de boîte.

I.B.2) Protocole de mise en culture d'explants

- Dans un milieu DMEM complet, enlever le tissu conjonctif et couper les nodules épithéliaux en petits fragments (< 1mm³) avec des lames de scalpel stériles.
- Dans des boîtes précoâtées de type « Primaria » (Nunc), déposer les fragments dans des gouttes du milieu approprié au type cellulaire cultivé. Laisser les fragments adhérer pendant quatre à cinq jours en complétant les gouttes de milieu afin d'éviter la dessiccation. Après une petite semaine, compléter le milieu au volume adapté au type de boîte.

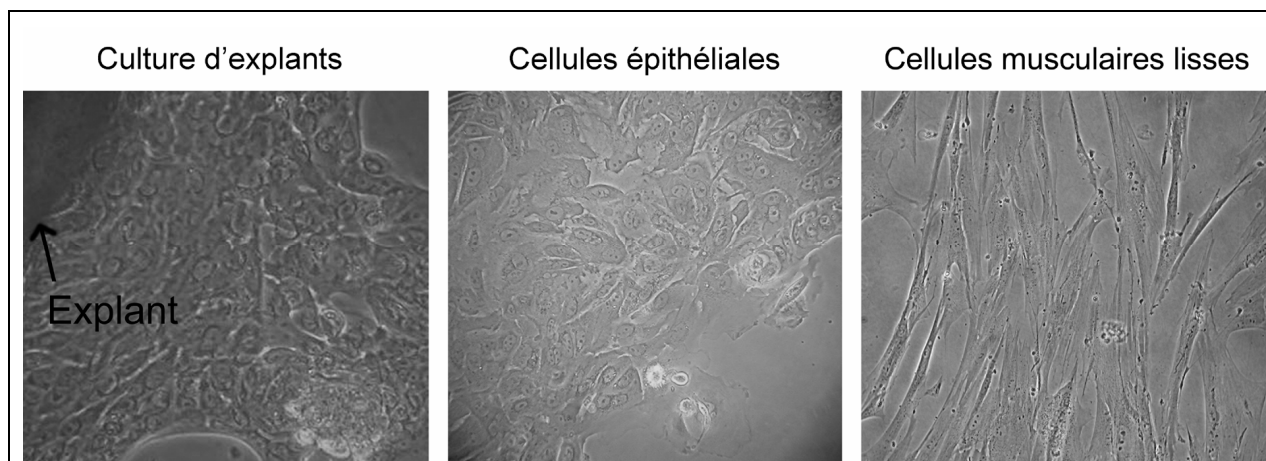


Figure 18 : photos montrant la sortie des cellules de l'explant (« culture d'explants ») puis la morphologie des deux types cellulaires propagés en culture primaire : les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses.

I.C) Congélation/décongélation

La congélation :

Toutes les lignées sauvages et modifiées sont congelées selon le même protocole. Environ un million de cellules est repris dans 1 ml de milieu de congélation puis transféré dans une ampoule de congélation. Les ampoules sont placées dans une boîte de congélation, elle-même mise dans le congélateur -80°C. L'isolation des tubes du froid par l'isopropanol permet au milieu cellulaire de perdre environ 1°C par minute, permettant un lent refroidissement. La conservation à -80°C est utilisée pour les ampoules de cellules servant à une décongélation régulière afin de renouveler les lignées utilisées. La congélation à long terme est réalisée en stockant les ampoules dans un container à azote liquide après les avoir laissées environ une semaine à -80°C.

Le milieu de congélation est composé de :

- 45% de milieu de culture frais et complet
- 45% de milieu conditionné de la lignée,
filtré deux fois
- 10% de DMSO

La décongélation :

- Plonger l'ampoule dans le bain-marie chauffé à 37°C et incuber jusqu'à décongélation de la suspension cellulaire.
- Transférer la suspension cellulaire dans un tube de 15ml et ajouter 5 ml de milieu complet.
- Centrifuger 5 min à 800*g.
- Eliminer le surnageant pour enlever le DMSO de la solution.

- Suspendre les cellules dans 10 ml de milieu complet et les mettre dans un flacon de 75 cm².
- Laisser les cellules adhérer et croître.

I.D) Préparation des milieux spéciaux

I.D.1) Sérum « déstéroïdé »

- Incuber 100 ml de sérum de veau fœtal avec 10 g de charbon actif (Charcoal, activated ; SIGMA) pendant la nuit à 4°C, sous agitation.
- Centrifuger à 2 500*g pendant 30 min à 4°C pour éliminer le maximum de charbon actif.
- Centrifuger à 10 000*g pendant 30 min à 4°C pour purifier le sérum.
- Centrifuger à 20 000*g pendant 30 min à 4°C pour purifier le sérum.
- Filtrer le sérum avec les filtres de 0,22 µm sous la hotte aspirante pour stériliser.
- Aliquoter puis stocker au congélateur -20°C.

I.D.2) Milieu standard pour la culture primaire

Les cellules primaires épithéliales de prostate sont cultivées dans un milieu KSF-SFM (Keratinocyte- Serum Free Medium), 2% sérum de veau fœtal, kanamycine 100 µg/ml, gentamycine 100 µg/ml, 1% L-glutamate, EGF (0,2 ng/ml), extrait pituitaire bovin (25µg/ml) et 1 nM 5α-DHT.

Les cellules musculaires lisses de prostate sont cultivées dans un milieu RPMI complémenté par 10% sérum de veau fœtal sans stéroïdes, kanamycine 100 µg/ml, 1% L-glutamate et 1 nM 5α-DHT.

II) Transfection

II.A) Transfection transitoire

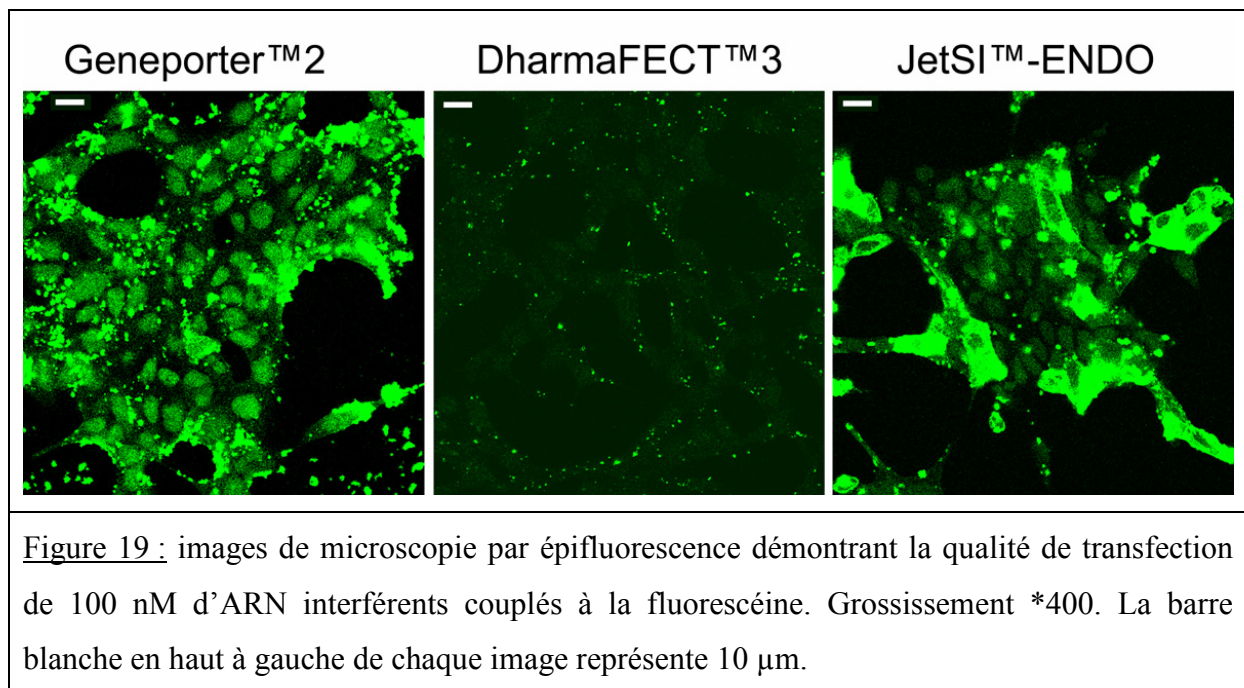
II.A.1) Lipofection

Les transfections de plasmide par lipofection furent réalisées principalement avec le Geneporter™2 (Gene Therapy System). Cependant, j'ai aussi eu l'occasion de tester la LipofectAMINE™ (Invitrogen) et le FuGENE™6 (Boehringer) afin de déterminer lequel permettait d'obtenir le meilleur rendement de transfection d'un plasmide encodant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) dans les cellules LNCaP. Le Geneporter™2 ayant été le plus efficace, nous l'avons utilisé. Selon la procédure conseillée par le fournisseur, le Geneporter est

d'abord mélangé avec 4 volumes de milieu de culture sans sérum et mixé pendant que l'ADN ou l'ARN est mélangé dans le « DNA diluent ». Après 3 minutes d'incubation, les deux mélanges sont rassemblés et laissés à incuber pendant 8 minutes. Finalement, le mélange est déposé sur les cellules dans un milieu sans sérum. Après environ 10 heures d'incubation, un volume de milieu complémenté est ajouté sur les cellules pendant une demi-journée. Le milieu est ensuite remplacé par du nouveau milieu complémenté. Les cellules peuvent alors être utilisées dans les 12 à 48 heures suivantes.

Les transfections des siARN (petits ARN interférants) furent réalisées soit avec le Geneporter™2 soit avec le *TransIT-TKO*® (Mirus) ou avec le JetSI™-ENDO (Polyplus transfection). Le principe de ces lipofecants reste le même.

Afin de déterminer lequel était le plus approprié, j'ai réalisé un test de transfection avec un siARN contrôle couplé à la fluorescéine dans la lignée LNCaP. Ce test comparant le Geneporter™2, le JetSI™-ENDO et le DharmaFECT™3 (Dharmacon) nous a permis de valider l'efficacité du Geneporter™2 et du JetSI™-ENDO. La figure 15 montre des champs représentatifs de cellules LNCaP transfectées par le siARN-fluorescéine.



II.A.2) Nucléofection

La « nucléofection » (transfection au moyen du nucleofector) est une technique d'électroporation récemment développée par la société Amaxa. Cette technique permet de transférer du matériel nucléaire directement dans le noyau des cellules, d'où le terme de « Nucleo-fection ». La nucléofection est réalisée sur des cellules en suspension. Les cellules sont

culottées par centrifugation puis reprises dans 100 μ L de tampon de nucléofection (variant selon le modèle cellulaire) et transférées dans une cuve d'électroporation. L'ADN est alors directement ajouté dans l'homogénat. Les cellules sont alors électroporées dans le nucléofector puis directement remises dans leur milieu de culture. Le plasmide commence à être exprimé 4 heures seulement après la nucléofection.

Les expériences de surexpression ont été réalisées 24 à 48 heures après la nucléofection et les études d'extinction par ARN interférence 60 à 96 heures après.

Le tableau suivant regroupe les paramètres de nucléofection utilisés pour chaque type cellulaire (les lignées marquées d'une astérisque sont celles ayant nécessitées la mise au point du protocole de nucléofection au sein du laboratoire) :

Lignée	Tampon	Programme
HEK	V	A-23
PNT1A*	PEC	T-020
LNCaP	R	T-009
PC-3	V	T-013
DU-145*	L	A-23
PS-1*	T	T-020
Cellules primaires de prostate*	PrEC	S-005
HaCaT	V	U-020

II.B) Etablissement de lignées stables

Les différentes lignées exprimant stablement un gène hétérologue, c'est à dire ayant intégré dans leur génome le vecteur encodant ce gène d'intérêt, furent toutes obtenues par la méthodes suivantes.

Deux jours après transfection ou nucléofection, les cellules sont mises en contact avec l'antibiotique de sélection à une dose pré-déterminée lors d'un test de toxicité. Lorsque toutes les cellules contrôles (non transfectées) sont mortes, la sélection est arrêtée pour permettre aux clones de croître. Les différents clones résistants sont alors récupérés soit directement dans un cône de pipette avec de la trypsine soit trypsinisés dans des anneaux de repiquage puis sous-clonés. Les différents clones obtenus sont ensuite criblés par PCR, Western-blot et analyses fonctionnelles (Patch-clamp et/ou imagerie calcique) ; les clones positifs sont congelés.

III) Biologie moléculaire

III.A) RT-PCR

Récupération des cellules.

- Après un rinçage par une solution de PBS, décoller les cellules avec une solution PBS + EDTA 0,54 mM.
- Transférer les cellules en suspension dans un tube de 15 ml, puis centrifuger 10 min à 800*g.
- Eliminer le surnageant et laver une fois avec du PBS, puis reprendre le culot par 1 ml de PBS et transférer la suspension cellulaire dans un tube de 1,5 ml.
- Centrifuger, éliminer le surnageant, puis congeler les échantillons à -20°C en attendant de réaliser l'extraction de l'ARN.

Extraction d'ARN (Méthode de Chomczynski, (Chomczynski and Sacchi, 1987)).

- Sur un culot de 1,5 à 2×10^6 cellules, ajouter 563 μl de (solution D + 2 β mercapto-éthanol 0,7%), aspirer et refouler plusieurs fois avec une seringue 1 ml + aiguille 26G1/2 afin de rompre l'ADN.
- Ajouter 56,25 μl acétate de sodium 2 M, puis vortexer 15 à 20 secondes.
- Ajouter 675 μl de mélange phénol / chloroforme / AIA, puis vortexer 15 à 20 secondes.
- Incuber 10 minutes sur glace, puis centrifuger $> 12\ 000^*g$ à 4°C pendant 15 à 20 min
- Transférer la phase supérieure dans un nouveau tube 1,5 ml.
- Ajouter $\frac{1}{10}$ de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,0 puis vortexer.
- Ajouter 2,5 à 3 volumes d'éthanol 100% froid et vortexer.
- Mettre à précipiter à -20°C pendant au moins 1 nuit, ou 2 heures à -80°C .
- Centrifuger $> 12\ 000^*g$ à 4°C pendant 30 min, éliminer le surnageant et faire un lavage avec de 1 ml d'éthanol 70%.
- Centrifuger $> 12\ 000^*g$ à 4°C pendant 30 min, éliminer le surnageant et faire sécher le culot.
- Reprendre le culot sec par 30 μl d' H_2O , vortexer, puis doser avec le biophotomètre.

Le traitement à la Deoxyribonucléase 1 (DNase I).

- Dans un nouveau tube 1,5 ml, mélanger 2 μg d'ARN avec de l'eau ultra pure pour un volume final de 8 μl .
- Ajouter 1 μl de Tampon 10 x + 1 μl DNase I (1 U/ μl).

- Incuber à 25°C pendant 1 heure.
- Ajouter 1 µl EDTA 25 mM pH 8,0 pour stopper la réaction.
- Incuber à 65°C pendant 10 mn.
- Plonger les tubes dans la glace.

La transcription inverse.

- Dans un nouveau tube 1,5 ml, mélanger 5,5 µl d'ARN traité DNase I avec 1,2 µl de RN6 ou oligo DT + 2,9 µl H₂O.
- Incuber à 70°C pendant 10 min puis plonger les tubes dans la glace.
- Centrifuger les échantillons (30 sec à 10 000*g).
- Préparer la solution de transcription inverse :
 - Tampon 10x II sans Mg²⁺ : 2 µl
 - MgCl₂ 25 mM : 2,4 µl
 - dNTP (2,5mM/dNTP) : 4 µl
 - MULV (ADN polymérase ARN dépendante) (50 U/µL) : 1 µl
 - RNAse inhibiteur (20 U/µL) : 1 µl
- Ajouter 10,4 µl de solution de transcription inverse par tube.
- Incuber 15 min à température ambiante.
- Incuber 30 min à 42°C.
- Incuber 10 min à 95°C.
- Plonger les tubes dans de la glace
- Centrifuger les échantillons (30 sec à 10 000*g.)
- Stocker à -20°C ou faire la PCR.

La PCR (Polymerase Chain Reaction).

Pour une réaction de PCR de 20 µl :

Taq Gold (5 U/µl): 0,12 µl (1 U)
 Tampon 10x II sans Mg²⁺ : 2 µl
 MgCl₂ 25 mM : 2 µl
 dNTP (2,5mM/dNTP) : 1,6 µl
 Oligonucléotides (sens/anti-sens, 10 mM) : 1 µl
 DNAc matrice : 1 µl
 H₂O : qsp 20 µl

Conditions de PCR :

95°C	95°C	58-62°C	72°C	72°C	4°C
5 min	30 sec	30 sec	1 min/ 1 kb	5 min	∞

25-40 cycles

III.B) SCRT-PCR (RT-PCR sur cellule unique)

Prélèvement des cellules :

Après les études sur cellule unique par les techniques électrophysiologiques, le cytoplasme des cellules est aspiré dans la pipette de patch-clamp. Alternativement, dans le cas d'une expérience de SCRT-PCR ne nécessitant pas d'études électrophysiologiques préalables, la cellule est aspirée intégralement dans 10 µl de solution interne (cf. §composition des solutions, Annexes). La solution contenant la cellule ou son cytoplasme est ensuite éjectée dans un tube 1,5 ml. Toutes ces manipulations se font avec des gants et des pipettes stérilisées afin d'éviter toute contamination ou dégradation de l'ARN.

La SCRT-PCR étant une technique très sensible aux contaminations, les contrôles doivent être rigoureux. Le meilleur contrôle consiste à prélever quelques µl de solution dans la boîte de culture, tout les quatre ou cinq prélèvements de cellules. Nous pouvons ainsi contrôler la présence de contamination ADN ou ARN dans ces lots.

La transcription inverse :

Prélever 8,8 µl de la solution contenant la cellule.

Le protocole de transcription interne est le même que celui décrit précédemment, à deux exceptions près : il n'y a pas de traitement DNase sur les cellules uniques et le volume de réaction de la solution transcription inverse est la même pour une cellule qu'elle l'est pour 1 µg d'ARN.

La PCR sur cellule unique.

Les conditions de PCR sont les mêmes que la PCR standard à quelques exceptions près :

- La taille de l'amplifias doit être comprise entre 150 et 250 pb. L'amplification n'aura pas lieu pour des tailles supérieures.
- Jusqu'à 4 µl d'ADN complémentaire peuvent être utilisés pour une seule réaction.
- Le nombre de cycles d'amplification est beaucoup plus élevé que dans une PCR standard. Ainsi, lorsque 25 cycles suffisent à détecter la β-actine, il en faut environ 35 dans une expérience de SCRT-PCR. Cependant, les

polymérase peuvent difficilement travailler au-delà de 40 cycles. Il est donc préférable de réaliser deux PCR consécutives, ou une première PCR suivie d'une Nested-PCR. Dans les deux cas, les contrôles utilisés dans la première PCR doivent aussi être conservés dans la seconde. La première PCR ne devrait pas dépasser 35 cycles. La matrice de la seconde PCR consiste en 1 µl du produit de la première PCR. La seconde PCR ne devrait pas dépasser 15 cycles.

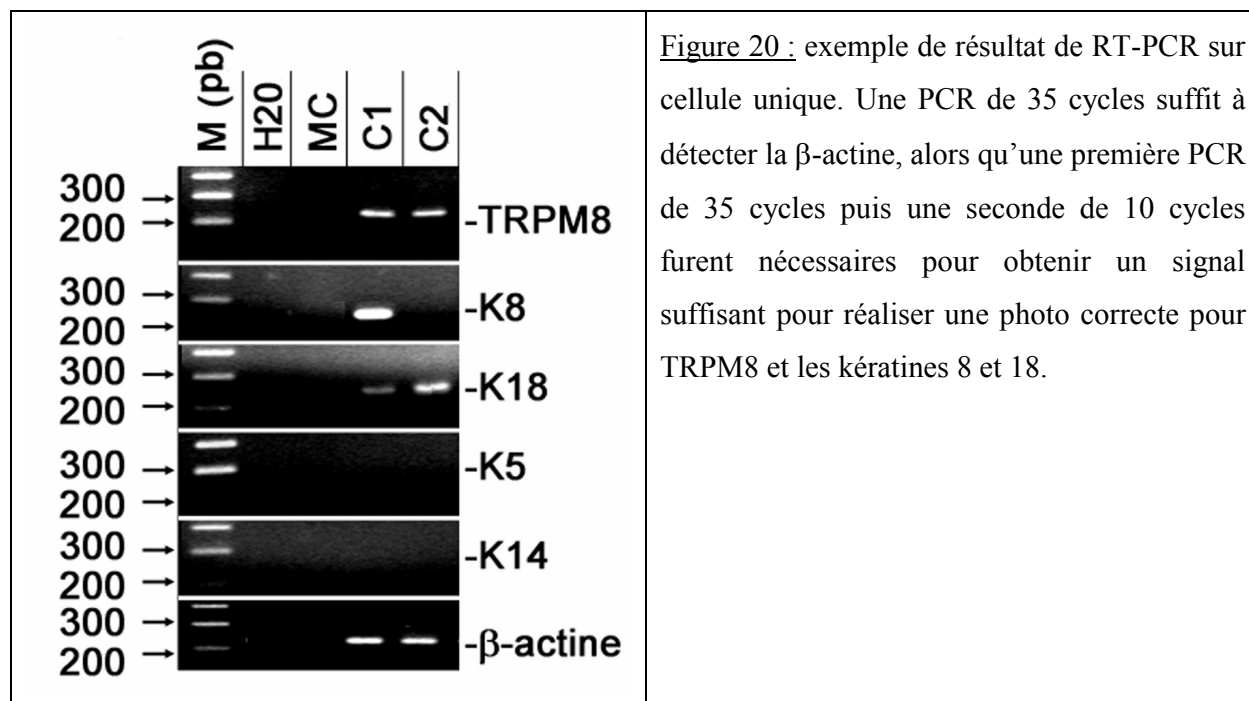


Figure 20 : exemple de résultat de RT-PCR sur cellule unique. Une PCR de 35 cycles suffit à détecter la β-actine, alors qu'une première PCR de 35 cycles puis une seconde de 10 cycles furent nécessaires pour obtenir un signal suffisant pour réaliser une photo correcte pour TRPM8 et les kératines 8 et 18.

III.C) Clonage

III.C.1) Clonage par PCR

III.C.1.a) Clonage de long fragment d'ADN (>2 kpb)

Cette technique nécessite l'utilisation d'une polymérase ajoutant des adénines sur les extrémités 3' des amplifias. Dans le cas contraire, une étape d'incubation en présence d'une polymérase ajoutant des adénines sur les extrémités 3' des amplifias est nécessaire.

Protocole :

- Après migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 1% avec tampon TAE (cf. Annexes), récupérer les fragments d'ADN à l'aide d'une lame de scalpel propre sous illumination avec la « dark reader » (table à lumière bleue).
- Extraire l'ADN des fragments de gel à l'aide du kit (Nucleospin extract 2, Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant. Éluer dans le volume minimal (15 µl).

- Etape supplémentaire en cas d'utilisation d'une polymérase n'ajoutant pas d'adénines sur les extrémités 3' des amplifias. Incuber l'ADN en présence de dATP (0,2 µM) et d'enzyme (ex : Taq Gold avec ses tampons) à 72°C pendant 10 min.
- Ligner l'ADN dans le plasmide pcR2.1 TOPO (Invitrogen) selon le protocole fourni.
- Transformer le plasmide dans les bactéries (cf. §III.E). *A noter : ce vecteur permet de cribler les colonies avec le test blanc/bleu et il porte la résistance à l'ampicilline*

III.C.1.b) Clonage de fragment d'ADN < 2 kpb

Cette technique nécessite aussi l'utilisation d'une polymérase ajoutant des adénines sur les extrémités 3' des amplifias.

Protocole :

- Après migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 0,8% avec tampon TAE (cf. Annexes) et le colorant « crystal violet », récupérer les fragments d'ADN à l'aide d'une lame de scalpel propre.
- Extraire l'ADN des fragments de gel à l'aide du kit fourni (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. Éluer dans le volume minimal (15 µl).
- Etape supplémentaire en cas d'utilisation d'une polymérase n'ajoutant pas d'adénines sur les extrémités 3' des amplifias : incuber l'ADN en présence de dATP (0,2 µM) et d'enzyme (ex : Taq Gold avec ses tampons) à 72°C pendant 10 min.
- Ligner l'ADN dans le plasmide pcR2.1 TOPO-XL (Invitrogen) selon le protocole fourni.
- Transformer le plasmide dans les bactéries (cf. §III.E). *A noter : ce vecteur ne permet pas de cribler les colonies avec le test blanc/bleu et il porte la résistance à la kanamycine*

III.C.2) Clonage par restriction

Cette technique consiste à digérer par des enzymes de restriction soit un produit de PCR soit un plasmide contenant le gène d'intérêt et à transférer ce fragment de restriction dans le vecteur final.

Digestion totale de l'ADN :

Dans un volume de réaction de 20 µl, mélanger 5 à 10 Unités d'enzymes de restriction, et le tampon 10X. Incuber le mélange précédemment décrit avec soit 5 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt à 37°C pendant 1 à 2 heures, soit la totalité d'une réaction de PCR réalisée à partir d'oligonucléotides incorporant dans leur séquence les sites de restriction nécessaires pendant la nuit à 37°C. A noter : *le clonage par restriction est dit « dirigé » quand deux enzymes de restriction différentes sont utilisées, et « aléatoire » lorsque seulement une enzyme coupe le fragment d'intérêt à chacune de ses extrémités. J'ai toujours réalisé des digestions dirigées afin de contrôler le sens d'insertion du gène d'intérêt dans le vecteur final.*

La déphosphorylation du vecteur receveur :

La déphosphorylation du vecteur receveur n'est pas obligatoire, mais elle améliore fortement le rendement du clonage en limitant la fermeture du vecteur receveur sur lui-même, ce qui génère des faux positifs.

Dans les 20 µl de la réaction de digestion du vecteur receveur, ajouter 5 µl de tampon 10X de la phosphatase, 1 µl de phosphatase/ µg de plasmide et compléter avec de l'eau ultra pure à 50 µl.

- Incuber 15 min à 37°C.
- Incuber 5 min à 95°C pour arrêter la réaction.
- Plonger dans la glace quelques instants puis centrifuger 30 sec >10 000*g.

Contrôle de la digestion et extraction de l'ADN :

- Déposer les différents ADN digérés sur un gel d'agarose 1% réalisé avec un tampon TAE et du Bromure d'éthidium (cf. Annexes) puis faire migrer.
- Après migration, récupérer les fragments d'ADN de tailles voulues à l'aide d'une lame de scalpel propre sous illumination avec la « dark reader » (table à lumière bleu).
- Extraire ensemble les fragments d'intérêt et le vecteur receveur à l'aide du kit (Nucleospin extract 2, Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant. Éluer dans le volume minimal (15 µl).
- Ligner 4 µl de l'éluat avec 5 µl de tampon 2X de la ligase et 1 µl (3 U) de T4 ligase pendant 5 à 10 min à température ambiante (Kit LigaFast™, Promega).
- Transformer le plasmide dans les bactéries compétentes (cf. §III.E).

III.D) Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a pour but de muter spécifiquement un acide aminé de manière à étudier le rôle de cet acide aminé sur une fonction de la protéine d'intérêt. Cette technique requiert d'introduire une ou plusieurs modifications dans la séquence génique. Le principe repose sur une PCR utilisant deux oligonucléotides complémentaires incorporant la mutation en leur centre. La polymérisation d'un nouveau plasmide à partir de ces oligonucléotides en se servant d'un plasmide matrice conduit à la génération d'un mélange de plasmides mutés et sauvages. Le point fort de cette technique vise à détruire spécifiquement le plasmide parental, qui est méthylé, par une enzyme de restriction clivant l'ADN sur un site méthylé. Ainsi seul le plasmide néosynthétisé reste après la digestion enzymatique et peut alors être transformé dans des bactéries compétentes.

Les protocoles standards utilisent la Pfu pour réaliser la PCR, mais après plusieurs essais j'ai opté pour la Phusion (Finnzymes) qui fait moins d'erreurs, polymérise 12 kpb sans problèmes, et travaille à la vitesse record de 15s/kpb. Cependant, une condition de réussite avec cette enzyme est d'utiliser des oligonucléotides ayant une grande stabilité. Ainsi, il semblerait que la température de fusion de chaque moitié des oligonucléotides (d'une extrémité à la zone de mutation) doive être d'environ 40°C.

Pour une réaction de PCR de 50 µl :

Phusion (2 U/µl): 0,5 µl (1 U)

Tampon « High Fidelity » 5X: 10 µl

DMSO : 1 µl (2%)

dNTP (2,5 mM chacun) : 4 µl (0,2 µM)

Oligonucléotides (sens/anti-sens, 10 mM) : 1 µl chacun (0,5 µM)

Plasmide matrice : 50-100 ng

H₂O : qsp 50 µl

Conditions de PCR :

98°C	98°C	45-55°C	72°C	98°C	65-68°C	72°C	4°C
30 sec	10 sec	20 sec	30 sec/ 1 kb	10 sec	20 sec	30 sec/ 1 kb	∞
5-8 cycles				20-25 cycles			

Toujours faire un contrôle sans primer et un contrôle sans plasmide, afin de contrôler la spécificité des amplifications.

Conserver 5 µl de côté pour contrôler la PCR sur un gel d'agarose.

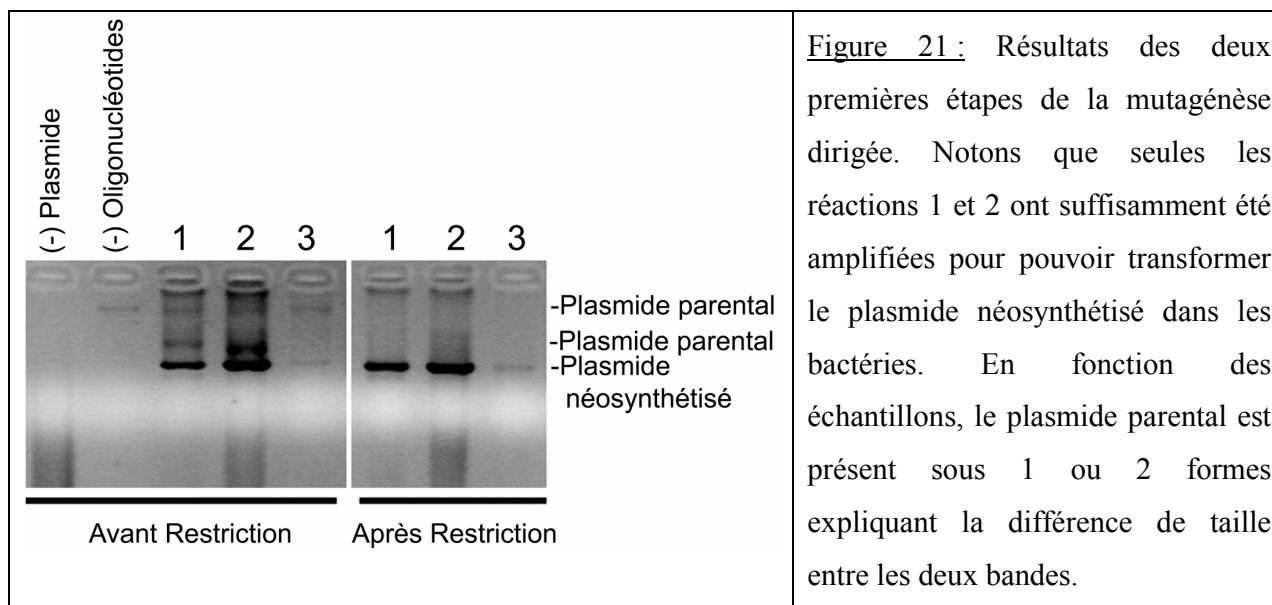
Digestion par restriction avec l'enzyme Dpn I :

Ajouter 3 U de Dpn I par 45 µl de produit de PCR et le tampon 10 X de l'enzyme.

Incuber 2 h min à 37°C.

Contrôle sur gel d'agarose :

Déposer 5 µl de produits de PCR avant et après digestion par Dpn I.



Après ce contrôle, les plasmides néosynthétisés sont purifiés sur colonne (Macherey-Nagel : nucleospin extract ; protocole « clean-up »), élués avec 20 µl d'eau ultra pure puis transformés dans les bactéries compétentes (cf. §III.E).

III.E) Bactéries chimio-compétentes, transformation et criblage des bactéries

La majorité du temps, j'ai travaillé avec la souche DH5a de *Escherichia Coli* et parfois avec la souche Top 10.

Préparation des bactéries chimio-compétentes.

- Réaliser une pré-culture de 2 ml de bactéries non transformées dans le milieu LB.
- Le lendemain, incuber 200 µL de la pré-culture dans 20 mL de milieu LB sous agitation à 37°C.
- Réaliser des mesures de densité optique (DO) à 600 nm jusqu'à obtenir une DO comprise entre 0,4 et 0,6.

- Culotter les bactéries (10 min à 1000*g, à 4°C) puis éliminer le surnageant.
- Reprendre le culot dans 40 ml de solution « 1 pour bactéries compétentes » (cf. Annexes).
- Incuber les bactéries 5 min dans la glace.
- Culotter les bactéries (10 min à 1000*g, à 4°C) puis éliminer le surnageant.
- Reprendre le culot bactérien par 4 ml de solution « 2 bactéries compétentes » (cf. Annexes).
- Incuber les bactéries 15 min dans la glace.
- Aliquoter par 20 à 50 µl dans des tubes de 500 µL et congeler directement à -80°C.

Penser à toujours réaliser un contrôle de transformation afin de vérifier l'efficacité de la procédure.

La transformation des bactéries par un plasmide.

Elle s'effectue par choc thermique sur des bactéries compétentes. Les bactéries compétentes sont sorties du congélateur -80°C et directement plongées dans la glace. Le plasmide à transformer est alors mis en contact avec les bactéries à raison d'un volume de plasmide pour 10 volumes de bactérie. L'ensemble est alors incubé 30 minutes dans la glace puis plongé 40 sec dans le bain-marie chauffé à 42°C. Les bactéries sont replongées dans la glace pendant quelques minutes avant d'être transférées dans 200 µl de milieu « S.O.C. medium » dans un tube de 15 ml. Placer les bactéries dans l'agitateur à 37°C pendant 1 heure. Finalement, étaler 100 µl de culture bactérienne sur la boîte d'agar comprenant l'antibiotique de sélection (couramment ampicilline ou kanamycine).

Criblage des colonies positives.

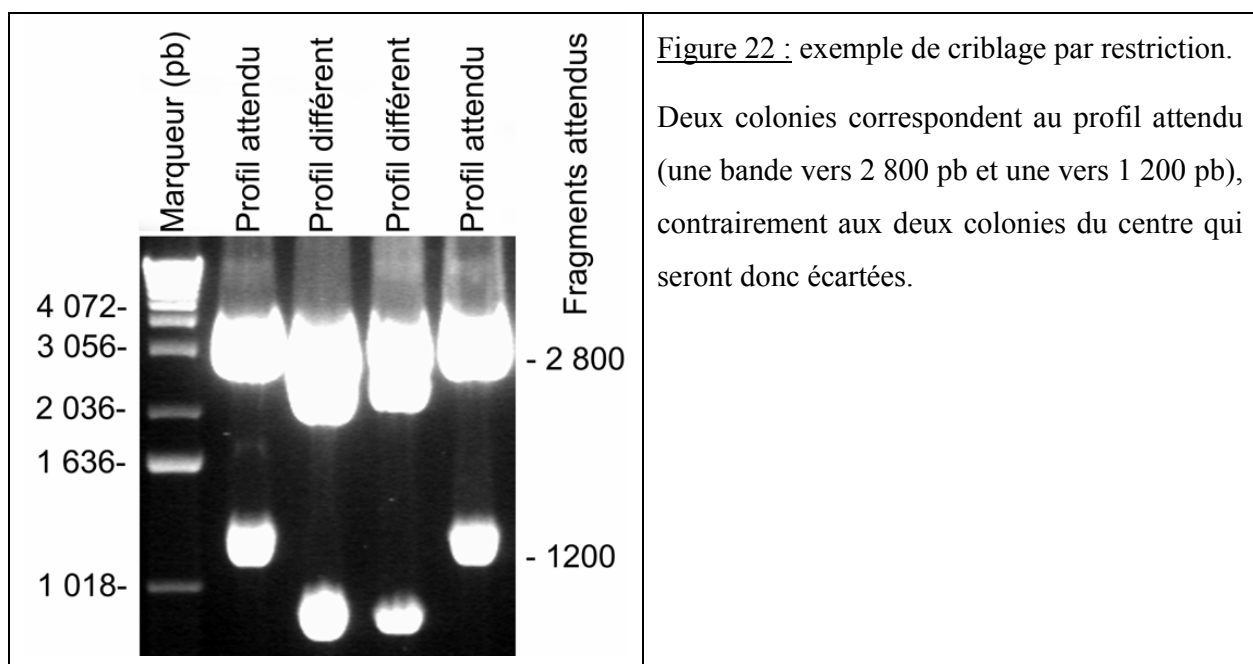
Le test blanc/bleu est utilisé pour tester les bactéries transformées avec un vecteur encodant la β -galactosidase. Cette enzyme est capable de dégrader la molécule 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) en un chromophore bleu ; l'ajout de l'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) dans le milieu permet de stimuler la synthèse de la β -galactosidase. Le point fort de la technique consiste à insérer le gène d'intérêt dans la séquence de la β -galactosidase. Ainsi, lorsque l'insertion du gène d'intérêt a lieu, la β -galactosidase n'est plus fonctionnelle et les bactéries restent blanches en présence d'IPTG et de X-Gal. Au contraire, si l'insertion n'a pas lieu la β -galactosidase dégrade le X-Gal et les colonies apparaissent bleues.

Criblage par empreinte de restriction.

Cette technique consiste à extraire le plasmide par une lyse alcaline puis à le digérer par des enzymes de restriction afin de comparer le profil de restriction obtenu avec celui attendu pour un plasmide d'intérêt.

Protocole de la lyse alcaline (la composition des tampons est reportée en annexe) :

- Les colonies à tester sont mises à croître pendant la nuit dans 5 ml de milieu TB avec l'antibiotique de sélection adéquate.
- Centrifuger 10 min à 1 500*g.
- Laver le culot bactérien avec 5 ml d'eau ultra pure.
- Centrifuger 10 min à 1 500*g.
- Reprendre le culot dans 200 µl de solution GTE, vortexer puis transférer dans un tube 1,5 ml.
- Ajouter 200 µl de solution SDS/NaOH, agiter doucement en inversant les tubes.
- Stopper la lyse alcaline en ajoutant 200 µl de solution KOAc 3M. Agiter doucement en inversant les tubes.
- Centrifuger 10 min à 15 000*g.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube 1,5 ml. Ajouter 600 µl d'isopropanol. Vortexer.
- Incuber 10 min sur glace, puis centrifuger 30 min > 12 000*g.
- Laver le culot à l'éthanol 70% (0,5 à 1 ml).
- Centrifuger 20 min > 12 000*g.
- Faire sécher le culot puis le reprendre dans 50 à 100 µl de tampon TE + RNase H (20 µg/ml).
- Incuber 10 min sur glace.
- L'ADN plasmidique est prêt à être dosé par spectrophotométrie, puis à être digéré par restriction.



Criblage par PCR.

Les colonies à tester sont mises à croître pendant la nuit dans 1 ml de milieu TB avec l'antibiotique de sélection adéquate. Le lendemain, 100 µl de bactéries sont centrifugés (ex : 10 sec à 10 000*g), le culot bactérien est lavé par 200 µl d'eau ultra pure puis recentrifugé. Le culot est resuspendu dans 200 µl d'eau ultra pure, puis la suspension bactérienne est chauffée 5 min à 95°C afin de lyser les bactéries. Une centrifugation (5 min à 5 000*g) permet ensuite de précipiter les gros débris. La PCR est alors réalisée sur 1 à 2 µl de surnageant.

Typiquement, cette PCR est réalisée avec la Pfu polymérase dans des conditions standards :

Pour 20 µl de réaction : Tampon 10X (avec MgSO₄) : 2 µl

dNTP (2,5 mM chacun) : 1,6 µl (0,2 µM)

Pfu (3 U/µl) : 0,22 µl (0,66 U)

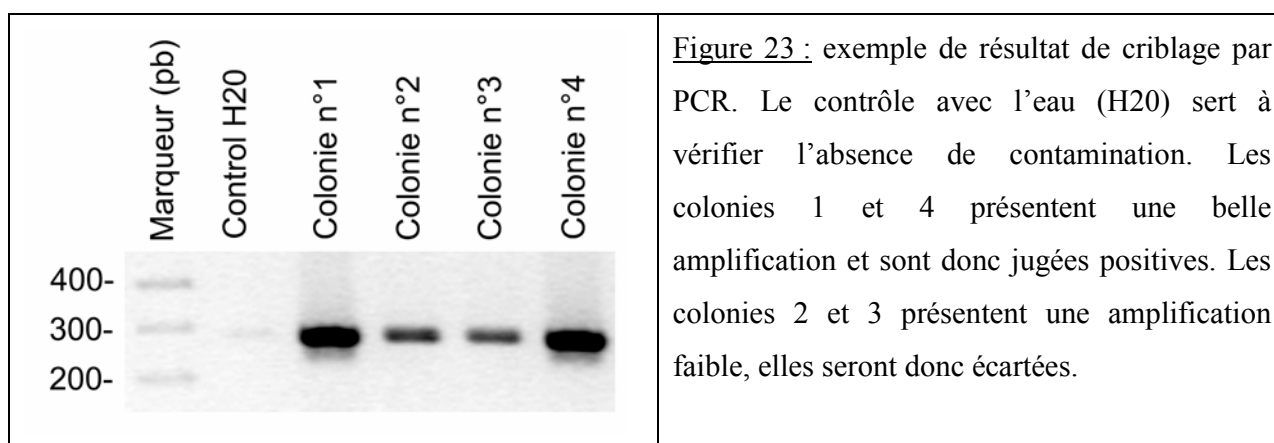
Oligonucléotides (sens/anti-sens, 10 mM) : 1 µl chacun (0,5 µM)

Matrice : 1-2 µl de lysat bactérien

Eau ultra pure : qsp 20µL

95°C	95°C	60°C	72°C	4°C
1 min	30 sec	30 sec	variable	∞
25-27 cycles				

Le résultat de la PCR est ensuite visualisé sur un gel d'agarose avec bromure d'éthidium, ex :



Conditionnement des bactéries.

Les colonies positives sont congelées à -80°C par aliquots de 500 µl en présence de 10% de DMSO.

III.F) Extraction de plasmide

L'extraction de plasmide fait suite à une amplification des bactéries réalisée dans un volume approprié d'un milieu de culture « TB » (Terrific Broth) car il permet une amplification plus importante des bactéries. Cependant, le milieu standard « LB » (Luria Bertoni) est quelques fois utilisé. La composition des deux milieux est décrite dans les Annexes.

L'extraction de plasmides en petits volumes, medians ou gros a été réalisée grâce aux kits d'extraction sur colonnes « nucleospin plasmide, nucleobond 100 et nucleobond 500 » vendus par la société Macherey-Nagel.

Le protocole réalisé est le protocole complet (3 lavages au total) de la notice avec une étape préliminaire de rinçage à l'eau du culot de bactéries afin d'éliminer la totalité des sels provenant du milieu de culture.

La qualité et la concentration du plasmide sont mesurées par spectrophotométrie. La propreté standard des plasmides est définie par un rapport de $DO^{260}/_{280}$ (ADN/Protéines) $> 1,7$ et un rapport de $DO^{260}/_{230}$ (ADN/sels et sovants) > 2 . Les plasmides ayant une des valeurs légèrement inférieures à la norme sont tout de même utilisés pour le clonage, mais à éviter pour la nucléofection. En effet, même dans le modèle HEK-293, le taux de transfection d'environ 90% pour un plasmide pur peut chuter à moins de 10% pour un plasmide trop riche en sels.

III.G) Séquençage

Le séquençage est réalisé par la société Genoscreen à Lille. Nous fournissons nos plasmides purifiés à raison de 5 μ l à 0,2 μ g/ μ l par réaction ainsi que 10 μ l d'oligonucléotides à 10 μ M. Genoscreen réalise le séquençage par la technique du «dye terminator» : ce sont les dideoxy NTP qui sont directement couplés à un fluorophore (une couleur par type de NTP). Après migration dans le capillaire du séquenceur, un laser détecte le fluorophore terminant le brin d'ADN synthétisé. Ainsi, au cours de la migration, le laser va détecter un fluorophore pour chaque taille de fragment allant de la taille oligonucléotide +1 à la taille maximale de la réaction qui varie est d'environ oligonucléotide +1 000. Les résultats nous sont fournis sous forme séquence et de chromatogramme, lequel nous permet de contrôler la séquence en cas de doutes.

IV) Immunodétection

IV.A) Extraction des protéines

IV.A.1) Extraction de protéines totales

Après un lavage au PBS, le tapis cellulaire est récupéré avec un racloir propre dans du PBS. Après centrifugation (800*g, 10 minutes), le culot cellulaire est repris dans un tampon RIPA (PO₄Na₂/K, Triton X-100, Déoxycholate de sodium, NP40 et NaCl) complété par un cocktail d'anti-protéases (Sigma, P 8340). L'homogénat est alors soniqué quelques secondes puis incubé sur glace pendant 1 heure. Le lysat est ensuite centrifugé à 1 000*g pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines sont dosées par la méthode BCA.

IV.A.2) Extraction de la fraction microsomale

L'obtention des cellules s'effectue de la manière précédemment décrite. Le culot cellulaire est repris dans un tampon composé d'HEPES, de KCl, d'EGTA et de DTT complété du cocktail d'anti-protéases, puis l'homogénat est broyé mécaniquement dans un broyeur Kontess. Après environ 50 mouvements, le lysat est tout d'abord centrifugé 10 minutes à 10 000*g, à 4°C pour éliminer les gros débris cellulaires, ultracentrifugé à 100 000*g pendant 1 heure, à 4°C. Finalement, le culot est ensuite repris dans le tampon RIPA et les protéines sont alors dosées.

IV.B) Western-blot

L'électrophorèse est réalisée dans un système Bio-Rad selon la technique SDS-PAGE. La densité du gel de polyacrylamide est déterminée selon la taille des protéines à séparer. A intensité fixée, la migration commence à 15 mA/minigel puis dès que le gel de séparation est atteint, la migration se poursuit à 30 mA/minigel. A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur un gel de nitrocellulose si elles sont petites et/ou hydrophiles, sur un gel de PolyVinylidene Fluoride (PVDF) si elles sont grosses et surtout hydrophobes. Le transfert s'effectue à 25 volts et 100 mA / minigel pendant 1 h 30.

Après transfert, la membrane est découpée en fonction du nombre d'anticorps utilisés pour l'immunodétection. Les morceaux de membranes sont saturés durant 30 minutes à température ambiante dans un mélange de TNT-lait 5% (15 mM de tampon Tris pH 8 ; 140 mM NaCl ; 0,05% Tween et 5% de lait en poudre écrémé). Les membranes sont ensuite mises en contact avec les anticorps primaires, à la dilution voulue dans du TNT-lait 2% (les anticorps utilisés au cours de cette thèse sont décrits dans les différents articles), soit pendant 1 à 2 heures à température ambiante soit durant la nuit à 4°C. Après 3 lavages au TNT, les membranes sont mises en présence de l'anticorps secondaire voulu au 1/20 000^{ème} (anti-IGg de lapin, de souris ou

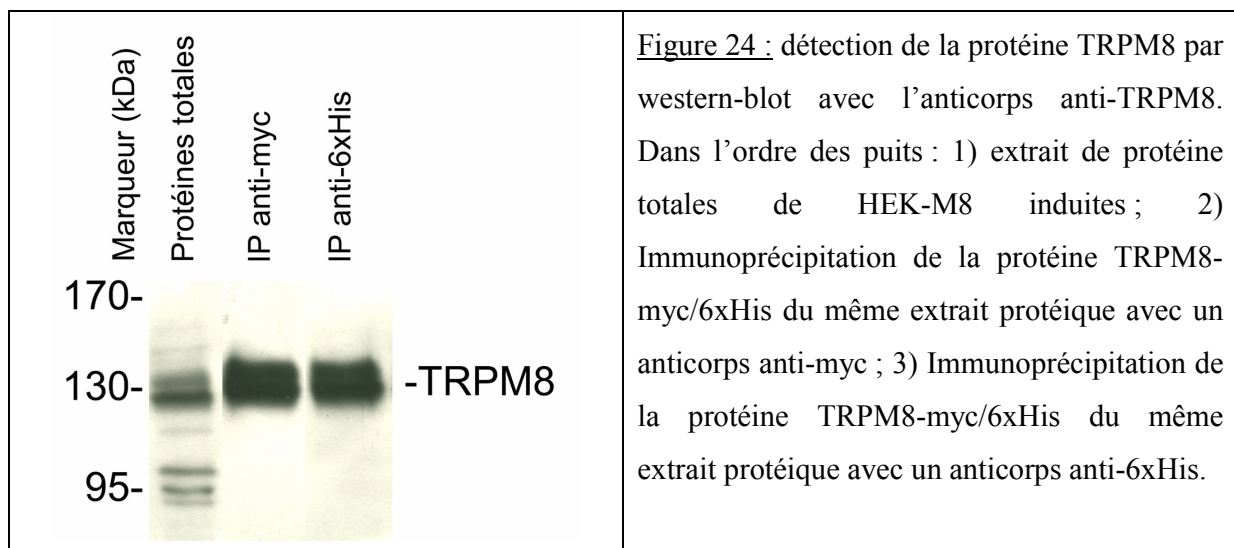
autre ; laboratoire Zymed Inc, San Francisco, CA) pendant 1 heure à 37°C. Après trois lavages au TNT, les protéines sont révélées par chimioluminescence grâce au kit « Supersignal West Pico Chemiluminescent » ou « Supersignal West Dura Chemiluminescent » (Pierce, Rockford Compagny, IL) en suivant les instructions du fournisseur. Les bandes sont finalement exposées sur des films Biomax Light (Kodak, Rochester, NY). L'intensité des signaux est mesurée par densitométrie, puis le rapport de l'intensité de la protéine d'intérêt divisée par l'intensité d'un rapporteur comme l'actine ou la calnexine permet de semi-quantifier l'expression de la protéine d'intérêt.

IV.C) Immunoprécipitation

L'Immunoprécipitation consiste à faire interagir un anticorps avec d'une part la protéine d'intérêt contenant l'épitope spécifiquement reconnu par cet anti-corps et d'autre part une protéine A fixant les IgG. Cette protéine AG est couplée à une bille d'agarose, ce qui permet de « précipiter » la protéine d'intérêt.

Le protocole utilisé est le suivant :

- Mélanger dans un tube de 1,5ml :
 - 500 µg d'extrait de protéines totales
 - 1 µg d'anticorps anti-« protéine d'intérêt »
 - 20 µl de protéine A/G plus
 - 850 µl de tampon NaH₂PO₄/NaCl
- Vortexer le tout et incuber la nuit à 4°C sur roue.
- Laver 3 fois avec du tampon RIPA 1X, en centrifugeant 2 min à 1 000*g.
- Centrifuger une dernière fois 1 min à 5 000*g
- Reprendre le culot par 30 µl de tampon de Laemmli et faire chauffer 5 min à 95°C.
- Déposer sur gel de polyacrylamide et révéler le western-blot.



IV.D) Immunofluorescence

L'immunofluorescence indirecte consiste à détecter une protéine spécifique au sein de la cellule par l'intermédiaire de deux anticorps dont le second est couplé à un fluorophore.

L'immunofluorescence nécessite tout d'abord de fixer les cellules. J'ai régulièrement utilisé deux techniques différentes : le PFA (ParaFormaldéhyde) et l'acétone. Le choix entre ces deux modes de fixation dépend des cellules à fixer mais aussi des anticorps utilisés. Ainsi les cellules primaires musculaires lisses de la prostate conservent plus facilement leur morphologie étirée avec le PFA, alors que la fixation des HEK 293 avec l'acétone présente une diminution conséquente du bruit de fond.

La fixation avec l'acétone consiste à plonger la lamelle dans de l'acétone (prérefroidie à -20°C) et à les laisser incuber 10 min à -20°C. La lamelle est ensuite lavée plusieurs fois avec du PBS 1X. L'avantage de l'acétone est qu'elle perméabilise les cellules en même temps qu'elle fixe les molécules.

La fixation au PFA est réalisée en incubant la lamelle 10 min sur la glace dans du PFA 4%. La lamelle est ensuite lavée 3 fois 10 min dans le PBS.

Le protocole de l'immunofluorescence est le suivant :

- Bloquer et perméabiliser avec un mélange PBS, gélatine de poisson 1,2%, Tween-20 0,05% et glycine 0,2M. L'ajout de sérum correspondant à l'animal dans lequel l'anticorps secondaire a été développé peut permettre de diminuer le bruit de fond.
- Incuber l'anticorps primaire à la concentration désirée dans un mélange de PBS/gélatine de poisson soit 1 à 2 heures à 37°C, soit sur la nuit à 4°C.
- Laver 3 fois 10 min avec du PBS/gélatine de poisson.
- Incuber l'anticorps secondaire (anti-IgG lapin ou anti-IgG souris) couplé à un fluorophore à la concentration d'utilisation (1/2000° pour l'alexa 488 et 1/4000° pour l'alex 546) pendant 1 h à température ambiante.
- Laver 2 fois durant 10 min avec du PBS/gélatine de poisson, puis une dernière fois avec du PBS. Ce dernier lavage peut aussi être réalisé en présence de l'intercalant DAPI au 1/200° pendant 15 min. Le DAPI marquera alors la chromatine permettant de repérer facilement le noyau des cellules.
- Monter les lamelles sur des lames avec du Mowiol. Laisser sécher.

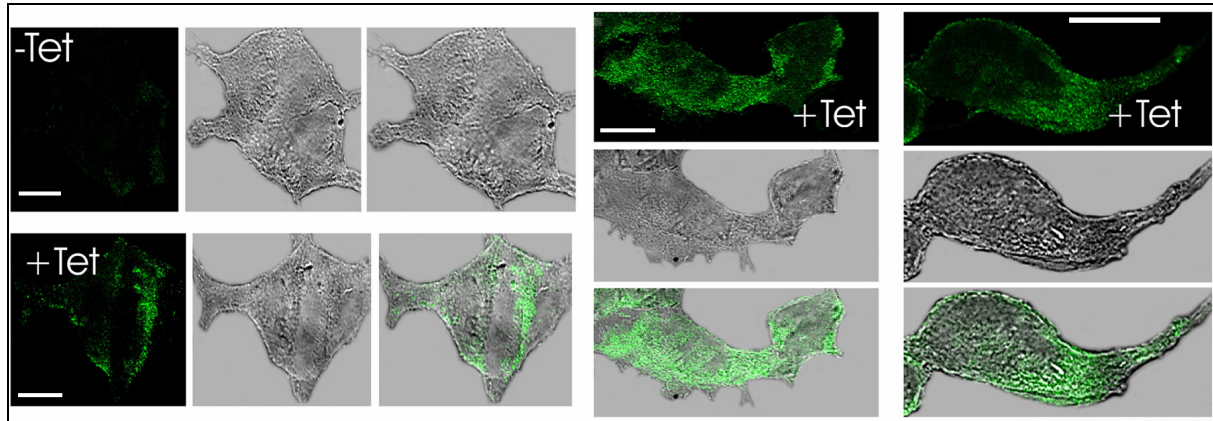


Figure 25 : images obtenues au microscope confocal montrant la détection de la protéine TRPM8 en vert (anticorps secondaire couplé à l'alexa 488) dans les cellules HEK-M8 induite par 1 µg/ml de tétracycline (+Tet). La barre blanche représente 10 µm.

IV.E) Immunohistochimie

Les immunohistochimies ont été réalisées sur des coupes de tissus soit paraffinées soit congelées dans du tissu-tek. Les coupes en tissu-tek sont directement découpées puis prêtes à l'emploi, alors que les coupes paraffinées nécessitent d'être déparaffinées dans un bain de xylène puis dans des bains successifs d'alcool.

L'immunohistochimie repose sur le même protocole que l'immunofluorescence précédemment décrite hormis le fait qu'il n'y ait aucune nécessité de perméabiliser les cellules.

IV.F) Purification de protéines recombinantes histidinylées

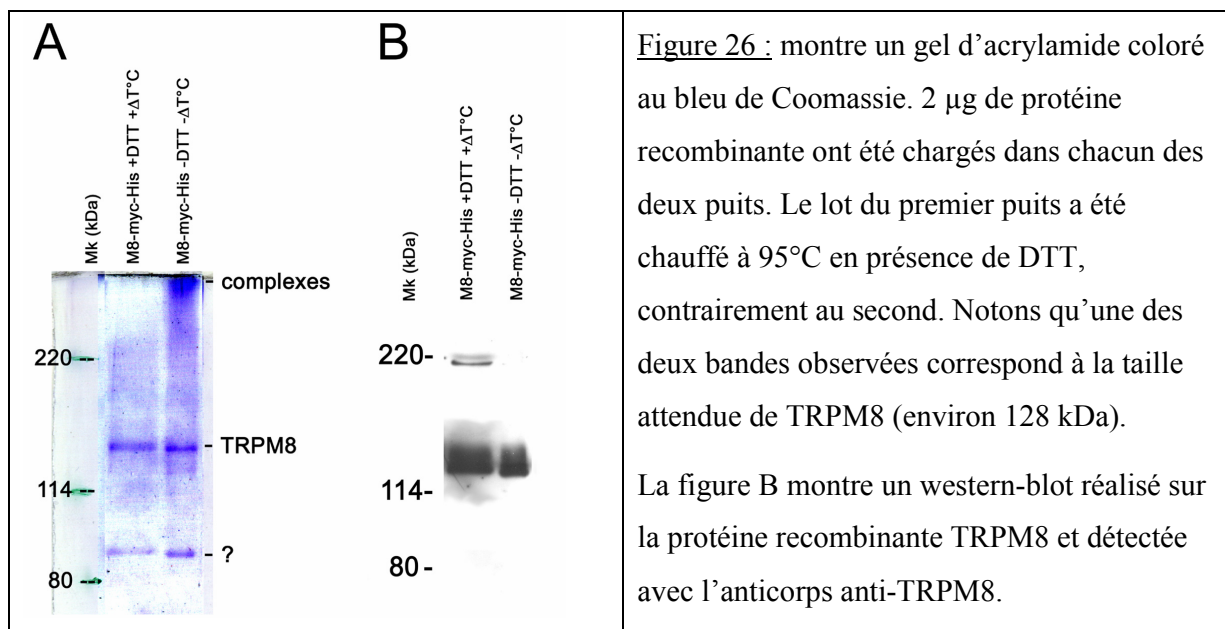
La fusion de l'extrémité carboxy-terminal de TRPM8 avec les épitopes Myc et 6xHis et l'obtention d'un clone HEK inducible ont permis de produire la protéine TRPM8 recombinante. J'ai utilisé le kit Ni-NTA (Invitrogen) pour réaliser cette extraction de protéine recombinante. Le principe consiste à fixer la protéine TRPM8 sur des billes d'agarose par l'interaction de l'épitope 6xHis avec les ions Nickels présents sur les billes. J'ai dû utiliser les conditions dénaturantes pour extraire suffisamment de protéine TRPM8, car les conditions dites « naturantes » ne convenaient pas à l'extraction d'une protéine membranaire comme un canal. Je ne décrirais que brièvement le protocole utilisé :

- Amplification de la lignée HEK-M8 dans 25-30 boîtes de culture de 75 cm², induire la synthèse de TRPM8 par l'ajout de 1 µg/ml de Tétracycline pendant 12 à 24 heures lorsque les cellules sont environ à 80% de confluence.
- Extraire les protéines par une solution à base de guanidine HCl (environ 1 à 1,5 ml par boîte de 75 cm²), rompre l'ADN en passant le lysat dans une seringue et soniquer

si le lysat reste trop visqueux. L'ajout de DNase et RNase peut faciliter l'extraction des protéines. L'ajout d'anti-protéases est nécessaire.

- Préparer les colonnes en suivant la notice.
- Charger 10 ml maximum de lysat par colonne et laisser le tout incuber sur une roue à température ambiante pendant 30 min ou bien durant 2 heures à 4°C.
- Faire différents lavages avec les tampons à l'urée 8M. Attention au pH, un pH trop acide éluera les protéines recombinantes.
- Eluer 4 fractions avec 6 ml du tampon à pH 4.0.
- Mesurer la densité optique des différentes fractions à 280 nm.
- Mixer les fractions ayant une densité optique suffisante.
- Diluer les fractions par deux pour diviser la concentration de l'urée à un maximum de 4 M. Concentrer les protéines au maximum sur des colonnes de filtration avec une porosité inférieure à 10 000 Da (attention : les colonnes ne supportent pas l'urée au dessus de 6 M).
- Doser les protéines par la méthode BCA.
- La propreté de la purification peut être testée en déposant 1 à 2 µg de protéines sur gel. Puis en colorant le gel au bleu de Coomassie ou à l'argent. La présence de la protéine recombinante est contrôlée par western-blot.

Exemple de contrôle de la purification de la protéine recombinante TRPM8 :



IV.G) Coloration au bleu de Coomassie

- Après l'électrophorèse, incuber le gel de polyacrylamide dans une solution de bleu de Coomassie pendant quelques minutes, sous agitation et à température ambiante.

- Rincer le gel dans une solution d'acide acétique 10%. Laisser agir jusqu'à l'obtention d'une décoloration convenable du gel (quelques heures ou durant la nuit).
- Laver plusieurs fois à l'eau déionisée pour rincer l'acide acétique.
- Sécher le gel entre deux feuilles de cellophane humidifiées par un mélange de glycérol (2%) et de méthanol (20%). Placer le tout dans un cadre de séchage et laisser sécher 1 à 2 jours.

V) Microscopie

V.A) Microscope inversé en lumière transmise

Les images des cellules primaires réalisées en lumière transmise ont été acquises sur un microscope inversé (Nikon TS100) doté d'objectif de 10*, 20* et 40* et couplé à un appareil photographique numérique.

V.B) Microscopie confocale

Les images des cellules vivantes ou fixées observées en fluorescence ont été réalisées sur un microscope confocal (Zeiss). Les fluorochromes verts (excitation à 488 nm) sont excités par un laser Argon dont la lumière est transmise à l'échantillon *via* une fibre optique et un miroir dichroïque. Les fluorochromes rouge (excitation 546 nm) sont excités par un laser Hélium-Néon.

Le système de mesure est un microscope confocal de type Zeiss LSM 510. Celui-ci est composé d'un microscope inversé doté d'objectifs à immersion 40x (ouverture numérique : 1,3 ; résolution max à 488 : 229 nm) et 60x (ouverture numérique : 1,4 ; résolution max à 488 : 212 nm) associés à une unité contrôlant les lasers (unité confocale Zeiss). La fluorescence émise est ensuite reçue au niveau de photomultiplicateurs. Ces signaux sont alors traités grâce à un ordinateur doté d'un logiciel spécifique (AIM 3.2).

VI) Imagerie calcique

VI.A) Le fura-2/AM

Le fura-2 est une sonde calcique dérivée du fluorophore stilbène possédant quatre fonctions carboxyles dont l'arrangement spatial octacoordonné est caractéristique des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA (Grynkiewicz et al., 1985). La fonction acétoxy méthylester confère au fura-2 la capacité de traverser la membrane plasmique. Le clivage de cette fonction par les estérases stabilise la sonde sous sa forme acide dans le cytosol des cellules.

Le fura-2 acide dont la fluorescence est dépendante de la concentration en calcium libre possède un K_D est de 225 nM. La particularité du fura-2 vient du fait qu'il possède une longueur d'onde d'émission et deux longueurs d'onde d'excitation. En fait le spectre d'excitation de la sonde comporte deux pics d'excitation (un à 340 nm et un second à 380 nm) dont les amplitudes maximales varient en fonction de l'interaction de la sonde avec le calcium libre. Quand la sonde fixe le Ca^{2+} , l'amplitude du pic à 340 nm augmente et celle à 380 nm diminue, le ratio 340/380 augmente alors et permet en fonction de sa valeur d'estimer la concentration de calcium libre cytosolique.

VI.B) Le fluo-4/AM

Il s'agit d'une sonde calcique aux caractéristiques proches des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA.

Cette sonde ne possède qu'une longueur d'onde d'excitation ($\lambda=480\text{nm}$) et n'émet de la fluorescence que quand elle est liée au calcium ($\lambda=520\text{nm}$). Le fluo-4 permet de mesurer les variations du taux de calcium sans pouvoir estimer la concentration de calcium. Cette sonde, utilisée en microscopie confocale, permet ainsi de mesurer les variations de concentration en calcium dans le cytoplasme. Les variations qualitatives du contenu en calcium du cytoplasme sont exprimées sous la forme du ratio de la fluorescence F divisé par la fluorescence F_0 (fluorescence initiale) au cours du temps.

VI.C) Equipement optique

L'équipement est composé d'un microscope à épifluorescence (Olympus IX 70), d'une lampe au xénon, d'un monochromateur Till Photonics, d'une caméra digitale CCD 12 bits (MicroMax 5 MHz, Princeton) et d'un ordinateur dont le logiciel (Métafluor 5.0, Universal Imaging) permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des images.

VI.D) Charge des cellules en sonde calcique

La charge est réalisée dans le milieu de culture à raison de 2,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de sonde pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont alors incubées durant 10 min supplémentaires à 37°C avec du milieu de culture sans sonde afin de rincer le surplus. Les cellules sont finalement rincées deux fois avec du milieu HBSS standard (Hank's Balanced Salt Solution, cf. Annexes).

VII) Rappels relatifs à la technique de Patch-clamp

Cette partie sur la technique de Patch-clamp se veut édulcorée et n'a pour but que d'aider les non spécialistes à appréhender les résultats d'électrophysiologie présentés dans les articles scientifiques.

La technique de Patch-clamp a pour but de mesurer les flux ioniques traversant les protéines-canal. La membrane lipidique étant imperméable aux ions, elle agit comme un condensateur en regroupant les charges négatives du côté intracellulaire et les charges positives du côté extracellulaire. La différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur définit le potentiel de membrane. Au repos (en absence de stimulation des cellules), le potentiel de membrane des cellules eucaryotes est généralement négatif. Le mouvement des ions à travers les canaux et les transporteurs modifie la répartition des charges de chaque côté de la membrane. Ces flux ioniques modifient ainsi le potentiel de membrane.

La technique de Patch-clamp en configuration cellule entière permet de mettre en contact le milieu interne de la cellule avec l'électrode contenue dans la pipette de patch (figure 27). La différence de potentiel mesurée entre l'intérieur de la cellule et l'extérieur permet de mesurer le potentiel de membrane. L'évolution du potentiel de membrane reflète le déplacement des ions de part et d'autre de la membrane.

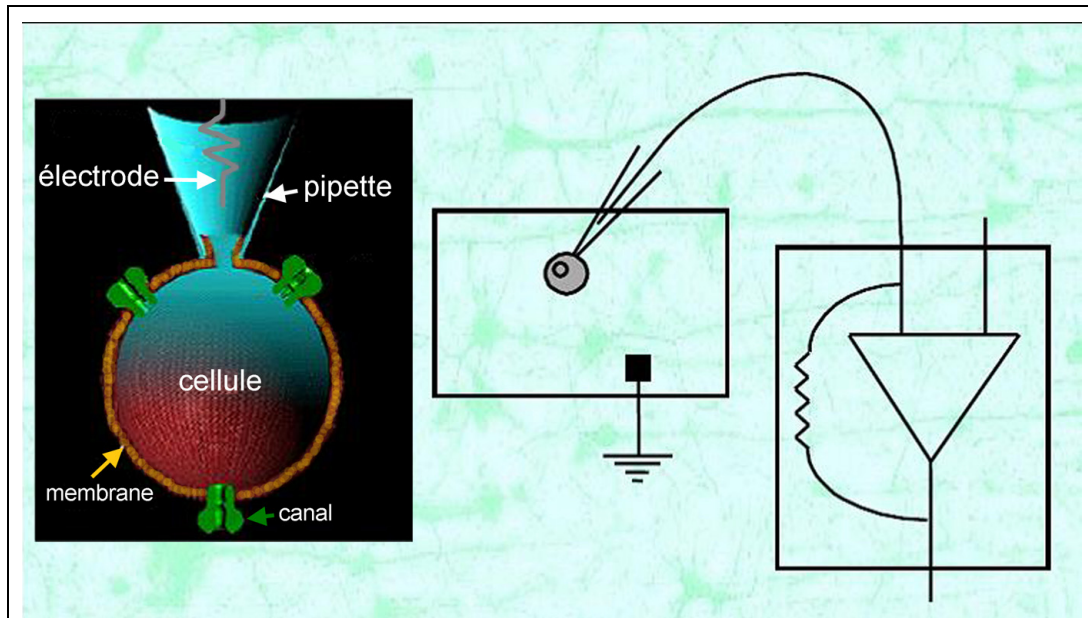
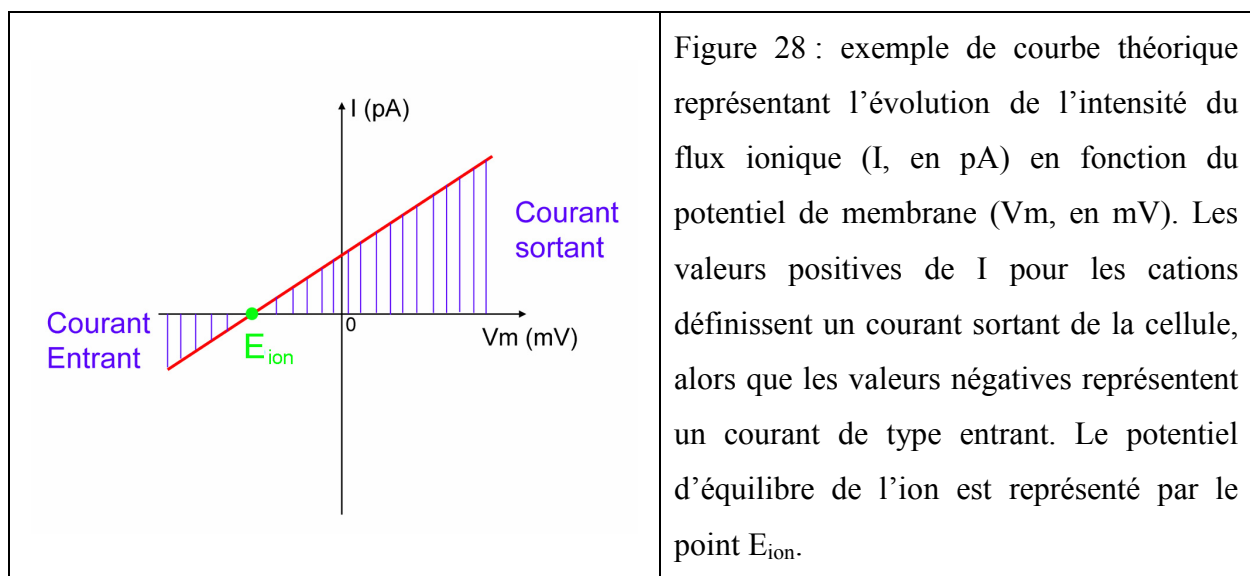


Figure 27 : schéma représentant la configuration « cellule entière » de la technique de patch-clamp (gauche). Le schéma électrique du système est représenté par le schéma de droite.

Le mouvement des ions à travers les membranes est défini par leur gradient électrochimique, c'est-à-dire le gradient de leur concentration et la répartition des charges

électriques par rapport à l'ensemble des charges de tous les ions. Un ion peut, en fonction, des conditions expérimentales, entrer ou sortir de la cellule.

Le sens de son mouvement est dicté par la différence entre le potentiel de membrane et le potentiel d'équilibre de l'ion considéré, c'est-à-dire le potentiel pour lequel le mouvement de l'ion est nul. Par exemple sur le schéma de la figure 28, représentant une courbe I/V théorique (Intensité du flux ionique en fonction du potentiel de membrane) d'un courant potassique : quand le potentiel de membrane (V_m) est inférieur au potentiel d'équilibre de l'ion potassique (E_{ion}), le flux ionique est entrant. A l'inverse, dès que V_m est supérieur à E_{ion} , le courant sort de la cellule. Nous pouvons en outre voir que plus le potentiel de membrane est positif, plus le courant global potassique est intense.



De manière générale, dans les conditions physiologiques, l'ion potassique sort de la cellule en diminuant la valeur du potentiel de membrane, c'est-à-dire en hyperpolarisant la membrane. Les ions sodiques et calciques entrent dans la cellule en dépolarisant la membrane (rend plus positif la valeur du potentiel de membrane). Le mouvement d'un ion influençant le potentiel de membrane, il modifie le gradient électrique des autres ions. Par exemple, l'entrée de calcium dépolarise la membrane et augmente ainsi le gradient électrochimique du potassium, favorisant ainsi la sortie de potassium dès que le canal potassique s'ouvre.

L'enregistrement des flux ioniques en configuration cellule entière par la technique de voltage-clamp (l'expérimentateur impose la valeur du potentiel de membrane à la cellule) permet de visualiser les mouvements ioniques globaux ayant lieu en même temps sur toute la membrane cellulaire. Ces enregistrements sont souvent présentés sous forme de courbe I/V. La figure 29 montre la courbe I/V typique du canal TRPM8 dans les cellules HEK 293 surexprimant ce canal

lors de réalisation d'une rampe de voltage de +100 mV à -100 mV, en présence ou non de menthol.

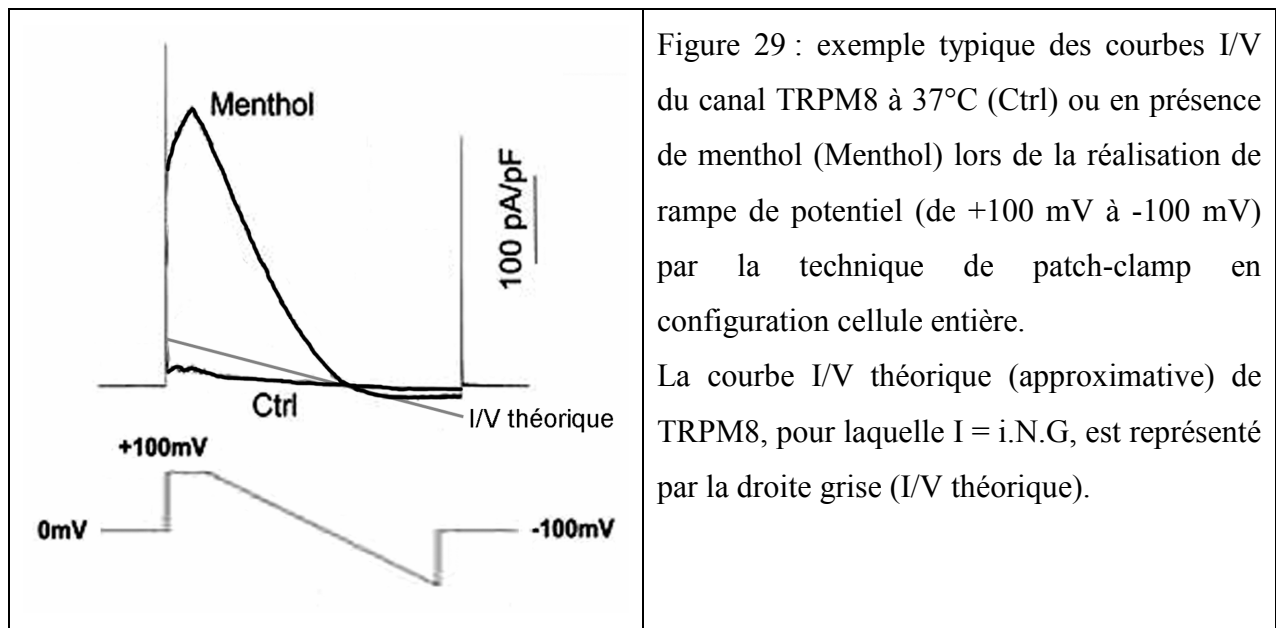


Figure 29 : exemple typique des courbes I/V du canal TRPM8 à 37°C (Ctrl) ou en présence de menthol (Menthol) lors de la réalisation de rampe de potentiel (de +100 mV à -100 mV) par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.

La courbe I/V théorique (approximative) de TRPM8, pour laquelle $I = i.N.G$, est représenté par la droite grise (I/V théorique).

Sur ces tracés, nous pouvons observer que la courbe I/V de TRPM8 lors de l'application de menthol ne correspond pas à la droite théorique. Cette courbe I/V de TRPM8 est caractérisée par sa rectification sortante. C'est-à-dire que plus V_m croît plus l'intensité du courant croît exponentiellement et non pas proportionnellement. Ce phénomène s'explique par le fait que le courant global ou macroscopique (I) est défini par le courant ionique unitaire (i), le nombre de canaux (N) et la probabilité d'ouverture des canaux (P_0).

$$I = i.N.P_0$$

La probabilité d'ouverture correspond au temps qu'un canal unitaire passe dans l'état ouvert par rapport à la somme des temps aux états ouvert et fermé. La valeur de cette P_0 est fonction du potentiel de membrane (Figure 30).

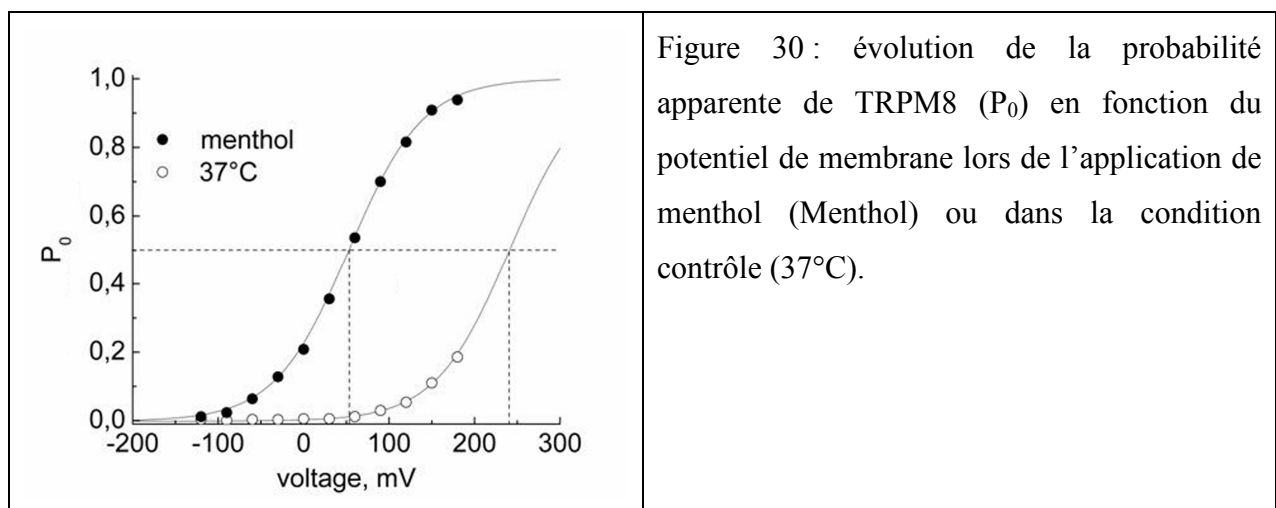


Figure 30 : évolution de la probabilité apparente de TRPM8 (P_0) en fonction du potentiel de membrane lors de l'application de menthol (Menthol) ou dans la condition contrôle (37°C).

Ainsi quand N et i sont constants, P_0 influence fortement la valeur de I . La P_0 de TRPM8 croît exponentiellement avec l'augmentation de V_m , c'est pourquoi la courbe I/V de TRPM8 présente une rectification sortante.

Toutes ces notions n'ont pour vocation que de faciliter la compréhension du travail d'électrophysiologie présenté dans cette thèse. N'ayant pas utilisé moi-même la technique de Patch-clamp, je ne décrirai pas ici les différents protocoles et méthodes expérimentales utilisées.

VIII) Mesure de viabilité cellulaire et apoptose

VIII.A) Test de viabilité

Le kit de mesure de viabilité utilisé (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) est une méthode colorimétrique qui détermine le nombre de cellules viables en mesurant une activité enzymatique mitochondriale. Lorsque l'apoptose est stable entre deux conditions, ce kit permet d'estimer la prolifération des cellules.

Le kit est composé du MTS (sel de tétrazolium) et du PMS (phénazine méthosulfate). Le MTS est réduit par les cellules en formazan, soluble dans le milieu de culture. La conversion du MTS en formazan est réalisée par des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produite, mesurée par son absorbance à 490 nm, est directement proportionnelle au nombre de cellules viables en culture. L'analyse statistique des résultats de prolifération est effectuée avec le test de Dunnett grâce au logiciel GraphPad InStat™ (GraphPad Software, V2.04), en considérant $p < 0,01$ comme significatif.

VIII.B) Comptage Hoechst

- Les cellules sont préalablement cultivées sur des lamelles de verre.
- Le milieu de culture est retiré et les cellules sont incubées durant 15 min dans le méthanol à -20°C .
- Après la fixation au méthanol, les cellules sont incubées dans la solution de Hoechst (1/250 dans le PBS ; solution mère 1 mg/ml dans le méthanol) durant 20 min à l'obscurité.
- Rincer par deux lavages au PBS.
- Monter la lamelle sur une lame
- Laisser sécher et conserver à 4°C .

- Le comptage nécessite entre 500 et 1000 cellules et doit être reproduit au minimum trois fois. Toutes les figures d'apoptose nucléaire sont prises en compte (fragmentation seule, condensation seule, fragmentation et condensation).

En cas d'apoptose provoquant ou provoquée par le décollement des cellules (Anoïkis), les cellules flottantes sont récupérées avant d'être mélangées avec les cellules adhérentes préalablement décollées par la trypsine. Les cellules sont projetées sur des lames par cytopspin. La suite du protocole précédemment décrit est alors appliqué.

Résultats

Afin d'améliorer la compréhension et la cohésion du manuscrit, les résultats obtenus ces trois dernières années seront présentés en une association d'articles scientifiques (publiés, soumis à la publications ou en préparation) et de sections décrivant les travaux préliminaires ou inachevés.

Cette partie est scindée en trois chapitres. Nous commencerons par traiter de la régulation de l'expression de TRPM8 dans la prostate ainsi que sa fonctionnalité. Nous poursuivrons avec l'étude de différentes isoformes de TRPM8. Enfin, nous finirons avec la description d'une voie d'activation du canal TRPM8 ainsi qu'une présentation d'une étude pharmacologique portant sur la caractérisation de nouvelles molécules de synthèse activant TRPM8.

Chapitre I

I) Régulation de l'expression de TRPM8 et fonctionnalité dans les cellules de la prostate.

L'échappement thérapeutique vis-à-vis des androgènes, au cours du développement du cancer de la prostate, entraîne de nombreuses dérégulations géniques susceptibles d'augmenter la résistance et l'agressivité du cancer. Il a été démontré que les expressions respectives des canaux TRPV6 et TRPM8 sont dérégulées dans le cancer de la prostate et sont contrôlés par les androgènes (Fixemer et al., 2003; Henshall et al., 2003). D'autre part, Tsavaler *et coll* suggéraient que TRPM8 était exprimé par les cellules épithéliales basales (Tsavaler et al., 2001). Néanmoins, plusieurs articles avaient reporté l'expression de l'ARN de TRPM8 dans la lignée LNCaP caractérisée par un phénotype épithélial apical (Henshall et al., 2003; Kiessling et al., 2003).

Le travail de ce chapitre a donc pour objectif de caractériser l'expression et la fonctionnalité du canal TRPM8 dans les cellules de la prostate humaine et de déterminer le phénotype de ces cellules.

I.A) Article 1

“Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement.”

Gabriel Bidaux, Morad Roudbaraki, Carole Merle, Philippe Delcourt, Christian Slomianny, Stephanie Thebault, Jean-Louis Bonnal, Mohammed Benahmed, Florence Cabon, Brigitte Mauroy and Natalia Prevarskaya.

Endocrine Related Cancer. 2005 Jun; 12(2):367-82.

*Dans ce travail nous mettons en évidence la régulation du gène *trpm8* par le récepteur des androgènes (RA) et son ligand la 5 α -DHT dans les lignées cellulaires prostatiques LNCaP, PNT1A et dans les cultures primaires de cellules épithéliales de prostate humaine. Nous démontrons de surcroît que la protéine TRPM8 est exprimée dans les cellules épithéliales apicales et principalement sur leur membrane luminale.*

Régulation dose- et temps-dépendante de *trpm8* par la 5 α -DHT.

Il a ainsi été démontré par RT-PCR semi-quantitative que l'expression du gène *trpm8* est régulée positivement et de façon dose- et temps-dépendante par la 5 α -DHT dans les cellules LNCaP (figures 1 et 2). En outre, cet effet requiert l'activation du RA. En effet, le traitement par un antagoniste de l'AR utilisé en clinique, le bicalutamide, réduit de moitié l'expression de l'ARNm de TRPM8 (figures 3).

L'expression de l'AR est suffisante pour entraîner l'expression du gène *trpm8*.

Dans la lignée PNT1A (n'exprimant ni l'AR ni TRPM8), la transfection de l'AR induit l'expression du gène *trpm8*. Cet effet est spécifique car le récepteur mutant L707R, insensible à la 5 α -DHT, n'induit pas l'expression du gène *trpm8* (figure 4). En outre, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre l'AR permet de bloquer la synthèse du récepteur et empêche l'expression du gène *trpm8* (figure 4). Nous avons ensuite démontré que le blocage de la traduction avant l'ajout de 5 α -DHT n'inhibe pas la transcription de l'ARN TRPM8 et comme plusieurs éléments de réponse au AR (ARE) ont été détectés sur la séquence promotrice du gène, nous avons émis l'hypothèse que le gène *trpm8* puisse être un gène directement régulé par l'AR (figure 5).

Les cellules épithéliales apicales androgéno-dépendantes expriment TRPM8.

L'utilisation de la SCRT-PCR, nous a permis de déterminer une codétection de l'ARN de TRPM8 avec ceux des kératines 8 et 18, utilisés comme marqueurs du phénotype épithélial apical. La dédifférenciation observée dans les cultures primaires est corrélée à la perte de l'AR et de TRPM8 (figure 6). Comme pour les cellules PNT1A, l'expression hétérologue de l'AR induit la transcription de l'ARN TRPM8 (figure 6).

Finalement, l'immunohistochimie nous a permis de démontrer l'expression de la protéine TRPM8 dans la zone luminale des cellules épithéliales apicales, ainsi que faiblement dans les cellules musculaires lisses (figure 7).

En conclusion, ces résultats démontrent la régulation du gène *trpm8* par l'AR de manière ligand-dépendante. Ils caractérisent aussi le phénotype épithélial apical comme étant le principal type de cellule exprimant TRPM8.

I.B) Article 2

“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.”

Thebault S[†], L. Lemonnier[†], G. Bidaux[†], M. Roudbaraki, F. Vancoppenolle, Y. Panchin, Y. Shuba, R. Skryma, and N. Prevarskaya.

J. Biol. Chem., Vol. 280, Issue 47, 39423-39435, November 25, 2005

[†]: Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

Dans cette étude, nous avons caractérisé la fonctionnalité du canal TRPM8 dans la lignée androgéno-dépendante de cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP. Cet article démontre le fonctionnement du canal TRPM8 en tant que canal de vidange du calcium réticulaire et l'activation subséquente des canaux de type SOC.

L'application de menthol entraîne l'activation d'un courant de type SOC dans les cellules LNCaP.

Dans les cellules LNCaP, le froid ($T < 25^{\circ}\text{C}$) et un agent mimant le froid, le menthol, n'activent pas le courant TRPM8 classique observé dans les neurones sensoriels et dans les cellules HEK-M8, mais un courant à rectification entrante très sélectif au calcium (figure 2 et 3). La caractérisation biophysique du courant activé par le menthol confirme d'ailleurs qu'il s'agit d'un courant de type SOC (figure 3). En outre, nous n'avons pas pu détecter de colocalisation entre la protéine TRPM8 et un marqueur de surface membranaire, suggérant que la protéine TRPM8 n'est pas ou très peu présente sur le plasmalemme de ces cellules (figure 2). La surexpression hétérologue d'une protéine de fusion TRPM8-GFP n'a permis de détecter ni de signal sur la membrane plasmique ni de courant TRPM8 classique dans les cellules LNCaP, contrairement aux cellules HEK 293. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme bloque l'export de TRPM8 à la membrane plasmique.

Le canal TRPM8 fonctionne sur la membrane du réticulum endoplasmique des cellules LNCaP.

Le menthol et le froid induisent également une augmentation du taux de calcium cytoplasmique en l'absence de calcium extracellulaire. L'addition de calcium dans le milieu extracellulaire entraîne une entrée capacitive de calcium. Ces résultats signifient que le froid et le menthol activent la vidange du Ca^{2+} réticulaire (figure 4). Cette propriété est également observée dans la lignée HEK-293 surexprimant TRPM8. Nous avons alors validé l'implication de TRPM8 dans la genèse des courants calciques et dans la vidange réticulaire précédemment décrite en utilisant des oligonucléotides antisens anti-TRPM8 et des ARN interférents dirigés contre TRPM8 à la fois dans les cellules LNCaP et HEK transfectées avec le gène *trpm8* (figure 4).

Les stocks calciques réticulaires vidangés par le menthol sont différents de ceux vidangés par les récepteurs IP3 et de ceux vidangés par la Thapsigargine (TG).

Les différents résultats présentés dans les figures 5 à 7 démontrent que la vidange réticulaire activée par l'application de menthol, d'icilin ou de froid ne mobilise pas les mêmes stocks de calcium que l'application de TG ou l'activation des récepteurs IP3 (IP3R). D'autres résultats précédemment acquis au laboratoire avaient déjà permis de démontrer que les stocks calciques IP3 et TG sont différents (Vanden Abeele et al., 2003). Tenant compte de ces résultats, nous proposons que la vidange calcique sensible au froid pourrait avoir une fonction différente de celle requérant l'activation des IP3R.

L'amplitude de la vidange du Ca^{2+} réticulaire activée par le menthol est dépendante de la concentration de 5 α -DHT.

La figure 8 montre, qu'en fonction de la présence de DHT, il existe une corrélation entre l'expression de l'ARN TRPM8 et le courant SOC activé par le menthol tout comme la vidange réticulaire et l'ECC subséquente. Au vu de ces résultats et des précédents, nous proposons que l'activité du récepteur des androgènes, par sa capacité à réguler l'expression du gène *trpm8*, contrôle la voie de signalisation calcique dépendante au menthol et au froid.

En conclusion, nos résultats montrent que le canal TRPM8 agit comme transporteur de calcium à travers le RE et qu'il peut ainsi participer à de nombreux processus dépendants des stocks calciques tels que la prolifération cellulaire et l'apoptose dans les cellules prostatiques.

I.C) Article 3

“Differentiation status of prostate cells determines TRPM8 channel subcellular localization and function: involvement in carcinogenesis.”

Gabriel Bidaux[†], Matthieu Flourakis[†], Stéphanie Thebault, Alexander Zholos, Benjamin Beck, Morad Roudbaraki, Jean-Louis Bonnal, Brigitte Mauroy, Yaroslav Shuba, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya..

(Article soumis dans *Journal of clinical investigation*)

[†]: Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

La suite logique de nos deux premiers articles fut de caractériser le fonctionnement du canal TRPM8 dans les cellules primaires humaines dans le but de déterminer si le fonctionnement de TRPM8 dans les cellules LNCaP constitue un bon modèle ou un cas isolé.

La protéine TRPM8 est exprimé dans le plasmalemme des cellules épithéliales apicales et est fonctionnelle.

La figure 1 présente la détection, par western-blot, immunofluorescence et immunohistochimie de la protéine TRPM8 dans des lots provenant soit d’HBP, soit de cancers. Notons que la protéine TRPM8 est détectée sur la membrane des cellules épithéliales apicales mises en cultures. Les études électrophysiologiques ont permis de démontrer la présence du grand courant rectifiant sortant activé par l’application de menthol (figure 2). Ce courant est significativement plus important dans les cellules cancéreuses que dans les cellules d’HBP.

TRPM8 apparaît sur le plasmalemme au cours de la différenciation épithéliale, bien que sa fonction réticulaire semble en partie constitutive.

La culture des cellules épithéliales apicales à court terme (PrPE-6d) permet de détecter TRPM8 sur la membrane plasmique, contrairement aux cellules en dédifférenciation (PrPE-20d). Malgré un changement de structure du marquage, la protéine TRPM8 reste exprimée dans les PrPE-20d (figure 3). Les résultats fonctionnels corrélerent avec les résultats d’expression : le courant TRPM8 n’est enregistré que dans les PrPE-6d, alors que la vidange activée par le menthol est détectée dans les PrPE-6d et dans les PrPE-20d (figure 4).

Deux formes différentes de TRPM8 sont exprimées de manière différentielle dans les cellules épithéliales apicales de la prostate humaine.

L'utilisation de deux couples d'oligonucléotides différents m'a permis de mettre en évidence l'expression de deux formes de TRPM8 dans les cellules épithéliales apicales (figure 5). La forme dite « classique » n'est exprimée que dans les PrPE-6d, il s'agit de la forme exprimée dans les neurones sensoriels et générant le courant plasmique dans les PrPE-6d. L'autre forme définie comme « isoforme », présente une expression plus stable, presque indifférente à l'état de différenciation des cellules.

Nous avons précédemment (article 2) reporté que la lignée PC-3 (métastases osseuses d'adénocarcinome de prostate) n'exprimait pas TRPM8. Nous avons donc transfecté l'AR afin de réinduire son expression. La figure 6 démontre l'apparition de la forme classique de TRPM8 corrélée avec l'apparition de la PSA dans les cellules transfectées. En outre, nous reportons la modulation de l'isoforme de TRPM8.

Enfin, les analyses électrophysiologiques démontrent qu'il existe une fonction de vidange activée par le menthol même en l'absence de la forme classique de TRPM8 (figure 7). L'isoforme de TRPM8 est donc impliquée dans la réponse réticulaire, mais pas dans la réponse membranaire. Par contre, la forme classique de TRPM8 est capable de fonctionner dans la membrane du RE comme dans la membrane plasmique.

En conclusion, ces travaux démontrent que :

- **TRPM8 est fonctionnel dans la membrane plasmique et dans la membrane du réticulum endoplasmique des cellules épithéliales apicales sécrétrices matures.**
- **Seule la fonction réticulaire est présente dans les cellules épithéliales intermédiaires.**
- **L'acquisition du récepteur des androgènes induit l'intensification de la fonction réticulaire et l'apparition de la fonction membranaire de TRPM8 lors de la différenciation des cellules intermédiaires en cellules apicales.**
- **Certains cancers de la prostate ayant une expression accrue de TRPM8 possèdent aussi une fonction membranaire plus intense (comparable à celle obtenue dans un modèle de surexpression hétérologue).**
- **Les différences fonctionnelles observées peuvent être expliquées par la présence de deux formes du canal TRPM8.**

Conclusion du chapitre.

Dans ce chapitre, nous avons démontré que l'expression du gène *trpm8* est très finement contrôlée par l'AR au cours de la différenciation des cellules épithéliales de la prostate. Nous avons également mis en évidence que le canal TRPM8 fonctionne sur les membranes plasmique et réticulaire des cellules épithéliales apicales sécrétrices matures. Dans les cellules épithéliales intermédiaires, nos résultats indiquent que le canal TRPM8 fonctionne exclusivement sur la membrane du réticulum endoplasmique. Or, nous avons démontré que la protéine classique TRPM8 (exprimée dans les neurones) n'est pas responsable de la fonction réticulaire dans ces cellules épithéliales intermédiaires. En nous basant sur nos résultats préliminaires et en tenant compte de la littérature sur les isoformes des canaux TRP, nous proposons qu'une isoforme de TRPM8 soit responsable de la fonction réticulaire de TRPM8 dans ces cellules épithéliales intermédiaires de la prostate. Dans les cellules sécrétrices matures (exprimant le RA), l'activité réticulaire de TRPM8 refléterait, en fait, la somme de l'activité de l'isoforme de TRPM8 et de l'activité de la forme TRPM8 classique.

Chapitre II

II) Caractérisation des isoformes de TRPM8

L'étude des isoformes de TRPM8 s'est vite révélée riche et passionnante, mais aussi techniquement difficile. La première partie de ce chapitre décrira nos résultats préliminaires sur la caractérisation d'une isoforme réticulaire de TRPM8 dans les cellules musculaires lisses de la prostate humaine. Ce travail servira de base à la seconde partie décrivant l'étude d'une forme tronquée de TRPM8, restreinte au réticulum endoplasmique des kératinocytes humains, et son rôle dans le contrôle de la prolifération de ces cellules. Nous terminerons par une partie consacrée aux petites isoformes de TRPM8, incluant un article en préparation et quelques données supplémentaires non soumises.

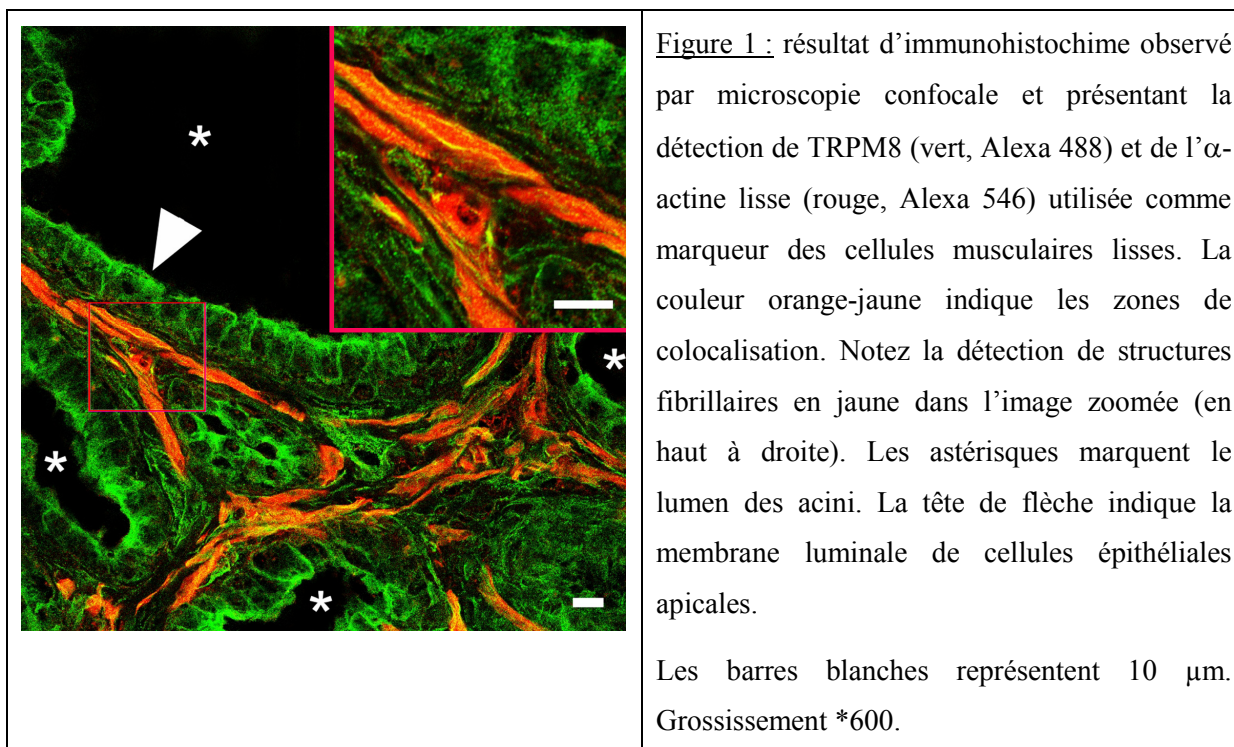
II.A) Résultats préliminaires : TRPM8 dans les cellules musculaires lisses de la prostate

« Les cellules musculaires lisses de la prostate expriment un canal TRPM8 fonctionnel sur la membrane du réticulum endoplasmique. »

Gabriel Bidaux, Matthieu Flourakis, Benjamin Beck, Morad Roudbaraki, et Natalia Prevarskaya.

Nous avons reporté dans l'article n°1 que la protéine TRPM8 avait été détectée dans des cellules coexprimant l' α -actine lisse utilisée comme marqueur spécifique des cellules musculaires lisses. Nous avons récemment mis en place la culture primaire de cellules musculaires lisses de prostate humaine à partir de prélèvements chirurgicaux. J'ai alors réalisé quelques expériences dans le but de confirmer l'expression de TRPM8 dans ces cellules.

L'utilisation de la microscopie confocale m'a permis de détecter TRPM8 et l' α -actine dans les cellules musculaires lisses de la prostate (Figures 1 et 2). La protéine TRPM8 présente une distribution sous forme de fibres intracellulaires dans ces cellules. L'utilisation de la microscopie électronique, nous a permis de confirmer la présence de TRPM8 le long des structures fibrillaires. Notons cependant qu'aucun signal n'est détectable sur la membrane plasmique contrairement aux cellules épithéliales apicales (cf. article n°2).



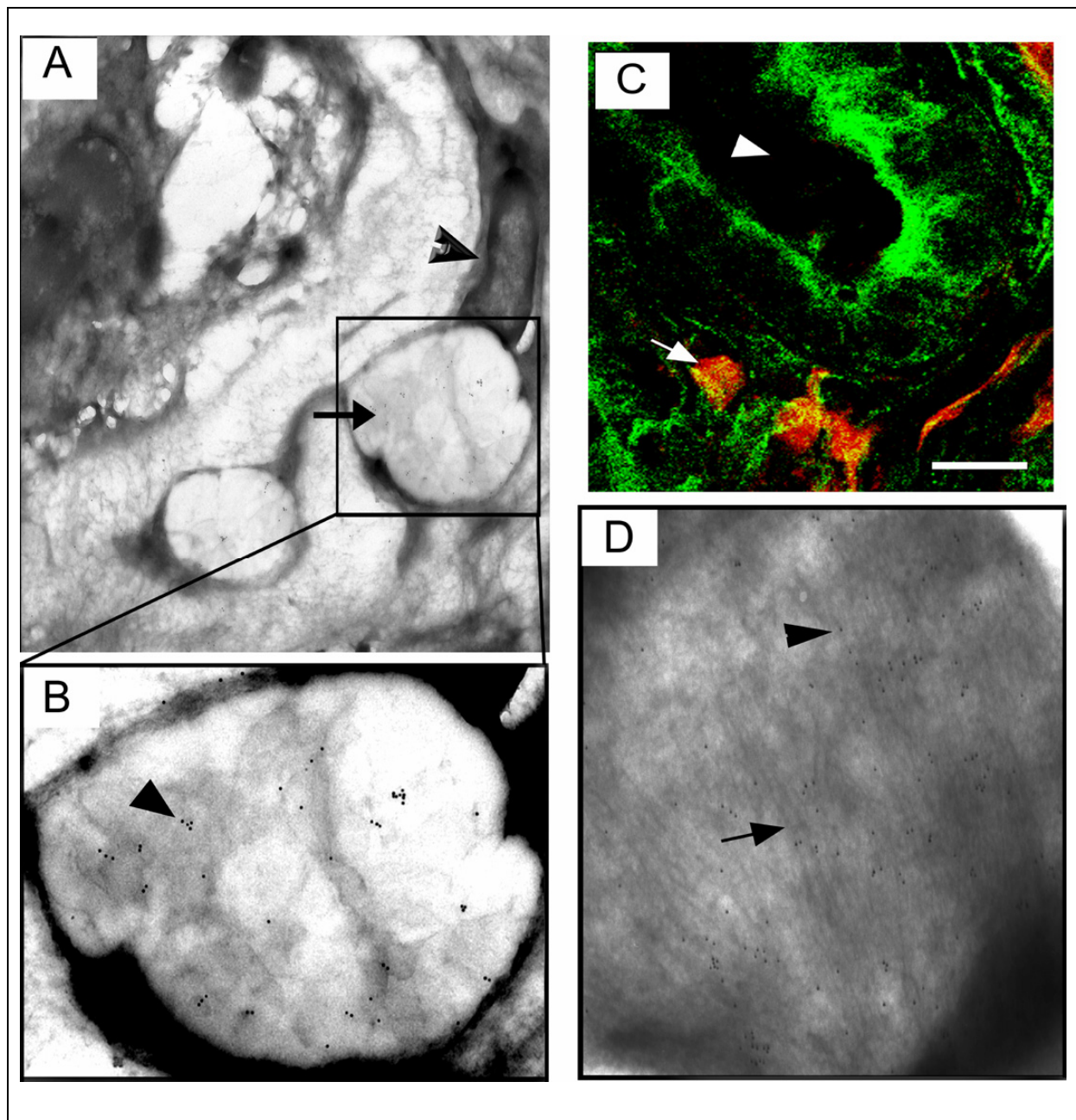


Figure 2 : résultats de microscopie électronique montrant la détection de la protéine TRPM8 dans des cellules stromales fusiformes (caractéristiques des cellules musculaires lisses). **A** : cellules musculaires observées en coupe transversale (flèche), sous jacentes à la membrane basale (tête de flèche). **B** : Grossissement d'une cellule musculaire lisse en coupe transversale avec détection d'un marquage intracellulaire ponctué. **C** : image de microscopie confocale mettant en évidence la co-détection de TRPM8 (vert) et de l' α -actine lisse dans des cellules musculaires lisses en coupe transversale (flèche blanche). **D** : coupe longitudinale de cellule stromale riche en fibres (flèche) pouvant correspondre à une cellule musculaire lisse. Un marquage ponctué suivant les fibres est détecté dans cette cellule (tête de flèches).

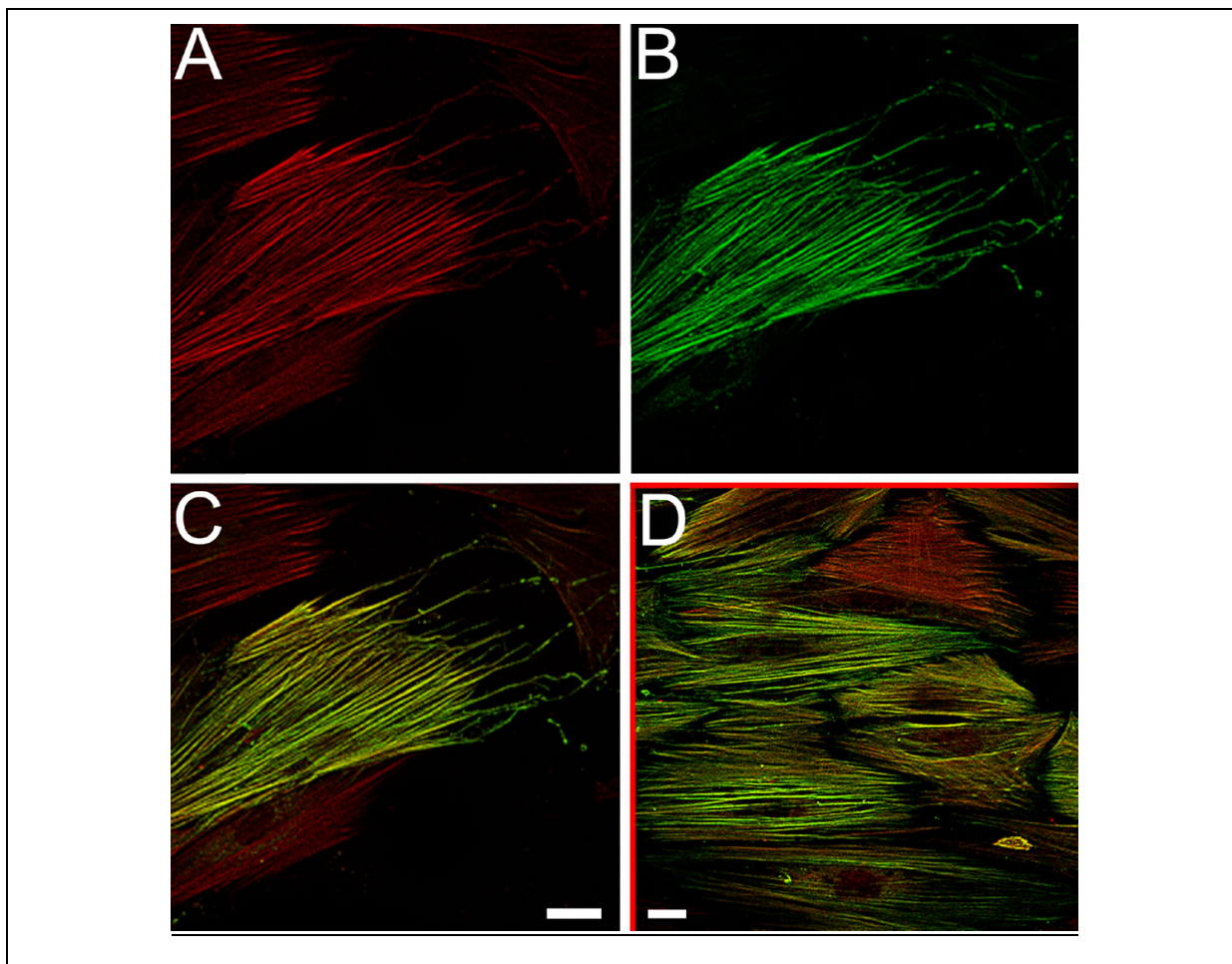
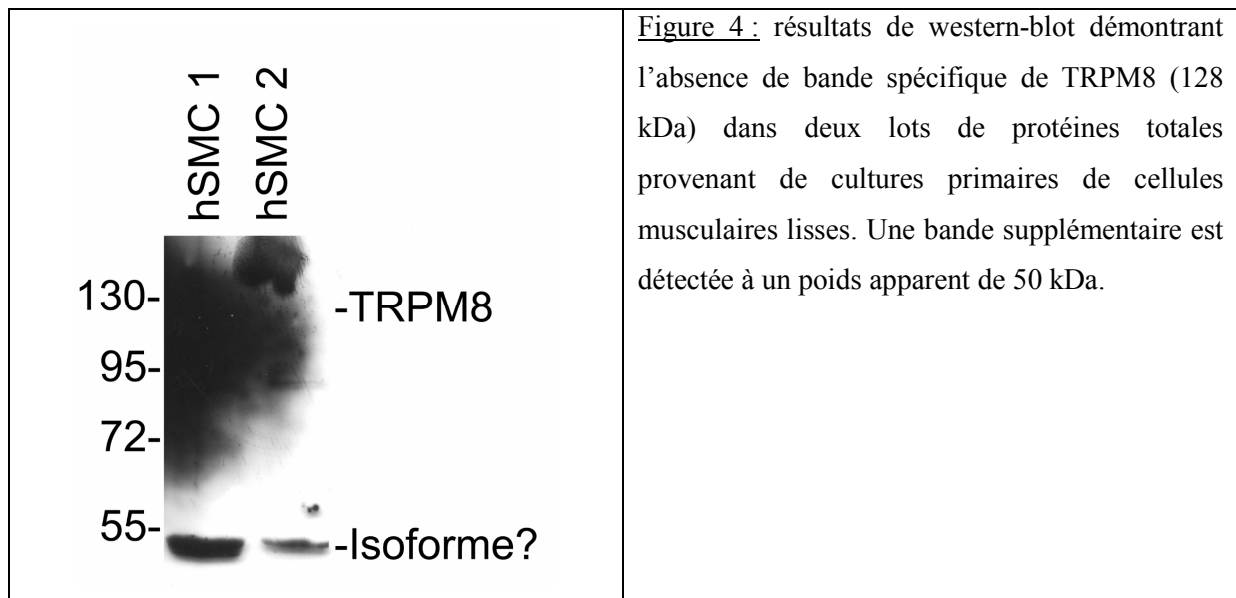


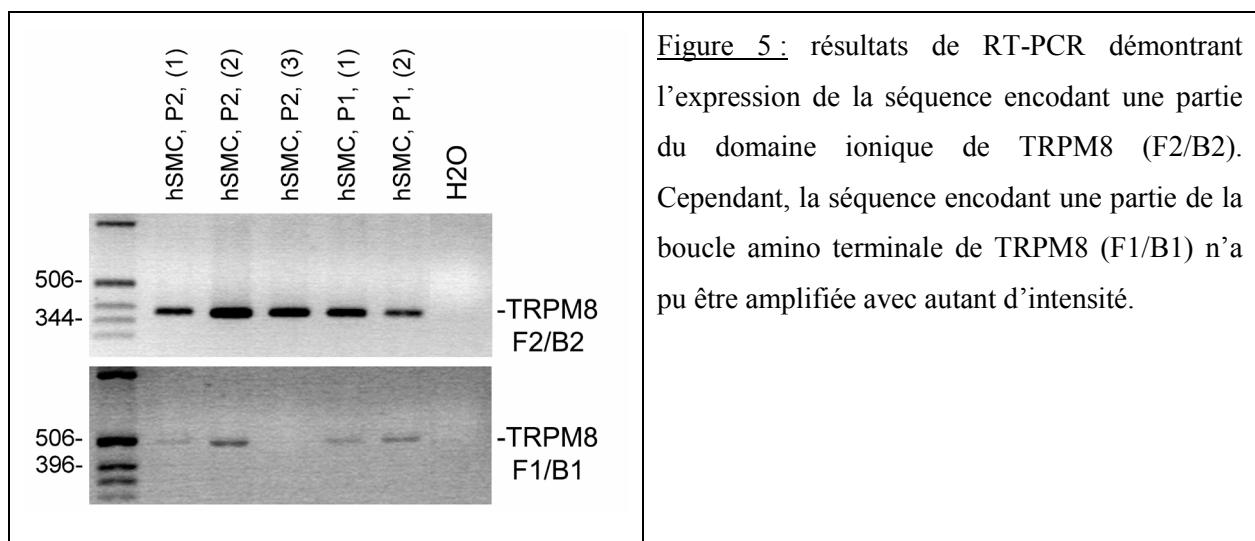
Figure 3 : résultats d’immunofluorescence sur des cultures primaires de cellules musculaires lisses de prostate humaine observés par microscopie confocale et présentant la détection de TRPM8 détecté par (Alexa 546, rouge, figure **A**) et de l’ α -actine lisse détecté par (Alexa 488, vert, figure **B**) utilisée comme marqueur des cellules musculaires lisses. La couleur orange-jaune indique les zones de colocalisation (**C**). Notez la détection de structures fibrillaires en jaune. La figure **D** montre un champ plus large. Les barres blanches représentent 10 μ m. Grossissement optique *600.

Le développement, au sein du laboratoire, de la culture primaire de cellules musculaires lisses a considérablement augmenté la facilité d’étude de ces cellules. J’ai ainsi pu mener différentes études d’expression comme l’immunofluorescence, le western-blot et la PCR. La figure 3 présente la codétection et la colocalisation de l’ α -actine lisse et de TRPM8 dans ces cellules primaires musculaires lisses.

J’ai ensuite voulu confirmer cette expression par western-blot. La protéine TRPM8 de taille attendue (128 kDa) n’a pas été détectée, alors qu’une protéine de 50 kDa était visible (figure 4).



J'ai finalement testé la structure de l'ARN de TRPM8 par PCR en utilisant les deux couples d'oligonucléotides utilisés dans l'article n°2. Le résultat de la PCR présenté dans la figure n° 5 montre l'amplification de la séquence encodant une partie domaine ionique de TRPM8. Ce produit de PCR a été cloné puis séquencé. Il présentait une homologie parfaite avec la séquence TRPM8.



Finalement, nous avons testé la fonctionnalité de ce canal TRPM8. Les études de Patch-clamp en configuration « whole-cell » n'ont pas permis de détecter le courant TRPM8. Néanmoins, les expériences d'imagerie calcique, nous ont permis de démontrer que le menthol comme l'iciline provoquaient une vidange massive du calcium réticulaire (Figure 6), à l'image du carbachol utilisé comme contrôle positif.

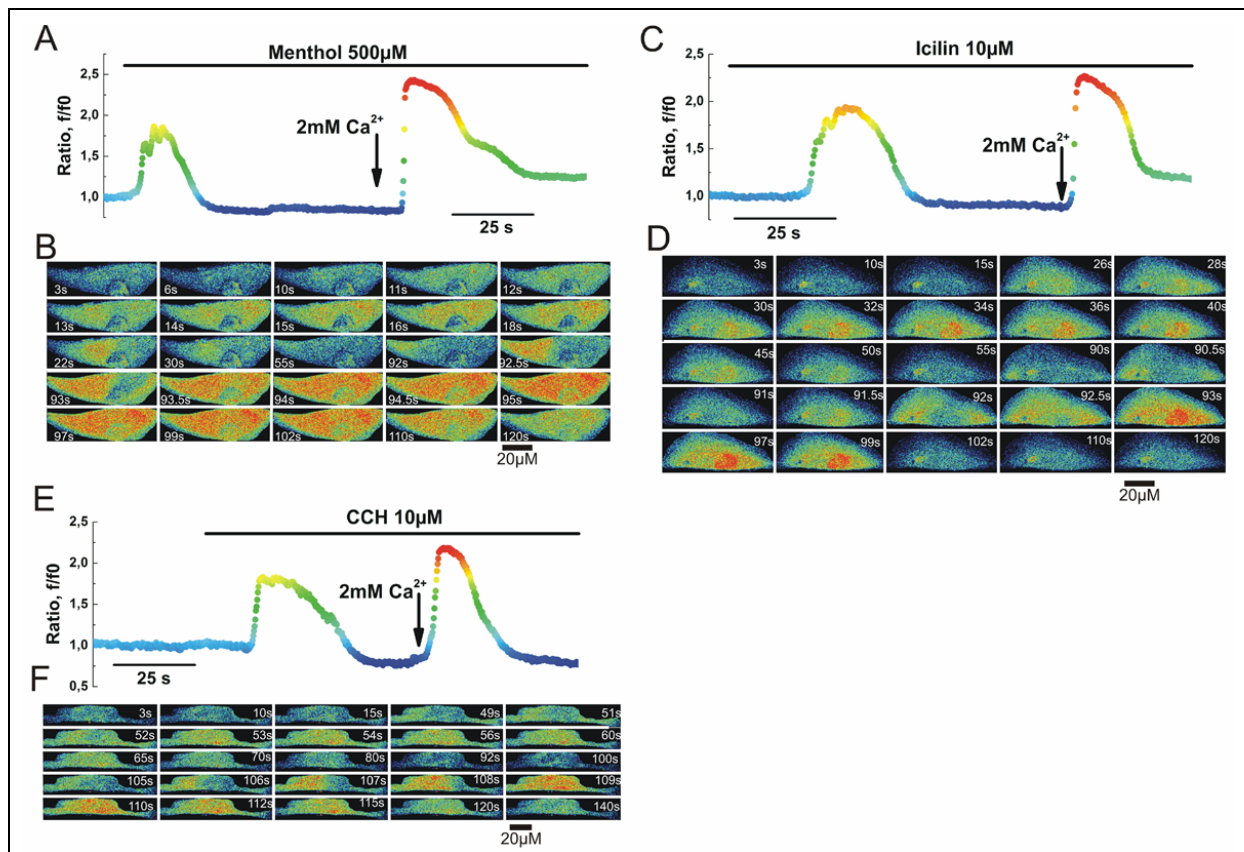


Figure 6 : évolution de la concentration de Ca^{2+} libre cytosolique détectée par imagerie calcique. Cette expérience démontre l'induction de la vidange réticulaire de Ca^{2+} suivie par une entrée capacitive de Ca^{2+} lors de l'application de menthol, d'iciline et de carbachol (respectivement A, C et E). Les figures B, D et F démontrent l'augmentation du taux de Ca^{2+} au cours du temps dans une cellule représentative. Pour chaque condition n=30.

En conclusion, nos résultats préliminaires démontrent l'expression d'une protéine TRPM8 dans les cellules musculaires lisses. Cette protéine est fonctionnelle dans la membrane du réticulum endoplasmique et son activation provoque une vidange massive du calcium réticulaire comparable à celle déclenchée par l'application de carbachol. Néanmoins, l'étude de la structure de l'ARN et de la protéine renforce l'hypothèse de l'existence d'une isoforme courte mais fonctionnelle de TRPM8 dans ces cellules musculaires. Cette isoforme, caractérisée par une séquence TRPM8 tronquée, pourrait avoir perdu certains mécanismes de régulation de TRPM8 et, en cas d'insertions d'exons supplémentaires, pourrait acquérir des modes de régulations nouveaux.

II.B) Résultats préliminaires : TRPM8 dans les kératinocytes

« TRPM8 est spécifique de la prostate et des neurones thermosensoriels » (Kraft and Harteneck, 2005). Compte tenu des résultats publiés jusqu'à aujourd'hui, cette assertion reste vraie. Néanmoins, en tenant compte de nos résultats sur la prostate et de la possibilité qu'une isoforme réticulaire de TRPM8 puisse exister, nous avons élargi nos recherches à d'autres organes afin de vérifier l'absence d'expression de TRPM8 dans les autres tissus. Je ne présenterai ici que nos résultats obtenus sur les kératinocytes car ce sont les plus aboutis pour le moment. Cependant, je me limiterai à la présentation des résultats les plus intéressants dans ce chapitre traitant des isoformes de TRPM8.

“Une isoforme réticulaire de TRPM8 est impliquée dans le contrôle de la prolifération des kératinocytes.”

Gabriel Bidaux[†], Benjamin Beck[†], Matthieu Flourakis, Gilbert Lepage, V'yacheslav Lehen'kyi, Renata Polakowska and Natalia Prevarskaya

[†]: Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

En réalisant une recherche de l'ARN de TRPM8 par PCR dans la lignée cellulaire de kératinocytes humains HaCaT, je me suis rendu compte que certaines zones étaient amplifiées. La figure 1A présente un alignement des fragments amplifiés par PCR avec la séquence génomique du gène *trpm8*. Les résultats de PCR montrent une amplification des 4 zones dans la lignée LNCaP utilisée comme contrôle positif (figure 1.B). Les figures 1C et 1D présentent les résultats des amplifications respectivement dans la lignée de kératinocytes humains « HaCaT » et dans une culture primaire de kératinocytes humains sains (hPK). J'ai d'autre part obtenu les mêmes résultats à partir de culture de kératinocytes cancéreux. Aucune des deux séquences encodant la grande boucle cytoplasmique aminoterminal n'a pu être amplifiée. Au contraire, les régions encodant la boucle du pore et les segments transmembranaires 5 et 6 sont exprimées. J'ai cloné les fragments amplifiés dans les HaCaT, les hPK et issus des PCR n°4, puis les aient séquencés. Les alignements de séquences sont présentés dans la figure 1E. Les fragments amplifiés, les HaCaT et les hPK possèdent 100% d'homologie avec la séquence de TRPM8 clonée à partir de cellules de prostate.

Figure 1

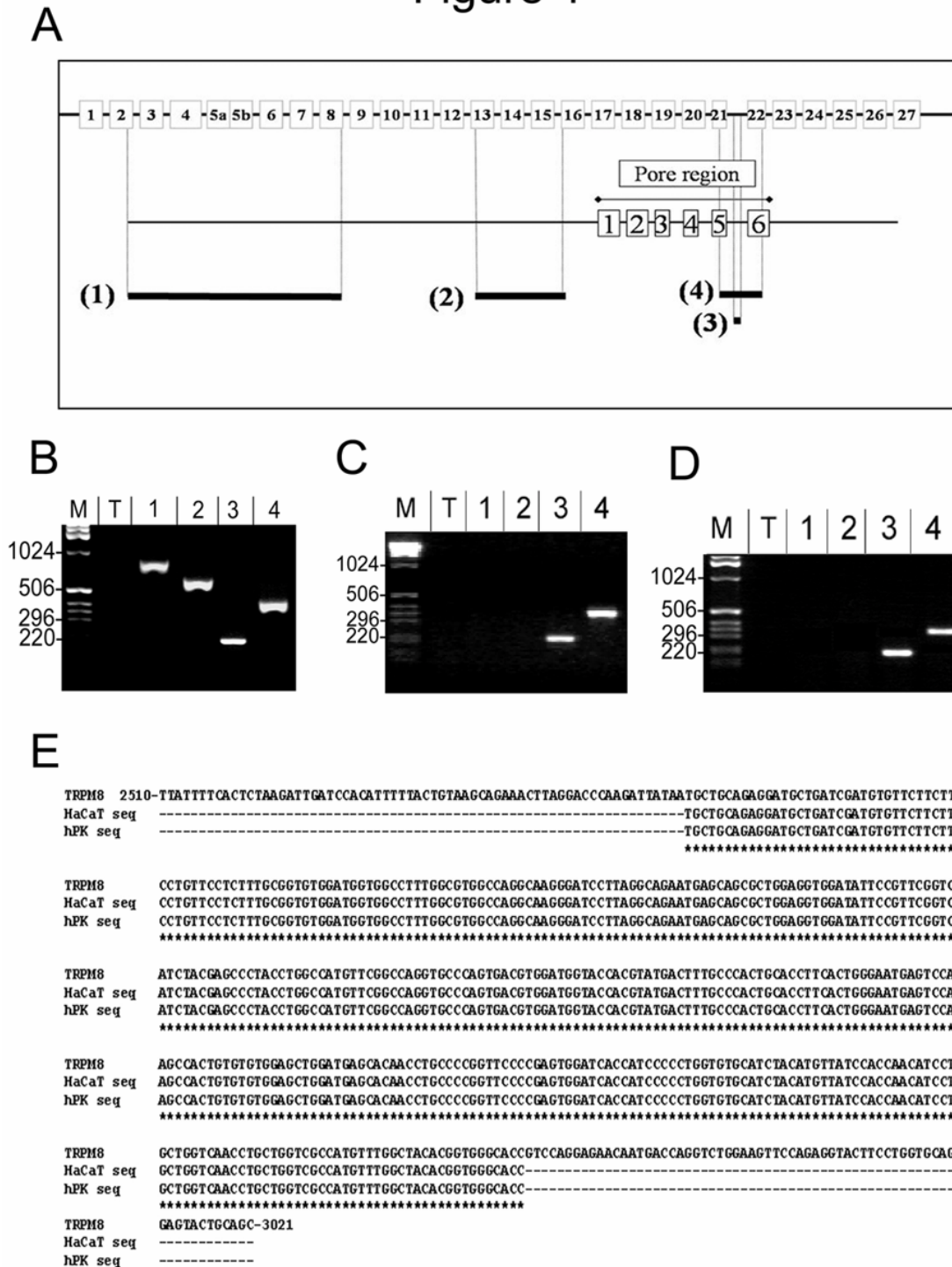


Figure 1 : une nouvelle isoforme de TRPM8 est exprimée dans les kératinocytes. A : carte génomique présentant les couples de PCR utilisés et leur localisation. Résultats de PCR utilisant 4 couples d'oligonucléotides (1 à 4) dans les cellules LNCaP (B), HaCaT (C) et hPK (D). Le témoin (T) correspond à de l'eau remplaçant l'ADN et est utilisé pour contrôler la contamination des réactifs. Les séquences des oligonucléotides sont reportées en annexes. E : montre les séquences des produits de PCR n° 4 clonées à partir des HaCaT et hPK et leur alignement avec la zone d'homologie de la séquence connue de TRPM8.

Ces résultats mettent donc en évidence l'existence d'une forme de TRPM8 différente de celle déjà clonée dans la prostate et dans les neurones. Nous pouvons bien sûr supputer que des mutations intervenant dans les zones d'homologie des oligonucléotides des couples 1 et 2 puissent expliquer l'absence d'amplification. Or, les expériences de western-blot ont directement réfuté l'existence de la protéine classique TRPM8 dans cette lignée. L'ensemble de ces résultats d'expression confirme l'existence d'une isoforme de TRPM8 dans les kératinocytes humains.

Les expériences d'électrophysiologie ont permis de mettre en évidence une fonction réticulaire pour cette nouvelle isoforme de TRPM8. Grâce à la technique d'imagerie calcique, nous avons démontré que l'application de menthol, d'iciline ou de froid provoque une augmentation transitoire de la concentration cytosolique de calcium libre en l'absence de calcium externe (figure 2.A). Cette augmentation correspond à la vidange des stocks calciques réticulaires. Elle est suivie d'une entrée capacitive de calcium (ECC) observée dès l'ajout de 2 mM de calcium dans la solution externe. L'utilisation de la technique de Patch-clamp en configuration « cellule entière » n'a pas permis de mettre en évidence le courant classique TRPM8. Par contre, comme dans la lignée LNCaP, l'application de menthol entraîne l'activation d'un courant de type SOC (figure 2.B). Ce courant calcique sélectif est en fait responsable de l'ECC observée en imagerie calcique.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons développé des ARN interférents plasmidiques ou shARN contre TRPM8. Le shARN n°1 (sh-TRPM8-1) cible une séquence contenue dans l'exon n°9 alors que le shARN n°2 (sh-TRPM8-2) reconnaît une séquence de l'exon 21 encodant la boucle du pore ionique. Ces deux shARN ont été validés dans notre modèle HEK-M8 et sont fonctionnels. Nous avons alors « nucléofecté » les cellules HaCaT, soit avec un des deux sh-TRPM8 soit avec le vecteur vide. La figure 2.C démontre l'efficacité du sh-TRPM8-2 testée par PRC. Ce résultat est confirmé par la suppression du courant SOC activé par le menthol dans les cellules transfectées par le sh-TRPM8-2 uniquement.

Figure 2

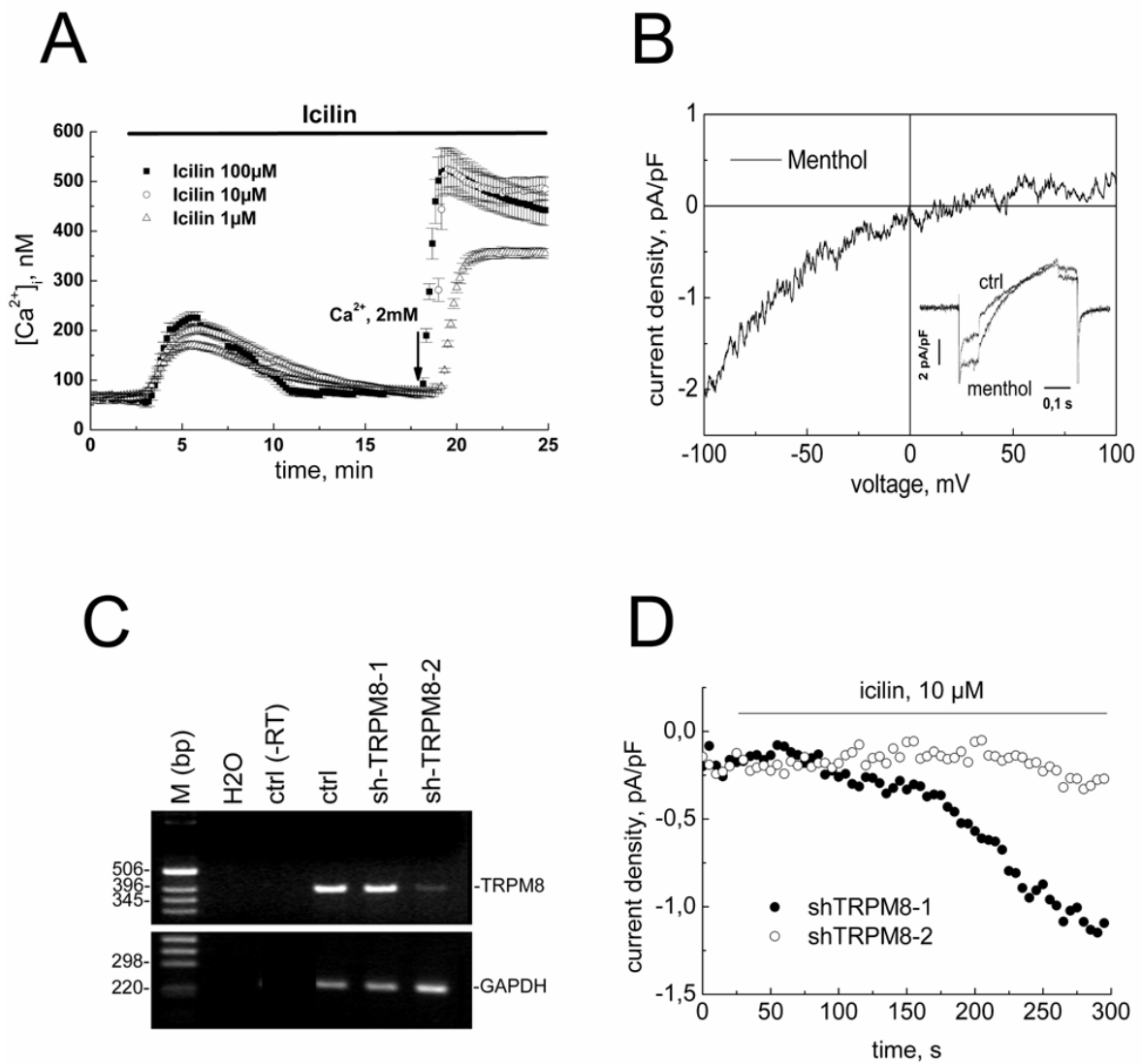


Figure 2 : l'isoforme de TRPM8 fonctionne dans la membrane du réticulum endoplasmique des kératinocytes. **A** : augmentation de la concentration de calcium libre cytosolique enregistrée avec la sonde fura-2 par la technique d'imagerie calcique. L'application de dose croissante d'iciline déclenche la vidange du calcium réticulaire suivie de l'ECC dès ajout de 2 mM de calcium externe. **B** : enregistrement de l'intensité du courant SOC en présence de 200 μM de menthol et en fonction du voltage imposé à la membrane par la technique de Patch-clamp en configuration cellule entière. **C**, PCR semi-quantitative démontrant la destruction de l'ARN TRPM8 dans les cellules HaCaT transfectées par le vecteur encodant le siARN n°2 contre TRPM8 (sh-TRPM8-2). L'ARN de la GAPDH utilisé comme contrôle prouve la spécificité de la destruction de l'ARN de TRPM8 et permet de quantifier la diminution de l'expression de TRPM8. Le contrôle de spécificité de l'extinction correspond au vecteur vide (ctrl). Le contrôle (H2O) est utilisé pour contrôler la

contamination des réactifs. Le contrôle (ctrl-RT) correspond au lot d'ARN extrait à partir des cellules transfectées avec le vecteur vide, mais sans ajouter de transcriptase inverse lors de la reverse transcription. Ce contrôle est utilisé pour démontrer l'absence d'ADN contaminant dans le lot d'ARN ou d'ADN complémentaire. **D** : Contrôle de l'efficacité du sh-TRPM-2 par électrophysiologie. Le courant SOC présent dans les cellules transfectées avec le sh-TRPM-1 n'est pas enregistré dans les cellules transfectées avec le sh-TRPM-2.

Ces résultats démontrent donc que cette nouvelle isoforme de TRPM8 est fonctionnelle dans les kératinocytes bien que son activité soit restreinte à la membrane du RE.

Dans le but d'étudier le rôle de cette isoforme sur la physiologie des kératinocytes, j'ai développé une lignée de cellules HaCaT intégrant le sh-TRPM8-2 (shM8-2) ainsi que sa lignée contrôle intégrant le vecteur vide (pSil). Nous avons alors vérifié l'efficacité du « knock-down » dans cette lignée par PCR et par électrophysiologie. La figure 3.A présente l'extinction de l'ARN de TRPM8 dans la lignée shM8-2 mais pas dans la lignée contrôle pSil. Ces résultats d'expression ont été confirmés par imagerie calcique et patch-clamp.

Après avoir validé ces clones, nous avons observé leur croissance et nous nous sommes rapidement aperçu que la croissance des clones shM8 était nettement ralentie par rapport à celle des clones contrôles. Nous avons alors réalisé des tests de mesure de croissance par la technique MTS dans nos clones stables mais aussi dans des cellules nucléofectées transitoirement. Toutes nos expériences ont donné les mêmes résultats quel que soit le mode de surexpression des vecteurs (stable ou transitoire). La figure 3.B présente les résultats obtenus sur nos lignées stables. La croissance des cellules « knock-down » s'établit à $71,43 \pm 4,24\%$ de celle des cellules contrôles, démontrant ainsi leur très nette diminution de prolifération.

Nous avons alors commencé à décrypter cet effet de TRPM8 sur la prolifération. Par PCR semi-quantitative, j'ai testé l'expression des ARN de PCNA et P21 (figure 3.C). PCNA est utilisé comme marqueur de la phase S qui caractérise les cellules en prolifération, alors que p21 intervient dans les phases de contrôle du cycle cellulaire ou « chek-points ». C'est pourquoi p21 est utilisé comme marqueur d'arrêt de prolifération. Dans la lignée knock-down pour TRPM8, contre toutes attentes, l'expression de PCNA augmente significativement, alors que celle de p21 diminue significativement (figure 3.D).

Figure 3

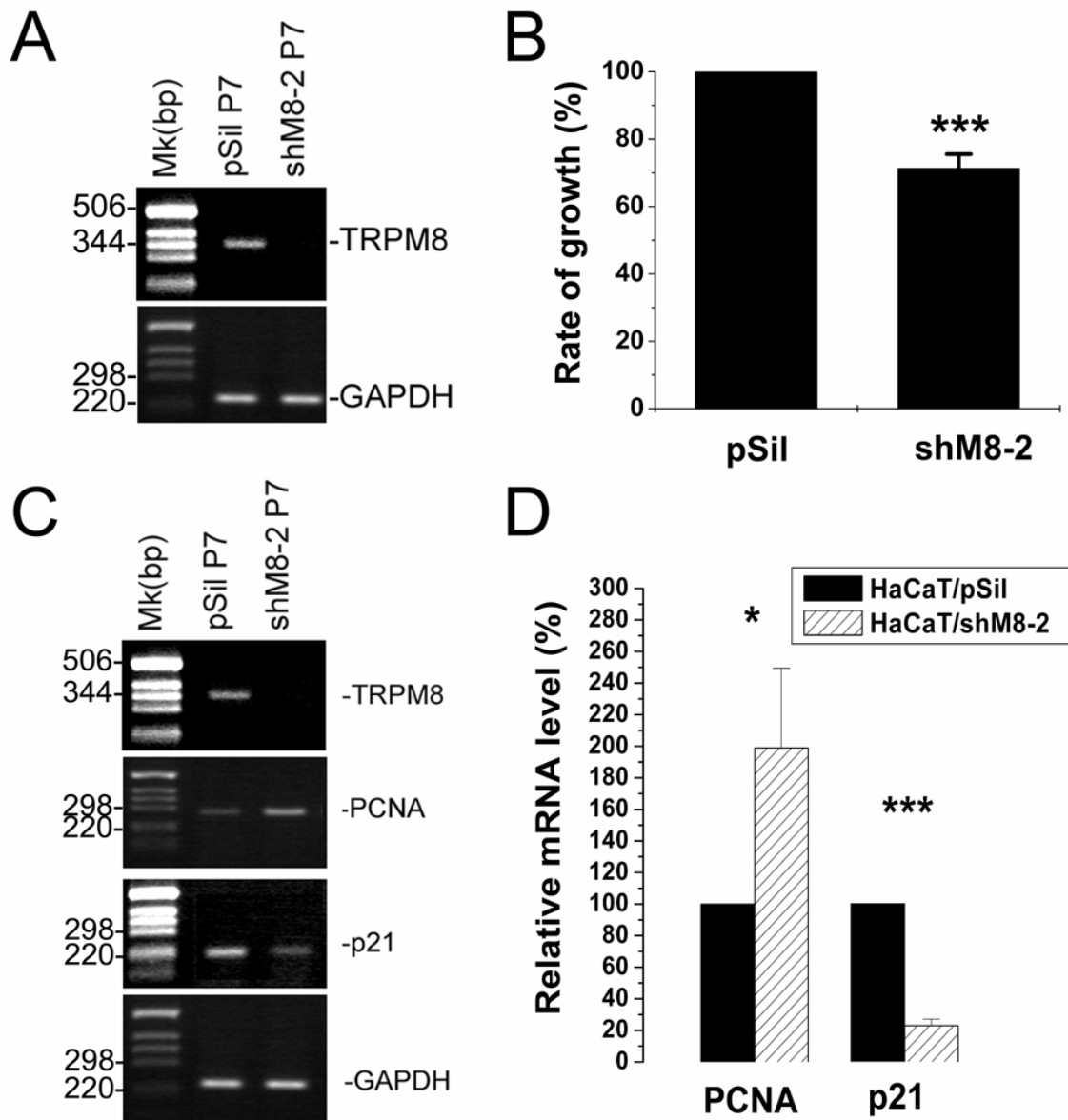


Figure 3 : l'isoforme de TRPM8 participe au contrôle de la prolifération des kératinocytes.

A : destruction de l'ARN TRPM8 dans la lignée HaCaT surexprimant de manière stable le sh-TRPM8-2 (shM8-2) détectée par PCR semi-quantitative. L'ARN GAPDH est utilisé comme rapporteur de la quantité de d'ADN complémentaire initialement utilisée dans la réaction de PCR, mais aussi comme contrôle de la spécificité de destruction de l'ARN TRPM8. **B** : Histogramme représentant la croissance relative de la lignée shM8-2 par rapport à la lignée contrôle pSil. N=5 ; *** : $p < 0,001$. **C** : PCR semi-quantitative montrant l'expression des ARN TRPM8, PCNA, p21 et GAPDH dans les lignées HaCaT pSil et shM8-2. **D** : histogramme représentant le taux d'ARN de PCNA et de p21 entre les deux lignées HaCaT pSil et shM8-2. N=3 ; * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$.

Ces résultats obtenus par PCR peuvent indiquer qu'une proportion plus importante de la population de cellules shM8-2 est en phase S par rapport à la lignée pSil. Notre hypothèse actuelle pour expliquer la diminution de prolifération des cellules shM8-2 est que la durée du cycle cellulaire soit augmentée non pas dans son interphase mais dans sa phase de synthèse.

Nous poursuivons ces travaux par une analyse de cycle cellulaire afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Nous pourrions alors tenter de comprendre comment la suppression de cette isoforme de TRPM8 affecte la croissance des kératinocytes.

D'autre part, la position privilégiée de la peau par rapport à l'environnement extérieur et la thermosensibilité de TRPM8 et de son isoforme réticulaire, laissent en suspens la question d'un rôle éventuel des kératinocytes TRPM8+ dans la détection de la baisse de température. Par analogie, il a été démontré que le canal TRPV3 (sensible à des températures légèrement supérieures à la température corporelle) était exprimé dans les kératinocytes mais pas dans les fibres nerveuses afférentes (Moqrich et al., 2005; Peier et al., 2002b). Le développement de souris TRPV3^{-/-} a mis en évidence que la détection de la température corporelle par les animaux nécessitait que le canal TRPV3 soit fonctionnel dans les kératinocytes. Les auteurs ont proposé qu'il existe une continuité entre les kératinocytes et les fibres afférentes (Moqrich et al., 2005). Ainsi, la détection des températures de l'ordre de 37°C serait effectuée par les kératinocytes qui « transmettraient » l'information jusqu'aux neurones sous-jacents. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ce type de jonction fonctionnelle a déjà été mis en évidence entre les cellules épithéliales de l'épithélium nasal et les fibres afférentes sous-jacentes (Finger et al., 2003). Selon toute vraisemblance, ce fonctionnement pourrait aussi exister pour l'isoforme réticulaire de TRPM8. Il est aussi très probable que la sécrétion d'ATP par les kératinocytes, connue pour réguler leur propre activité, puisse constituer un signal moléculaire pour les neurones.

De la mouche Drosophile à l'organisme humain, la diversification génétique de la famille TRP a conduit à la multiplication des fonctions assurées par cette famille. L'un des mécanismes générateur de diversité essentiel à l'évolution est l'épissage alternatif. Le développement des bases de données de séquences partielles d'ADN ou EST (Expressed Sequence Tag) a permis de faciliter la recherche d'ARN alternatifs.

L'analyse des bases de données a révélée l'existence d'une séquence non annotée correspondant à un ARN alternatif de TRPM8. En voulant cloner cette séquence dans les cellules LNCaP, j'ai en fait obtenu deux ARN différents. Nous avons alors entrepris d'étudier le rôle de ces deux isoformes dénommées : « sTRPM8 α » et « sTRPM8 β » sur l'activité du canal TRPM8. Ce travail est décrit dans l'article n°4. En étudiant l'expression de ces isoformes dans différents lots de biopsies de prostate humaine, j'ai découvert une autre petite isoforme appelée « sTRPM8-7b ». Ces travaux restent préliminaires, c'est pourquoi je ne les présenterai que sous forme de résultats supplémentaires.

II.C) Article 4

“Modulation of Cold/menthol sensitivity of the TRPM8 channel involves short TRPM8 isoforms as channel regulatory sub-units.”

Gabriel Bidaux[†], Benjamin Beck[†], Oleksander Zholos, Matthieu Flourakis, Morad Roudbaraki, Philippe Delcourt, Gilbert Lepage, and Natalia Prevarskaya

(Article en préparation ; la version présentée dans cette thèse n'est en aucun cas la version finale et peut donc contenir des fautes d'anglais).

[†]: Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

Les cellules LNCaP expriment deux ARN alternatifs de TRPM8 qui codent pour deux petites isoformes cytosoliques.

En 2002, en analysant les bases de données regroupant les séquences des ARN et des EST, j'ai trouvé une séquence, non annotée à l'époque, qui correspondait partiellement à la séquence de TRPM8. J'ai alors contrôlé l'expression de cette forme dans les cellules LNCaP et suis parvenu à cloner deux ARN alternatifs de TRPM8 (Figure1). Ces deux ARN alternatifs de TRPM8 codent pour des protéines tronquées par l'intégration de l'exon 7b qui contient un codon stop précoce. L'expression de la forme α est plus ubiquitaire que celle de la forme classique de TRPM8, quand l'isoforme β n'est, elle, exprimée que dans quelques tissus (cancers de la prostate

et glioblastomes). L'analyse aléatoire du ratio [ARN TRPM8/ARN sTRPM8 $\alpha+\beta$] a permis de caractériser deux populations différentes dans les lots de biopsies de patients suspectés de présenter un cancer de la prostate (figure 2). Ces deux populations présentent des ratios proches de ceux détectés dans la lignée androgéno-dépendante LNCaP et dans la lignée androgéno-indépendante LNCaP C4-2.

Ces petits ARN alternatifs codent pour chacune deux protéines de 6 et 18 kDa (Figure 3). L'ARN alternatif α code à environ 60% pour la protéine sTRPM8-18 et 40% pour la protéine sTRPM8-6 alors que l'ARN β code à 98% la protéine sTRPM8-6. La protéine sTRPM8-18 s'agrège en un multimère, alors que la forme sTRPM8-6 reste monomérique. L'utilisation de la technique de FRET, nous a permis de mettre en évidence la proximité entre les isoformes (sTRPM8-18 et sTRPM8-6) et la boucle carboxyterminale (Ct) du canal. Cette boucle Ct est nécessaire à la tétramérisation du canal et porte la fonction de thermosensibilité du canal (Brauchi et al., 2006; Dragoni et al., 2006). Nous avons alors étudié le rôle de ces isoformes sur l'activité du canal TRPM8.

Les petites isoformes modulent l'activation de TRPM8 par le menthol et le froid.

Nos travaux démontrent que l'expression de ces isoformes diminue l'intensité du flux calcique entrant dans les cellules HEK lors de l'application de menthol ainsi qu'une diminution proportionnelle du courant ionique transitant par TRPM8 (Figure 4). En ce qui concerne l'isoforme sTRPM8-6, cet effet inhibiteur est restreint à l'activation par le menthol et à l'activation par le froid. En effet, l'amplitude de la réponse de TRPM8 lors de l'application d'iciline n'est en aucun cas affectée. L'isoforme sTRPM8-18 entraîne, elle, une inhibition partielle de TRPM8 quelque soit l'activateur (Figure 4). Cette inhibition ne semble pas faire intervenir de problème de translocation à la membrane. Ainsi, selon la séquence et donc la structure de l'isoforme, l'effet inhibiteur est plus ou moins complet. Ces résultats indiquent que la nature de l'inhibition de l'activation menthol/froid est différente de celle de l'activation iciline.

En outre, nous démontrons que la proportion des ARNm TRPM8/sTRPM8 détermine directement l'amplitude de la modulation. Ainsi, plus la quantité d'isoformes sTRPM8-6 est importante plus l'inhibition de la réponse au menthol de TRPM8 est prononcée (Figure 5). En tenant compte du ratio d'expression des ARN TRPM8/sTRPM8 dans les populations de biopsies (figure 2), nous proposons que selon l'état physiologique ou physiopathologique de la prostate, l'activité du canal TRPM8 soit modulée différemment par ses isoformes.

Le mécanisme d'action des isoformes sur l'activité de TRPM8 est double : désensibilisation au voltage et inactivation prolongée du canal.

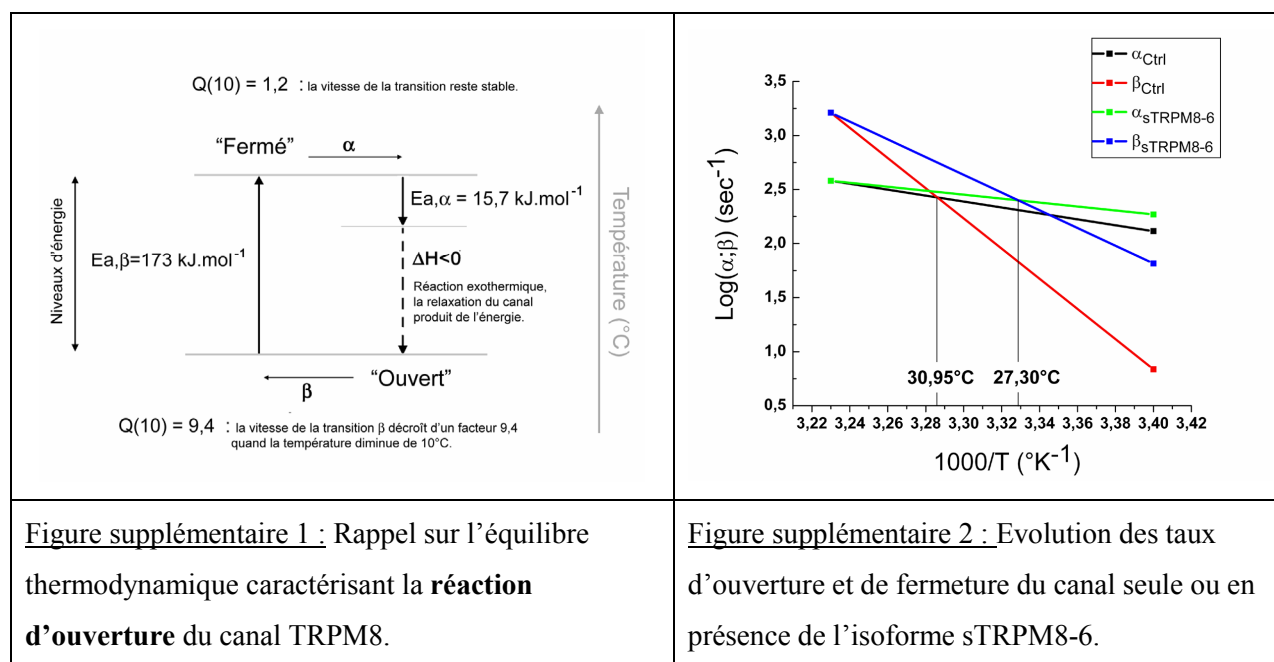
L'une des propriétés remarquables de TRPM8 est sa modulation par le voltage. Ce travail démontré par l'équipe du Prof. Nilius (Nilius et al., 2005a; Voets et al., 2004) suppose que la variation du potentiel membranaire participe à l'ouverture du canal.

Pour tous les canaux ioniques non voltage-dépendants, la valeur de la P_0 varie en fonction du potentiel de membrane (V_m), mais reste stable pour un potentiel de membrane donné (ex : P_0 de 0,2 à -60 mV quelques soient les conditions d'activation du canal). Dans le cas de TRPM8, la diminution de température provoque un déplacement de la courbe $P_0 = f(V_m)$. Ce principe est défini comme étant le mécanisme de modulation de TRPM8 par le potentiel de membrane. Concrètement, la probabilité d'ouverture (P_0) du canal, pour des potentiels membranaires proches du potentiel de repos (-60 mV et -30 mV), ne variera quasiment pas et sera proche de zéro à une température de 37°C (Figure 6.B). Le canal restant alors dans le même état d'activité. Par contre à 21°C, la P_0 du canal sera d'environ 0,08 à -60 mV (le canal est donc bien activé par la température) et cette P_0 est d'environ 0,14 à -30 mV. En définitive, l'effet de la température sur le canal favorise l'ouverture du canal pour des potentiels de membranes physiologiques dans les cellules non excitables.

Nous avons démontré que le mécanisme d'action des petites isoformes affecte la sensibilité au potentiel de membrane de TRPM8 lors de son activation par la diminution de température. Ainsi pour des potentiels membranaires de -60 mV et -30 mV, la P_0 est respectivement de 0,03 et 0,05 en présence de l'isoforme sTRPM8-6 (Figure 6.C). Notez que la probabilité d'ouverture du canal diminue considérablement pour un potentiel de membrane fixe, démontrant le pouvoir inhibiteur de l'isoforme sur l'intensité maximale du canal. En outre, il est fondamental d'observer que lors de cette dépolarisation de -60 mV à -30 mV, la diminution d'activité du canal TRPM8 due à l'isoforme passe de 2,6 ($P_{0Ctrl}/P_{0sTRPM8-6} = 0,08/0,03$) pour un potentiel de membrane de -60 mV et 2,8 ($P_{0Ctrl}/P_{0sTRPM8-6} = 0,14/0,05$) pour un potentiel de membrane de -30 mV. Ce résultat suggère que l'action de l'isoforme implique deux composantes : l'une diminution de l'activité du canal à potentiel fixe et une diminution de la sensibilité au voltage de TRPM8.

D'après les données obtenues sur l'activité unitaire du canal, la moyenne des constantes de temps de l'état ouvert ne varie pas de manière significative en présence d'isoforme. Or, la moyenne des constantes de temps de l'état fermé augmente considérablement en présence de l'isoforme sTRPM8-6. Ces résultats démontrent que la diminution d'intensité du courant TRPM8 activé par le froid ou le menthol est en partie due à la stabilisation du canal dans son état fermé.

En conclusion, selon le modèle thermodynamique décrivant le mécanisme d'activation de TRPM8, le rapport entre les constantes α et β définit la probabilité d'ouverture et donc l'activité du canal.



Nos données suggèrent que l'effet inhibiteur des isoformes ne modifie pas significativement la capacité de TRPM8 à détecter la diminution de température : le rapport des énergies d'activation reste relativement stable : $\beta/\alpha_{(Ctrl)} = 5,1$ et $\beta/\alpha_{(sTRPM8-6)} = 4,48$. Néanmoins, nos données démontrent que l'équilibre chimique de la réaction d'ouverture du canal (quand $\alpha = \beta$; autrement dit quand la P_0 est égale à 0,5) est atteint à une température de 31°C pour le canal seul et à 27°C pour le canal en présence de l'isoforme sTRPM8-6. Ce résultat indique que l'énergie nécessaire à l'ouverture du canal est plus grande en présence de l'isoforme. L'analyse de la valeur du voltage de demi-activation met en évidence un résultat similaire à l'étude de la température. En conclusion, ni la voltage-dépendance, ni le thermo-dépendance du canal ne sont modifiées directement. Le canal peut toujours discriminer le sens et l'amplitude de la variation de potentiel membranaire et de température. Cependant, sa réponse est plus limitée.

Nous en concluons donc que la présence de l'isoforme sTRPM8-6 stabilise le pore ionique de TRPM8 dans la conformation « canal fermé ».

En conclusion, nos résultats indiquent que les ARN alternatifs α et β de TRPM8 codent pour deux types de sous-unités régulatrices du canal TRPM8. L'isoforme sTRPM8-6 stabilise le canal en conformation « fermé » augmentant l'énergie requise pour son activation par le menthol ou par la température.

Short alternative splicing isoforms of the human *trpm8* gene selectively modulate TRPM8 channel gating

Gabriel Bidaux^{1*}, Benjamin Beck^{1*}, Oleksander Zholos², Matthieu Flourakis, Morad Roudbaraki¹, Philippe Delcourt¹, Gilbert Lepage¹, Roman Skryma¹ and Natalia Prevarskaya¹

1) Inserm, U-800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, F-59655 France; Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, F-59655 France. 2) Permanent address: Department of physiology, Medical Biology Center, Queen's university of Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast BT97BL, UK.

Running title: short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

Address correspondence to: Natalia Prevarskaya, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Bâtiment SN3, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; Tel.: 33-3-20-43-4077; Fax: 33-3-20-43-4066; E-mail: Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr

* Contributed equally to this work

Abstract

In process...

Key words: TRPM8 channel, splice variants, prostate cancer cells

Introduction

The human genome encodes hundreds of ion channels, which have been subdivided into a dozen channel families with strongly divergent structures and functional features (Hille, 2001). Among all these families, transient receptor potential family of non-selective cation channels, known as TRP superfamily, displays an extraordinary assortment of gating mechanisms, some of which represent previously unrecognized modes for regulating ion channels (Clapham, 2003; Dhaka et al., 2006; Minke, 2006).

The huge versatility of TRP channels activating stimuli, ranging from physical (mechanical stress, temperature...) and chemical (ligands, second messengers, Ca²⁺ ...) stimuli to protein-protein interaction, allows these channels to serve as versatile sensors of cells to detect changes in their environment. Indeed, TRP channels have been shown to assure numerous fundamental physiological processes varying from sensory physiology to vasorelaxation, cell viability and male fertility. In accordance with this, an increasing number of important pathologies are now being linked to TRP dysfunction (Nilius et al., 2005).

Almost all mammalian TRP channel genes are now known. Based on amino acid homologies, mammalian TRP channel superfamily (including almost 30 related members) has been divided into seven families and has received a unified

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

nomenclature (Montell, 2005). All TRP channels have six putative transmembrane domains (with a pore loop between the fifth and the sixth domains) and intracellular N- and C-terminal regions of variable length. TRP channels are supposed to assemble as homo- or hetero-tetramers to form functional cation channels (Amiri et al., 2003; Dragoni et al., 2006; Kedei et al., 2001; Strubing et al., 2001). Giving remarkable gating promiscuity of TRP channels and the diversity of their physiological roles, the gnawing mystery of these channels is their illusive activation/regulation specific mechanisms. The discovery of these mechanisms remains a challenge to scientists working in the TRP channels field.

It is important to note, that the majority of the studies on TRP channels activation/regulation have been realized on heterologous expression cell models studying previously cloned classical members from the TRP superfamily. However, one of the important, but yet less studied mechanism through which the activity of TRP channels could be regulated is the interaction of classical TRPs with their isoforms generated from alternative splice variants. Indeed, alternative splicing has been reported to be a reliable mechanism for generation of protein diversity; each gene may generate a plenty of different splice variants which in turn make proteins sharing some features with its “classical” counterpart and displaying new characteristics. Several naturally occurring splice variants of mammalian TRP channels have been already identified (Chu et al., 2005; Xu et al., 2001) and many more could be found out from the ESTs databases. In general, TRP channels isoforms may be divided in two groups depending on their structures: **i)** “long isoforms” (including P loop domain) which could functional (but different by their properties) channels by themselves (Oberwinkler et al., 2005), or could be dominant negative of the classical channel

(Fang and Setaluri, 2000; Wehage et al., 2002; Zhang et al., 2003); **ii)** short isoforms which consist from the N-terminus of the channel and are consequently non-functional as a channel. However they could interact with full-length channel and thereby modulate its activity (Chu et al., 2005; Xu et al., 2001). Studying the role of these isoforms in the mechanisms of TRP channels activation/regulation is just starting to emerge but it becomes evident that TRP channels regulation by their splicing products is one of the fundamental physiological processes of channel regulation. Nevertheless, the specific molecular mechanism(s) underlying this regulation remains poorly understood.

The present work focused on the regulation of one of the most intriguing TRP channel, TRPM8, by short isoforms. Indeed, although TRPM8 has been originally cloned from the prostate (Tsavalier et al., 2001), further studies have firmly established its function as a cold/menthol receptor in sensory neurons (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Thus, an outstanding problem heightened by a significant TRPM8 up-regulation in several tumours (prostate, lung, breasts, and skin) concerns the whole spectrum of the physiological and pathophysiological roles of TRPM8 in the tissues devoid of any significant temperature variations. Revealing possible alternative molecular events leading to TRPM8 activation/regulation would undoubtedly help to uncover differential functions of TRPM8 in various tissues.

Here we identified and cloned from prostate cancer cells two new short splice variants of TRPM8 defined as short TRPM8 alpha (sTRPM8 α) and short TRPM8 beta (sTRPM8 β). We demonstrated that sTRPM8 α encode for two distinct proteins defined as sTRPM8-6 and sTRPM8-18, though sTRPM8 β splice only encoded for the sTRPM8-6 isoform. We studied

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

the differential tissue-distribution of sTRPM8 α and sTRPM8 β expression and characterized their activity as regulatory subunits of cold/menthol-activated TRPM8 channel. Finally, we focused on mechanism of TRPM8 activity modulation by sTRPM8-6 isoform and showed that decrease cold/menthol activation of TRPM8 required conformational stabilization of the C-terminus of TRPM8 by sTRPM8-6 isoform.

This fundamental discovery on specific and tightly-controlled modulation of TRPs channel activity by short isoforms would obviously make the TRP field more complex than ever, but open a new insight on TRP channels physiological selective regulation by different stimuli.

Results

The metastatic human prostate cell line, LNCaP, expresses full length TRPM8 and two shorter splice variants.

Human *trpm8* gene resides on chromosome 2 on position 2q37.1 and consists of 27 exons spread over slightly less than 100 kpb. We have previously demonstrated that full length TRPM8 protein is expressed and functional in the endoplasmic reticulum membrane of LNCaP cell line. In these cells, TRPM8 activation leads to calcium store depletion and a consequent stimulation of a Store-Operated Calcium current (Thebault et al., 2005). EST's data bank analysis allowed us to find one unannotated EST (accession number: BE274448.1, see table 2) whose sequence matched with that one of the *trpm8* gene. Based on this EST sequence, we carried out PCR experiments to clone this mRNA and then got two different PCR products of 722 bp and 768 bp (Fig. 1A). These amplicons were cloned and sequenced as described in the M&M section, alignment of putative amino acid sequences is presented in the figure 1B.

They were respectively defined as short TRPM8 splice variant α ("sTRPM8 α ", for the 722 bp sequence, accession number: AY532375) and short TRPM8 splice variant β ("sTRPM8 β ", for the 768 bp sequence, accession number: AY532376).

Analysis of genomic sequences revealed that the first exon of the two splice variants corresponds to exon 3 of the *trpm8* gene – which is skipped in the classical TRPM8 mRNA (Fig. 1C). This analysis revealed that the sTRPM8 splice variants could likely be transcribed from an alternate promoter – upstream to the third exon. In addition, the last exon (exon 7) of the two transcripts is composed by the sequence include in TRPM8 – now referred as exon 7a – and the partial following sequence of intron 7 – now referred as exon 7b. A change in splicing sites recognition which prevents to use the donor site of splicing at the end of exon 7a, will likely trigger integration of exon 7b. This latter contains a premature stop codon responsible for termination of the short TRPM8 protein isoforms. Finally, the sole difference between the two short TRPM8 splices is the presence of a premature splicing acceptor site in intron 4 which generates an insertion of 46 bp in the sTRPM8 β transcript. As reported in the figure 1C, we defined the parts of exon 5 as exon 5a (specific of sTRPM8 β) and exon 5b (present in TRPM8 and sTRPM8s).

Overexpression of sTRPM8 proteins fused with enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP) in HEK-293 cells, confirmed that each splice variants encoded for proteins. Surprisingly, the protein patterns and sizes were not the expected ones. Indeed, figure 1D shows that sTRPM8 α encodes for two proteins: the expected 46.26 kDa and a further 33.55 kDa protein, while sTRPM8 β mainly generates the 33.55 kDa fusion protein and weakly the 46 kDa but never the expected 49.35 kDa protein. As depicted in figure

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

1C, we concluded that both the first and third ATG codon (respectively in exon 5b and 7a) were functional in splice variant α and initiated translation of a 18.66 kDa protein ($54 \pm 5\%$ of sTRPM8 isoforms, $n=5$) and a smaller 5.94 kDa protein ($46 \pm 5\%$ of sTRPM8 isoforms, $n=5$). Surprisingly, in sTRPM8 β splice variant only the fourth ATG codon (exon 7A) was significantly functional and initiate translation of the 5.94 kDa ($96 \pm 12\%$ of sTRPM8 isoforms, $n=5$), while the 18,66 kDa protein was weakly expressed ($4 \pm 3\%$ of sTRPM8 isoforms, $n=5$). We therefore postulated that insertion of exon 5a induced skipping of the first functional ATG codon in exon 5b, and thus inhibited the translation of 18 kDa sTRPM8 (Fig. 1C). Such mechanism of protein splicing is well known and should be considered as essential for generation of short TRP isoforms.

In view of such a complex pattern of expression, we will refer to each sTRPM8 protein isoform as sTRPM8-6 and sTRPM8-18, though sTRPM8 splice variants will be referred as sTRPM8 α or sTRPM8 β . Furthermore, we will assume that sTRPM8 β splice variant encode only for sTRPM8-6 isoform as expression level of sTRPM8-18 isoform is virtually undetectable with western-blot experiments.

Short TRPM8 splice variants present a wider expression that the full length TRPM8 channel.

ESTs databank screening revealed expression of either sole sTRPM8 β or both sTRPM8- α and - β in colon tumour, melanoma, prostate and an adenocarcinoma cell line from endometrium (Table 1). Comparatively, full length TRPM8 was also detected in lung small cell carcinoma, choriocarcinoma, and normal liver. Because of the ESTs location in the *trpm8* genomic sequence, distinguished expressions of sTRPM8s were not possible in these samples.

To validate sTRPM8s expression fingerprints, we carried out a series of PCR experiments using a couple of primers encompassing exon 5a (Fig. 2.A, bottom). Each experiment reports a comparative detection of sTRPM8 α/β with classical TRPM8. sTRPM8 α (266 bp) was expressed in 3 prostate cancer cell lines (LNCaP, DU-145 and PC-3) and in Primary Cultured Prostate Epithelial cells (PrPE), whereas sTRPM8 β (312 bp) was restrained to the LNCaP cell line and PrPE (Fig. 2A, Top). No signal has been detected in either liver cell lines (Huh-7, HepG2) or endothelial cell line (Huvec). Surprisingly, both TRPM8 and sTRPM8 β were present in the human glioblastoma cell line MO59K (Fig 2B).

We also extended sTRPM8s expression fingerprints to tissue analysis. As illustrated partially in the figure 2C, we detected TRPM8 mRNA in 6 Benign Prostate Hyperplasia (BPH) and in 5 Prostate Cancers (PCa) as well. Interestingly, TRPM8 was also present in normal Breast (2 samples) but not in normal liver, heart, cerebellum and cortex. Finally, we detected sTRPM8 β in two PCa, suggesting that sTRPM8 β expression could specifically appear in prostate cells while carcinogenesis develops.

Taking into account that the sTRPM8 splice variants were expressed in androgen-dependent LNCaP cell line and that TRPM8 has been demonstrated to be highly dependent on androgens and androgen receptor (AR) expression (Bidaux et al., 2005; Henshall et al., 2003), we checked whether TRPM8 and sTRPM8 were expressed in androgen-independent AR-positive LNCaP C4-2 cell line. Figure 2D shows that, although TRPM8 expression was equal in both cell lines, sTRPM8- α and - β expression was higher in LNCaP C4-2 cells. Finally, we compared ratio of TRPM8/[sTRPM8 α + sTRPM8 β] expressions in randomly selected biopsies from human patients suspected for PCa (Fig. 2E).

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

Interestingly, semi-quantitative analysis discriminated the existence of two distinct populations. The first one presented a [TRPM8/sTRPM8] ratio of 1.43 ± 0.47 closed to that in LNCaP C4-2 of 1.40 ± 0.93 , and the second population showed a ratio of 3.74 ± 1.20 closed to that in LNCaP cells was 4.77 ± 0.80 . These data confirmed that strong variations of TRPM8/sTRPM8 ratio are physiologically relevant and could play a role in carcinogenesis.

Short TRPM8 isoforms can form multimers and interact with TRPM8 channel.

Quaternary structures of sTRPM8-6 and sTRPM8-18 proteins were studied by modifying denaturing conditions of western-blot. sTRPM8-6 isoform was characterized as a monomer whatever the temperature of denaturation, while sTRPM8-18 was detected as a monomer when samples were heated at 95°C (Fig. 3A, left panels) – suggesting that sTRPM8-18 formed complex structures. When heating samples at 95°C , a further band slightly lower than 95 kDa was detected with anti-eGFP antibody. According to its apparent size, we concluded sTRPM8-18 isoform could likely formed homodimers (intended to 92 kDa). Therefore, we checked influence of disulfide bonds on sTRPM8s multimerization by removing DiThioThreitol (DTT) from loading buffer. Comparison of half-denaturing *V*s denaturing conditions demonstrated that reduction of disulfide bonds decrease by 2 times intensity of 92 kDa complex and increase by 2.5 times detection of 46 kDa protein (Fig. 3A, right panel). Taken together, these results confirmed that the 92 kDa band may correspond to a dimer of sTRPM8-18 protein.

Afterwards, we carried out coimmunoprecipitation experiments and Fluorescence resonance Energy Transfer (FRET) analysis in order to studied hypothetical interaction between TRPM8 and its short isoforms. As depicted in figure 3B, none of sTRPM8 isoforms were detected as TRPM8 was precipitated,

whatever the temperature of denaturation was. This result differs from what has been previously reported about TRPC2 and its short isoform. Nevertheless, it only suggests that there are no strong bindings between YFP/CFP-fused sTRPM8 isoforms and TRPM8 channel. Therefore, using FRET confocale analysis, we studied the proximity between sTRPM8 and TRPM8 in living cells in order to check whether sTRPM8s and TRPM8 could interact in vivo by weak electrostatic interactions.

LNCaP cells were cotransfected with different couple of plasmids encoding sTRPM8s fused with either eYFP or eCFP: [sTRPM8 α -YFP/sTRPM8 α -CFP]; [sTRPM8 β -YFP/sTRPM8 β -CFP]; [TRPM8-YFP/sTRPM8 α -CFP] and reversed fusion proteins; as well as [TRPM8-YFP/sTRPM8 β -CFP] and reversed fusion proteins. Co-localization of each fluorescent protein couples is presented on figure 3C. Single cell relative fluorescence intensities were calculated and then average for FRET positive cells. Cotransfected cells with both YFP and CFP encoding vector were used as negative control (Fig. 3D). [sTRPM8 α -YFP/sTRPM8 α -CFP]- and [sTRPM8 β -YFP/sTRPM8 β -CFP]-transfected cells showed a FRET efficiency of respectively $11.25 \pm 5.85\%$ and $11.85 \pm 3.6\%$. However the percentages of FRET positive cells were significantly different: 85.71% for sTRPM8 α -transfected cells and 36.66% for sTRPM8 β -transfected cells. These data confirmed the ability of sTRPM8-18 isoforms to multimerize (>50% of isoform synthesized from sTRPM8 α splice variant), and unexpectedly suggested an analogous mechanism for sTRPM8-6 (>96% of isoform synthesized from sTRPM8 β splice variant). However, sTRPM8-6 proteins could likely produce FRET whether it aggregates by anchoring to a partner protein like endogenous TRPM8 channel. Therefore, we measured sTRPM8s and TRPM8 proximity into LNCaP cells.

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

Experiments were performed with each couple of CFP/YFP-fused proteins as described in M&M. Data analysis demonstrated that 64.71% TRPM8/sTRPM8 α -transfected cells showed a FRET efficiency of $12.34 \pm 4.41\%$, while 57.90% of TRPM8/sTRPM8 β -transfected cells displayed a FRET efficiency of $12.17 \pm 5.39\%$ (Fig. 3D).

These data gave strong evidence that even without strong physical interaction, sTRPM8-18 and/or sTRPM8-6 are very close to the C-terminus of TRPM8 in living cells and could maybe bind to TRPM8 through weak electrostatic interactions. Furthermore, we proposed that the sTRPM8-6 isoform is coupled to the C-terminus of TRPM8 channel as a monomer, though the sTRPM8-18 isoform multimerizes itself and interacts with C-terminus of TRPM8. Thus, we hypothesized that, according to their structural features, both sTRPM8 isoforms would have different functions.

In order to carry out electrophysiological experiments, we developed three HEK cell lines stably expressing a tetracycline-inducible TRPM8 protein: the first having integrated an empty pcDNA3 vector (define as HEK-M8/Ctrl), the second constitutively expressing the sTRPM8 α splice variant (define as HEK-M8/sM8 α), and the third constitutively expressing the sTRPM8 β splice variant (define as HEK-M8/sM8 β). PCR screening of cellular clones is presented in Supplement data 1A. Tetracycline-induced expression of TRPM8 in each cell lines is reported in Supplement data 1B. Nevertheless, to avoid any kind of deregulations in our models, all the following experiments have been checked in HEK-293 cells transitory transfected with either sTRPM8 α or sTRPM8 β encoding vector.

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 channel activity and define its responsiveness to menthol and cold.

By using a combination of electrophysiology and calcium imaging, we aimed to characterize the probable regulation of classical TRPM8 channel activity by short TRPM8 isoforms. TRPM8 has been described as the cold receptor in sensory neurons (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002) and has been shown to be specifically activated by cool temperature ($< 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) and by chemical compounds evoking the sensation of cold, like menthol, icilin or derivatives (Beck et al., 2006). As TRPM8 is a non selective cationic channel, its activation induces a cytoplasm calcium rise detectable by FURA-2, a classical calcium specific dye. Hence, stimulation of HEK-TRPM8 cells by menthol or icilin induced a cytoplasmic calcium increase (Fig. 4A). This calcium rise was modified by short TRPM8 isoforms expression. Indeed, the transfection of sTRPM8 α or sTRPM8 β splices variants decreased menthol evoked calcium entry (Fig. 4A upper layouts). However, icilin activated calcium entry was not modified by sTRPM8 β expression but was slightly decreased by sTRPM8 α (Fig. 4A bottom layouts, $n=90/\text{condition}$).

In patch-clamp experiments, application of cold (21°C), menthol ($500\mu\text{M}$) and icilin ($10\mu\text{M}$), on HEK-M8/Ctrl cells, by extracellular perfusion, induced activation of TRPM8 current (Fig. 4B). Analysis of the current-potential relationship shows that TRPM8 current is characterized by an outward rectification and a reversing potential close to 0 mV (Fig. 4B as an inset). It is important to note that menthol and cold (21°C) induced large TRPM8 currents (respectively 236 ± 30.9 and $222.9 \pm 4.1\text{ pA/pF}$ at $+100\text{mV}$) while icilin activated a much lower currents in the same experimental conditions ($94.5 \pm 10.3\text{ pA/pF}$). Transfection of HEK-TRPM8 with sTRPM8 β resulted in an inhibition of both cold- and menthol- evoked current, while icilin activated current was apparently not altered (Fig. 4C and 4D).

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

Intriguingly, in HEK-M8/sM8 β cells, the resting cold- and menthol- currents displayed almost the same amplitudes (respectively 106.6 ± 13.5 and 126.7 ± 6.1 pA/pF at +100mV) as non-altered icilin current (92.7 ± 17.3 pA/pF at +100mV). The expression of sTRPM8 α also induced an inhibition of TRPM8 channel (Fig. 4E). Nevertheless, we clearly distinguished two equal populations in HEK-M8/sM8 α cells. Almost in the 50% of the cells cold-, menthol- and icilin- induced currents were inhibited (50.8 ± 6.9 ; 45.5 ± 7.7 ; 97.4 ± 28.3 pA/pF, n=5/9) compared to the control conditions (156.9 ± 21.8 ; 81.4 ± 18.8 ; 189.5 ± 27.3 pA/pF, n=10). In the second population of HEK-M8/sM8 α cells, cold- and menthol- induced currents were inhibited (102.6 ± 7.9 and 107.7 ± 19.8 pA/pF, n=4/9), but the icilin-induced current was not altered (98.3 ± 12.6 pA/pF, as in the case of HEK-M8/sM8 β cells, Fig. 4E). These observations were consistent with the expression pattern of sTRPM8-6 and sTRPM8-18 proteins (Figures). Finally, we checked whether short sTRPM8 isoforms expression could affect TRPM8 protein expression and/or TRPM8 translocation to the plasma membrane. Our results show that sTRPM8 isoforms do not interfere with full length TRPM8 channel expression on plasmalemma (Fig. 4F).

In order to determine whether the ratio of sTRPM8 isoform on classical TRPM8 proteins expression could modify TRPM8 current, we have studied the dose dependence of sTRPM8 isoforms. Our results clearly show that the ratio of sTRPM8/TRPM8 proteins determines the modulation of TRPM8 channel activity. Indeed, the higher dose of TRPM8 isoform cDNA ($6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) induced more pronounced inhibitory effect on menthol induced calcium entry than $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ cDNA [respectively 79 ± 2.3 and 56.2 ± 4 %; (Fig. 5A)]. However, a small amount of sTRPM8 β did not modify icilin evoked

calcium rise, while a stronger expression even potentiated (141.2 ± 12.3 % of control) icilin induced calcium entry (Fig. 5B). This crucial difference in the dose-dependence of the effect of sTRPM8 β expression on the menthol- and icilin- induced calcium entries in HEK-TRPM8 cells (Fig. 5C) was confirmed by patch clamp recordings performed on the same samples (Fig. 5D). A strong expression of sTRPM8 β decreased both Menthol- and cold- induced TRPM8 current by 80% whereas the icilin evoked current was increased by 50% (Fig. 5D). Thus, TRPM8 isoforms do not act like dominant negatives of full length TRPM8 channel but as regulatory subunits affecting TRPM8 channel functioning in a ratio (sTRPM8/TRPM8) dependent manner.

Insights into the TRPM8 single channel gating mechanism and its modulation by the short TRPM8 isoforms.

The complete understanding of exactly how short TRPM8 isoforms might inhibit the current flow through the full-length channel ultimately required the analysis of the elementary channel events. Indeed, only single channel analysis allows the discrimination between the channel pore occlusion and channel open probability (P_o) decrease as the two main possible causes of the above described alterations in the whole-cell current amplitude and Ca^{2+} influx (assuming of course that the number of channels, N , remains the same, that is that the channels are otherwise normally expressed, see evidence described above).

Single channel recordings revealed a dramatic decrease of the TRPM8 activity when the short TRPM8 isoforms were co-expressed, as illustrated in Fig. 6A. In control cells multiple channel openings were usually observed with equally spaced amplitude levels (i.e., the openings were generated by the same channel type). In contrast, with the short isoforms typically only single, and occasionally double,

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

channel openings were observed. Considerable reduction of the frequency of the channel openings can also be visualised in Fig. 6A. Importantly, unitary conductance was preserved (Fig. 6B) indicating that the short TRPM8 isoforms did not cause any hindrance of the ion permeation pathway.

Afterwards, we therefore focused on the channel kinetics as its alteration appeared to be the only cause of the current inhibition by the short TRPM8 isoforms. Despite intensive studies of TRPM8 function in recent years the channel gating scheme remains unknown. To address this question, we examined dwell times in patches which showed only single openings suggestive of the presence of just one channel. This is especially important for the correct interpretation of the distribution of the shut intervals ((Colquhoun & Hawkes, 1995). One such example is illustrated in Fig. 6C, top.

Quantitatively, the probability of such runs (20 in total) of single openings if there were actually two channels present can be estimated according to the equation given by (Colquhoun & Hawkes, 1995):

$$P(r \geq n_o) = \pi^{n_o-1} \quad (1)$$

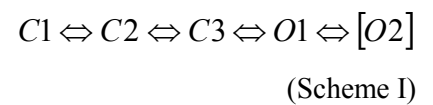
where $\pi = \frac{1 - P_{open}}{1 - P_{open}/2}$, and n_o is the number of single openings. In this example P_{open} was 0.123; therefore 500 single openings would ascertain the probability of more than one channel present of the order 10^{-15} (in fact, in this case 5306 single openings were observed).

Open dwell times were distributed monoexponentially with the mean open time of about 0.5 ms. Importantly, the M8 α and M8 β isoforms did not alter the mean open time of the TRPM8 channel (Fig. 6C bottom and Fig. 6F).

Notably, channel openings were frequently grouped in bursts (Fig. 6C), which strongly suggested

the existence of more than one closed state of the channel. Indeed, the shut time distributions consistently required three exponential components for the best fit (Fig. 6D, top, shown by the superimposed smooth lines with separate components plotted as filled areas). Thus, at least three closed states exist (designated short C1, intermediate C2, and long C3 closed states).

Summarizing these findings, the minimal reaction scheme of the TRPM8 channel may be represented as:



The rightmost long open state O2 is shown in brackets as it mainly occurs during the TRPM8 activation via temperature-independent biochemical pathway Ca^{2+} store depletion/iPLA₂/lysophospholipids (LPLs), but does not make any significant contribution to cold- or voltage-dependent channel activation (Vanden Abeele *et al*, JBC, accepted for publication). The mean closed times were as following: C1 - 0.33±0.04 ms, C2 - 2.15±0.24 ms, and C3 - 39.3±9.0 ms (n=4). This scheme is likely incomplete since much longer shittings also occurred (e.g., 5th trace in Fig. 6C, top), probably indicating the existence of a desensitized state (it might be connected to the O1 state), but the number of such events was insufficient for analysis.

The short TRPM8 isoforms profoundly affected the distribution of closed durations as illustrated in Fig. 6D, bottom, for the TRPM8 β isoform. The most striking effect was the shift from the dominance of the C1 and C2 components in control (86% of all shittings) towards the prevalence of the C3 component with the short isoform (61%, shown in white). The mean C3 durations also somewhat increased to 87.6±32.5 ms (M8 α , n=6) and

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

62.7±11.1 ms (M8β, n=11), but this trend did not reach statistical significance.

Fig. 6E,F summarize the single channel results by showing that short TRPM8 isoforms caused significant reduction in both NPo and the frequency of channel openings (Fig. 6E) accompanied by an increase in the relative number of long shuttings without any detectable change of the channel mean open time (Fig. 6F). Thus, our single channel experiments have established that the decrease in the frequency of channel openings was the main mechanism of the channel inhibition by the short TRPM8 isoforms, while the shift of the channel gating towards the “deepest” closed state C3 was the underlying cause of this effect. It is intriguing, that such shift of gating takes it away from the longest O2 state (Scheme I), the occurrence of which we have recently implicated as the mechanism of the TRPM8 activation at the physiological temperature (Vanden Abeele F *et al*, JBC, accepted for publication).

To further our investigations on sTRPM8 isoforms we then focused on HEK-M8/sTRPM8β cells that mostly express classical TRPM8 and sTRPM8-6 protein. This way we aimed to determine the mechanism of inhibition related to sTRPM8-6 proteins.

Short TRPM8 isoforms modify the voltage-sensitivity of TRPM8 channels which in turn decrease the open probability of the channel.

A recent study has demonstrated that TRPM8, like TRPM4 and TRPV1 channels, is activated by a mechanism resulting in a shift of the channel voltage-dependent activation curve (Voets et al., 2004). We have therefore studied whether short TRPM8 isoforms influence such characteristic for TRPM8 channel voltage dependence. HEK-M8/Ctrl, HEK-M8/sM8α and HEK-M8/sM8β cells were stimulated with a tail current protocol (Fig. 7A). Then, by fitting the

activation curve of the current by a sigmoid Boltzmann relationship (equation (1)), we could measure the $V_{1/2}$, the potential of half-maximal activation (Fig. 7B) and compare its value depending on TRPM8 activation and depending on sTRPM8β expression, as summarized in figure 7C.

$$(1) \quad I_{TAIL} = I_{MAX} / (1 + \exp(-(V - V_{1/2})/s))$$

Where s ($s=R.T/z.F$) is the slope factor and z is the valence of the gating charge. Hence, by normalizing the tail current amplitude by the maximal current value (equation (2)), we could calculate the apparent open probability (P_0) of the TRPM8 channel obtained from tail current measurements (Fig. 7D and D).

$$(2) \quad P_0 = I_{TAIL} / I_{MAX} = 1 / (1 + \exp(-(V - V_{1/2})/s))$$

The analysis of the $V_{1/2}$ values in HEH-TRPM8/sM8β cells showed that sTRPM8-6 small isoform induces a rightward shift of the $V_{1/2}$ value of menthol evoked current from 47 ± 9.9 mV (in HEH-TRPM8/Ctrl) to 94.1 ± 9.9 mV (Fig. 7B and 7C). The same result was obtained for cold-activated TRPM8 current but, in accordance with our previous results, sTRPM8β expression did not influence the icilin-evoked TRPM8 current. Indeed, the $V_{1/2}$ value of the icilin-induced TRPM8 current was shifted from 115 ± 8.4 mV in HEK-TRPM8/Ctrl to 80.5 ± 7.8 mV in HEK-TRPM8/sM8β. The shift of the $V_{1/2}$ toward positive values induced by sTRPM8 expression for menthol- and cold- evoked current, led to the decrease of the apparent open probability at physiological potentials (Fig. 7D). These open probabilities of cold- and menthol- induced currents were divided by a factor three, at -40mV, while icilin activated current open probability was increased by 30% (Fig. 7E). Although we found that at least three closed states exist in the TRPM8 gating mechanism (Fig.

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

6D), for calculating the interstate transition energies we used a simplified two-state model which remains valid on the assumption that only one step with the steepest temperature

dependence is rate-limiting as suggested by Voets et al., (Voets et al., 2004). This allows condensing the three closed states in one.

Afterwards, we calculated the opening (α) and closing (β) rates of TRPM8 channel. To do so, we measured the monoexponential time constant (τ) of activation / deactivation of TRPM8 current as well as the steady state open probability (P_o) (equation 3).

$$(3) \quad \alpha = P_o/\tau \text{ and } \beta = (1 - P_o)/\tau$$

Then, using Arrhenius's law (equation 4), we determined the energy of activation of TRPM8 opening ($E_{a, OPEN}$).

$$(4) \quad \ln(\text{rate}) = A - (E_{a, \text{rate}} / RT)$$

The opening rate α was characterized by an activation energy ($E_{a, OPEN}$) value of 52.37 kJ.mol⁻¹. The closing rate energy activation was much larger 267.00 kJ.mol⁻¹ suggesting that channel's closing is more temperature sensitive (n=18, Fig. 7F). These values were consistent with those reported in previous studies (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004). We then measured the same parameters in cells expressing sTRPM8-6 and found that both rate activation energies were significantly decreased compared to control conditions (with respectively $E_{a, OPEN}$ = 34.98 kJ.mol⁻¹ and $E_{a, CLOSE}$ = 156.92 kJ.mol⁻¹, n=12). This suggests that sTRPM8-6 proteins modify plasmalemmal TRPM8 channel sensitivity to cold. Indeed, we determined that α and β rates are equal at 31.3°C in classical TRPM8 expressing cells while, in sTRPM8-6/TRPM8 coexpressing cells, these rates reach the same values for lower temperature (27.4°C)

indicating that TRPM8 channels need cooler temperature to get the same activity. According to the thermodynamic model for thermo-activated TRP channels, cold receptor TRPM8 is defined by $E_{a, CLOSE} \gg E_{a, OPEN}$. Here, we demonstrated that sTRPM8-6 expression decrease the ratio [$E_{a, CLOSE} / E_{a, OPEN}$] of TRPM8 channel from 5,1 to 4,49 and thus slightly decrease the cold-sensitivity of the TRPM8 channel.

Discussion

In this study, we have identified and characterized two new short splice variants, N-terminal fragments of TRPM8 channel: sTRPM8 α and sTRPM8 β . We demonstrated that these isoforms are not just a degradation product or miss-transcription mRNA but encode for functional proteins playing a key role in the regulation of TRPM8 channel and cell physiology.

We report that the sTRPM8 α splice variant encodes for a 6 and a 18 kDa sTRPM8 isoforms, while the sTRPM8 β splice variant encodes for the sole sTRPM8-6 isoform. The most intriguing point in studying sTRPM8 isoforms generation is that it involves both RNA and protein splicing. Indeed, both splice variants are likely generated by an internal promoter localized in intron 2, and are differentially spliced. Compared to the classical TRPM8 mRNA, both sTRPM8 mRNA present insertion of exon 7b which is generated by alternative splicing. Furthermore, we propose that sTRPM8 β splice is generated by a decreased recruitment of exon 5b acceptor site of splicing by spliceosome in favour of an upstream acceptor site located in exon 5a. This result implies that the modulations in spliceosome composition are intended to the shift synthesis of sTRPM8 α to sTRPM8 β mRNA.

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

Generation of different sTRPM8 isoforms, from mRNA sharing a strong homology, involved different mechanisms due to presence of different functional ATG codons and modulation of their utilization by ribosome as initiation point of translation. We report that sTRPM8 α splice has two different ATG codons which are used at same frequency by ribosome. Surprisingly, these two starting codons are also present in TRPM8 mRNA. However, alternative TRPM8 proteins have never been reported so far. We presume that the first ATG codon of the TRPM8 sequence has a stronger KOZAK sequence and then monopolizes ribosomal activity. Finally, we show that sTRPM8 β splice generates sTRPM8-6 isoform only. We assume that insertion of exon 5a (which includes a non functional ATG codon) could generate the splicing of the second ATG used to initiate sTRPM8-18 isoform translation. This mechanism is known for many years in bacterias and yeasts, and has also been described in mammalian cells as protein splicing.

These data emphasise the fact that genetic regulations of the TRP genes and diversity of the related proteins are at least as complex as the diversity of the activation/regulation mechanisms ruling out TRP channels gating. Obviously, the story becomes more fascinating when we study generation of multiple isoforms and their functional roles, in the same time.

Function of TRPM8 channel as cold and menthol receptor is well documented and a mechanism for thermosensation has been proposed (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004). Basically, TRPM8 acts as a thermodynamical sensor which conformation shifts from closed to open state as soon as the cooling changes the stability of the channel in the closed state. Voets *et al* have described that the closed rate of the closed-to-open transition is highly thermo-dependent (Voets et al., 2004) due to the high

activation energy required for this transition. It is therefore of great importance to note that the thermo-sensitive domain of TRPM8 is located on the C-terminus, which is also important but not sufficient for menthol-induced full activity of TRPM8 (Brauchi et al., 2006). Here, we demonstrate that the sTRPM8-6 isoform drastically reduces both menthol- and cold-induced current. We also report that sTRPM8-6 interact with the C-terminus of the TRPM8 channel.

Taken together, these data imply (?) that sTRPM8-6 interferes with the C-terminus of classical TRPM8 which will decrease the open probability of the channel. Since we detected neither variation of menthol EC₅₀ nor a strong shift of T_{1/2}(°C) (not illustrated), we suggest that sTRPM8-6 does not directly compete with the thermosensor or a putative menthol binding domain on the channel. Besides, our data show that the proportion of sTRPM8-6 on TRPM8 directly define the inhibitory power of sTRPM8-6. Finally, we show that the equilibrium of the closed-to-open transition was reached at 31°C for wild type TRPM8, whereas it was reached at about 27°C when sTRPM8-6 was coexpressed. This could indicate that the stability of the channel closed conformation is increased by interaction with sTRPM8-6. More energy is therefore needed to trigger the transition to the open conformation. And as the mean open time of the TRPM8 current did not changed, we can assume that the kinetics of the closing stayed unchanged. This hypothesis is strengthened by the analysis of the voltage-dependency of the open probability. Indeed, we demonstrated that sTRPM8-6 decreases the voltage-sensitivity of TRPM8 activated by menthol or temperature. Nevertheless, the voltage-dependent shift of the open probability was stable when activating TRPM8 with icilin whatever sTRPM8-6 was expressed or not. These data suggest that the channel

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

did not really lose its voltage-dependence, but has become more stable in the closed conformation. Finally, the C-terminus of TRPM8 has been demonstrated to be involved in PIP2 sensation which is essential for TRPM8 activity (Brauchi et al., 2006; Rohacs et al., 2005). Indeed, PIP2 depletion triggers a dramatic decrease of TRPM8 open probability. Besides, cooling is known to sensitize TRPM8 to PIP2. Therefore, it has been proposed that cooling and menthol induced increasing interaction of the C-terminus with PIP2 which lead to TRPM8 activation. Nevertheless, PIP2 is regulating menthol, temperature and icilin activation of TRPM8. Besides, TRPM8 activation by PIP2 also leads to a shift of the voltage-dependence of TRPM8 toward more negative potential. Therefore, we think sTRPM8-6 isoform does not interfere with PIP2 sensitivity, but acts by stabilizing the channel.

One of the tremendous questions resulting from our data is the importance of the short isoforms in the control of thermosensation. Low-threshold (>25°C) and high-threshold (<25°C) cold-activated neurones have been shown to express different levels of TRPM8 mRNA and displayed two different kinetics of calcium entry (Kobayashi et al., 2005; Nealen et al., 2003; Thut et al., 2003). However, no clear evidence has been shown to explain the mechanisms defining these two thresholds. According to our results, expression of sTRPM8-6 isoform in these neurones could explain this decreased temperature sensitivity of TRPM8. Indeed, sTRPM8-6 expression would increase the cold threshold to which TRPM8 activity would induce the threshold depolarisation triggering the generation of an action potential (de la Pena et al., 2005). In summary, sTRPM8-6 could be involved in generation of more accurate cold-sensitive neurones.

We have previously reported that TRPM8 functions as an endoplasmic reticulum channel where it triggers calcium store depletion and, consequently, activation of store-operated channels in the LNCaP cell line (Thebault et al., 2005). In the present study, we demonstrated the existence of two different populations discriminated by their ratio of TRPM8/sTRPM8 mRNA. sTRPM8-6 isoform expression could likely be involved in the regulation of TRPM8 activity in the endoplasmic reticulum membranes. Thus, sTRPM8-6 could modulate the endoplasmic calcium release and the subsequent capacitative calcium entry. It has been suggested that TRPM8 regulates prostate cell survival (Zhang and Barritt, 2004). Therefore, we hypothesize that the proportion of specific sTRPM8-6 or sTRPM8-18 on TRPM8 proteins expression may modify cell survival and then could be deregulated in prostate cancer cells.

Experimental procedures

Cell culture. LNCaP cells (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) from the American Type Culture Collection (ATCC) and LNCaP C4-2 (generous gift from Dr. F. Cabon, Paris). The HEK-M8 cell line: “Human Embryonic Kidney cell line intergating Tetracycline repressor encoding vector (pcDNA6.TR®, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and TRPM8 encoding vector (pcDNA4.TO.A®, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was realized as described elsewhere (Thebault et al., 2005). This cell line was cultured in Dulbecco’s minimal essential medium (DMEM) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum and Kanamycin (100 µg/ml). TRPM8 induction was complete with 1 µg/ml tetracycline in the culture medium.

Generation of stable sTRPM8 cell lines. HEK-M8 cell line was transfected with either

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

sTRPM8 α /pcDNA3 or sTRPM8 β /pcDNA3 as reported in “transient expression studies”. Cells were subjected to G418 selection (600 μ g/ml) during two weeks. Clones were then sub-cloned and checked for sTRPM8 mRNA expression with PCR experiments.

Transient expression studies. Transfection of HEK-M8 cells with Geneporter 2 (Genetherapy systems) have been reported previously in (Thebault et al., 2005).

Analysis of TRPM8 and sTRPM8 α / β mRNA expression. Total RNA was isolated using the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction procedure (Chomczynski and Sacchi, 1987). After a DNase I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) treatment, 2 μ g total RNA was reverse transcribed into cDNA at 42°C using random hexamer primers (Perkin Elmer) and MuLV reverse transcriptase (Perkin Elmer), and followed by PCR as described below. The PCR primers used for each experiment are listed in the table 1. PCR was performed by adding 1 μ l RT template to a mixture of (final concentrations): 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 250 nM forward and reverse primers, and 1 U AmpliTaq Gold (Perkin Elmer), in a final volume of 25 μ l. DNA amplification conditions included an initial 5 min denaturation step at 95° C, followed from 27 to 40 cycles (depending of the gene of interest) of 30 sec at 95° C, 30 sec at 58° C, 40 sec at 72° C, and finally 5 min at 72° C. Semi-quantitative PCR assays were carried out under non-saturating conditions: 35 cycles for TRPM8 and 27 cycles for β -actin. Then, density was measured using “quantity one” software (Biorad).

Cloning of sTRPM8 α / β . Specific primers were designed referring to BE274448.1 EST sequence and used to amplify cDNA with Taq Gold polymerase from LNCaP mRNA prepared as described above. Amplicons were ligated in pcR2.1 Topo® vector (ref,

Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After PCR screening, clones were subjected to sequencing. Both TRPM8 splice variants were then inserted in either pcDNA3 (Invitrogen) for generation of stably expressing HEK cells; or in pTracer/EF/V5 (Promega) in order to detect transfected cells for electrophysiological experiments only on transfected cells; or fused in frame in pEYFP-N1 or pECFP-N1 (Clontek) to carry out FRET and western-blot experiment. Each construct were subjected to sequencing in order to check integrity of open reading frames.

Western-blot experiments. Total protein extraction and SDS-page electrophoresis were performed as describe elsewhere (Vanden Abeele et al., 2006). After electrophoresis, proteins were transferred on either a nitrocellulose membrane (sTRPM8 isoforms) or PVDF membrane (full length TRPM8 proteins) using a semi-dry electroblotter (Bio-Rad). Membranes were first blocked in 5% donkey serum plus 5% TNT-milk (15 mM Tris buffer pH 8, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and 5% non-fat dry milk, final adjust pH: 7.2) for 1 hour at room temperature, then soaked in primary antibody 1/2000 anti-TRPM8ab antibody (Abcam), 1/1000 anti-GFP (Abcam), and 1/500 anti-actin (Neomarkers) in 2,5% TNT-milk overnight at +4°C. After three washes in TNT (about 1 hour), the strips were transferred into anti-miceIgG horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Chemicon), diluted in TNT-milk (1/20000) for 1 hour. After three 10-minute washes in TNT, the strips were processed for chemiluminescent detection using Supersignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce, Chemical Company, Rockford, IL) according to the manufacturer’s instructions. The blots were then exposed to X-Omat AR films (Eastman Kodak Company).

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

Immunoprecipitation. After total protein extraction, 800 μg of protein were mixed with 20 μl of Protein A/G Plus-Agarose beads (Santa Cruz Technology), 1 μg of monoclonal anti-His antibody (Invitrogen) in 1 mL of $\text{PO}_4\text{Na}_2/\text{K}$ buffer and incubated on a wheel at $+4^\circ\text{C}$ overnight. After 3 washes with a PBS solution, beads were resuspended in 50 μL of Laemmli buffer and then heated at 37°C or 95°C for 5 minutes. Proteins were then subjected to western-blot experiment.

Biotinylation assay. Cells were grown in 75 mm^2 flask until 90% confluency. Biotinylation of cell surface protein were performed with Pinpoint™ Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce) as described by the manufacturer. Briefly, cell surface proteins were labelled with Sulfo-NHS-SS-Biotin before prior Neutravidin-affinity purification on column. Purified proteins were then analysed with western-blot experiment using appropriate antibody.

FRET experiments and confocale imaging. Using nucleofector technology (Amaxa), LNCaP cells were nucleofected with appropriate couple of vectors encoding for eYFP or eCFP chimera. FRET experiments were performed on either alive cells or cells fixed with 4% formaldehyde as described in (Vanden Abeele et al., 2006). Confocal imaging experiments were performed using a confocal laser scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss MicroImaging, Inc) and a plan-Apochromat $40\times/1.3$ NA oil immersion objective. YFP and CFP fluorescence were excited by respectively the 458 and the 514-nm lines of a 20 mW argon ion laser and emitted fluorescence was respectively filtered with a By Pass 475-525 and a Long Pass 530. FRET channel was excited at 458 nm and emitted fluorescence was filtered up to 530 nm. FRET line was used to confirm specific FRET decrease after YFP photobleaching. To avoid any significant acceptor bleach and to

compensate the quantum yield of each fluorescent protein, the 514 nm laser line was typically about threefold weaker than the 458 nm laser line. For each cell group, at least 10 FRET-positive cells were analysed with LSM software. The results are presented as relative intensity $\Delta F = (\text{I}_{\text{max}} - \text{I}_{\text{min}}) / \text{I}_{\text{max}}$; FRET efficiency is represented by ΔF_{CFP} . Negative control has been performed on CFP/YFP transfected cells. [TRPM8-eYFP/sTRPM8 α -eCFP] and [TRPM8-eCFP/sTRPM8 α -eYFP] transfected cells presented the same FRET intensities; [TRPM8-eYFP/sTRPM8 α -eCFP] and [TRPM8-eCFP/sTRPM8 α -eYFP] as well. Thus, they have been averaged under respectively “TRPM8-eCFP/sTRPM8 α -eYFP” denomination and “TRPM8-eCFP/sTRPM8 α -eYFP” denomination.

Electrophysiology, solutions and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements. Membrane currents in HEK cells were recorded in the whole-cell configuration using the patch-clamp technique and a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic, Germany), as previously described (Vanden Abeele et al., 2004). Patch pipettes were made on a P-97 puller (Sutter, USA) from borosilicate glass capillaries (WPI, USA). Patch-pipettes (resistance 3 to 5 $\text{M}\Omega$) were filled with the following solution (in mM): KCl 120, MgCl_2 1, EGTA 4, CaCl_2 2.5 (calculated free Ca^{2+} concentration: 150 nM), HEPES 10, pH adjusted to 7.3 with KOH (osmolality: 305 mosmol/l). Extracellular solution used to record TRPM8 current contained (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 0.3 Na_2HPO_4 , 0.4 KH_2PO_4 , 4 NaHCO_3 , 5 glucose, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with NaOH), osmolality: 330mosmol/l).

Single-channel currents were recorded at room temperature ($22\text{-}25^\circ\text{C}$) using patch pipettes of 5-7 $\text{M}\Omega$ and an Axopatch 200B (Molecular Devices, USA) voltage-clamp amplifier. Cell-attached patches

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

were held at 120 mV relative to the resting potential which was brought close to 0 mV by exposing the cells to 145 mM external K^+ (e.g., in the extracellular solution whereby NaCl was replaced by KCl). Currents were filtered using the 4-pole low pass Bessel filter of the patch-clamp amplifier at 2 kHz and sampled at 10 kHz.

Single channel transitions were identified on the basis of the half-amplitude threshold crossing criteria. A consistent time resolution was imposed on the data by ignoring transitions shorter than 0.1 ms. For unitary amplitude measurements, amplitude histograms were fitted with Gaussian functions. For kinetics analysis, histograms of open and closed durations were constructed conventionally as distributions of the logarithm of duration in ms (20 bins per decade) with exponential components fitted by the method of maximum likelihood (Colquhoun and Hawkes, 1995). The frequency density and fitted functions were plotted after a square root transformation. The number of probability density function components was determined using the automatic “compare models” routine of the pClamp 9 software at the confidence level of 0.99.

Channel activity was expressed as NP_O (where N – the number of channels in the patch and P_O – open probability) determined from idealized traces. For calculating the frequency of channel opening a custom written routine was used to count all transitions towards open state(s) (e.g., irrespective of the level number). This value was then normalised by the trace duration in seconds (typically 30-60 s). Results were expressed as the means \pm standard error of the mean (s.e.m.). Statistical analysis was performed using t test (differences considered significant when $P < 0.05$).

Calcium imaging. Calcium imaging experiments have been performed as described previously (Thebault et al., 2005). Briefly, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was measured

using ratiometric dye FURA-2 and quantified according to Grynkiewicz and Tsien formula (Grynkiewicz et al., 1985). The bath solution contained in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 0.3 Na_2HPO_4 , 0.4 KH_2PO_4 , 4 $NaHCO_3$, 5 glucose, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with NaOH), osmolality 330 mosmol/l).

Data analysis. Each experiment was repeated at least three times and the results were expressed as mean \pm S.D. The data were analysed and graphs plotted using Origin 5.0 software (Microcal, Northampton, MA). InStat3 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA) was used for statistical analysis and the mean values were compared using either unpaired t test with Welch’s corrected test (2 groups) or One-way ANOVA with Dunnett multiple comparison post-test (≥ 3 groups).

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM, Ministère de l’Education Nationale, Ligue Nationale Contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale and Region Nord-Pas-de-Calais.

References

- Amiri, H., Schultz, G., and Schaefer, M. (2003). FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium* 33, 463-470.
- 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*.
- 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, 367-382.

- Brauchi, S., Orío, P., and Latorre, R. (2004). Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15494-15499.
- Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E., and Latorre, R. (2006). A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* *26*, 4835-4840.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.
- Chu, X., Tong, Q., Wozney, J., Zhang, W., Cheung, J. Y., Conrad, K., Mazack, V., Stahl, R., Barber, D. L., and Miller, B. A. (2005). Identification of an N-terminal TRPC2 splice variant which inhibits calcium influx. *Cell Calcium* *37*, 173-182.
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* *426*, 517-524.
- de la Pena, E., Malkia, A., Cabedo, H., Belmonte, C., and Viana, F. (2005). The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *J Physiol* *567*, 415-426.
- Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* *29*, 135-161.
- Dragoni, I., Guida, E., and McIntyre, P. (2006). The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functionally important double cysteine motif. *J Biol Chem*.
- Fang, D., and Setaluri, V. (2000). Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* *279*, 53-61.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* *260*, 3440-3450.
- Henshall, S. M., Afar, D. E., Hiller, J., Horvath, L. G., Quinn, D. I., Rasiah, K. K., Gish, K., Willhite, D., Kench, J. G., Gardiner-Garden, M., *et al.* (2003). Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res* *63*, 4196-4203.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J., and Blumberg, P. M. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* *276*, 28613-28619.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* *493*, 596-606.
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* *416*, 52-58.
- Minke, B. (2006). TRP channels and Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium* *40*, 261-275.
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* *2005*, re3.
- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P. D., and Caterina, M. J. (2003). TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol*.
- Nilius, B., Voets, T., and Peters, J. (2005). TRP channels in disease. *Sci STKE* *2005*, re8.
- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V., and Philipp, S. E. (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* *280*, 22540-22548.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., and Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* *108*, 705-715.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Michailidis, I., and Logothetis, D. E. (2005). PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* *8*, 626-634.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* *29*, 645-655.
- 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. *J Biol Chem* *280*, 39423-39435.

- Thut, P. D., Wrigley, D., and Gold, M. S. (2003). Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience* *119*, 1071-1083.
- Tsavalier, L., Shapero, M. H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* *61*, 3760-3769.
- 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. *J Cell Biol* *174*, 535-546.
- Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J. B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2004). Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* *279*, 30326-30337.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* *430*, 748-754.
- Wehage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jungling, E., Zitt, C., and Luckhoff, A. (2002). Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* *277*, 23150-23156.
- Xu, X. Z., Moebius, F., Gill, D. L., and Montell, C. (2001). Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10692-10697.
- Zhang, L., and Barritt, G. J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* *64*, 8365-8373.
- Zhang, W., Chu, X., Tong, Q., Cheung, J. Y., Conrad, K., Masker, K., and Miller, B. A. (2003). A Novel TRPM2 Isoform Inhibits Calcium Influx and Susceptibility to Cell Death. *J Biol Chem* *278*, 16222-16229.

Legends

Figure 1.

Cloning and basic structural analysis of short TRPM8 isoforms.

A: Expression of TRPM8 splice variants in LNCaP cell line. The longest (768 bp) PCR product was defined as sTRPM8 β and the shortest (722 bp) as sTRPM8 α . **B:** alignment of partial TRPM8 amino acid sequence with hypothetical amino acid sequences of both sTRPM8 α and sTRPM8 β (respective proteins id: [AAZ73614.1], [AAS45275.1] and [AAS45276.1]). **C:** Genomic organisation of *trpm8* gene (at scale), TRPM8 mRNA (full length at scale TRPM8 on the top; non-at-scale partially sTRPM8 homologous region of TRPM8 with numbered exons; accession number: DQ139309), sTRPM8 α mRNA (non-at-scale; accession number: AY532375) and sTRPM8 β mRNA (non-at-scale; accession number: AY532376). Exons 5 and 7 are including respectively two acceptor sites for alternative splicing and two donor sites for alternative splicing. Therefore exon 5 can be composed of either sole exon 5b or exons 5a plus 5b, since exon 7 can be formed of either the sole exon 7a or both exons 7a and 7b. Note that exon 3 is the first exon of short TRPM8 isoform, though exon 1 and 2 are the two first exon of TRPM8 mRNA. **D:** expression of YFP-fused sTRPM8 protein expressed in HEK cells and detected by western-blot analysis. Splice variant α encodes for two chimeras of 46.26 kDa and 33.55 kDa, though splice variant β encodes mainly the 33.55 kDa isoform. 27 kDa band represents non-fused YFP used as a transfection control. 46.26 kDa chimera correspond to 18.66 kDa wild type protein whose first ATG codon is localized at position 124-126 on AAS45275.1 and at position 170-172 on AAS45276.1, while 33.55 kDa chimera correspond to 5.94 kDa wild type isoform whose first ATG codon is localized at position 457-459 on AAS45275.1 and at position 503-505 on AAS45276.1.

Figure 2.

Fingerprints of sTRPM8 mRNAs expression.

A: Detection of TRPM8, sTRPM8 α and β mRNA with PCR in several human prostate cell lines (cancerous: LNCaP, DU-145 and PC-3, normal: PNT1A) and primary culture of apical epithelial cells (PrPE). Bottom scheme represents the location of primers used for these PCR experiments. Expected sizes for amplicons were 266 or 312 depending on expression of exon 5a. **B:** shows expression of TRPM8, sTRPM8 α and β mRNA in positive control LNCaP, human keratinocytes cell line (HaCaT), and human glioblastoma cells (MO59K), though no expression of sTRPM8 α and β mRNA was detected in liver cell lines (Huh-7 and HepG2), in endothelial cell line (Huvec). **C:** PCR screening reporting detection of TRPM8, sTRPM8 α and β in benign prostate hyperplasias (BPH), prostate cancers (PCa) and normal breasts, but neither in liver, nor in heart, nor in cerebellum and in frontal cortex. **D:** semi-quantitative detection of TRPM8 and sTRPM8s mRNA in androgen-dependent

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

LNCaP cell line and in androgen-independent LNCaP C4-2 subclone. **E:** Histogram showing two patterns of TRPM8 and sTRPM8s mRNA expression in randomly selected biopsies and in both LNCaP and LNCaP C4-2 cell lines. Rates of TRPM8 and sTRPM8s mRNA were calculated by normalizing their expression with GAPDH expression. In order to estimate the proportion of apical epithelial cells in biopsy samples, values were corrected with rate of cytokeratin 18 expression.

Figure 3.

Study of sTRPM8 isoform quaternary structure.

A: Western-blot experiment showing discrepancies of eYFP-fused proteins of either sTRPM8 α or sTRPM8 β detection depending on either the temperature of denaturation (left), or presence of DTT in Laemelli buffer (right). **B:** Immunoprecipiations of His-tagged TRPM8 protein followed by immunoblotting with anti-GFP antibody failed to detect sTRPM8 isoforms (top). Inputs experiments showed detection of TRPM8 protein, and sTRPM8-6 and sTRPM8-18 isoforms as well (bottom). Sole YFP was used as a negative control. **C:** 0.8 μ m confocale slide images of LNCaP cells transfected with different couples of vectors encoding YFP- or CFP-fused proteins. Accordingly with our previous results (Thebault et al., 2005), all proteins show internal localization and TRPM8 channel either. FRET experiments were carried out as described in the M&M section and results are presented in histogram **D** (n>25 cells for each conditions).

Figure 4.

Effect of TRPM8 isoforms expression on classical TRPM8.

A: Averaged time courses of cytosolic calcium rise (mean \pm s.e.m.) in response to menthol (500 μ M, upper layout) and icilin (10 μ M, bottom layout) in control HEK-M8/Ctrl cells (solid circles, n=108), HEK-M8/sM8 α (open squares, n=105) and HEK-M8/sM8 β (open circles, n=111). **B:** The changes in membrane current density measured at +100 mV in representative HEK-M8/Ctrl cell exposed to cold (21 $^{\circ}$ C), menthol (500 μ M), and icilin (10 μ M), as indicated by horizontal bars. Superimposed raw currents in response to voltage-ramp pulse protocol between +100 and -100 mV, shown in the inset are acquired at the time points marked by the respective numbers on the time course of panel. **C:** Same as in **B**, but for another representative HEK-TRPM8 cell transfected with sTRPM8 β . **D:** Comparison of maximal current densities (mean \pm s.e.m.) activated by menthol-, icilin- and cold in the control HEK-M8/Ctrl cells (black columns, n=42) and HEK-M8/Ctrl cells transfected with sTRPM8 β (open columns, n=64); “***” designate significant differences ($P<0.01$). **E:** Same as in **D**, but for HEK-TRPM8 cell transfected with sTRPM8 α . We distinguished two populations depending on icilin evoked current. 5/9 cells showed a homogenous inhibition of TRPM8 current (grey columns) while the 4 last responded to icilin perfusion like HEK-TRPM8/sM8 β (white columns). **F:** Western blot showing TRPM8 detection after cell surface biotinylation of HEK-M8 cells transfected with either empty vector (Ctrl), with sTRPM8 α -pcDNA3 or with sTRPM8 β -pcDNA3. Upper panel shows total protein extract, though lower panel presents pull-downed proteins with streptavidin beads.

Figure 5.

Dose-dependence of sTRPM8 β effects.

A, B: Averaged time courses of cytosolic calcium rise (mean \pm s.e.m.) in response to menthol (500 μ M, **A**) and icilin (10 μ M, **B**) in the control HEK-M8/Ctrl cells (solid circles, n=118) and in HEK-M8 cells transfected with 1 μ g sM8 β (grey circles, n=118) or 6 μ g sM8 β (open circles, n=118). **C:** Comparison of maximal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ rises (mean \pm s.e.m.) in response to menthol (500 μ M) and icilin (10 μ M) in the HEK-M8/Ctrl cells (black columns, n=118) and HEK-TRPM8 cells transfected with with 1 μ g sM8 β (grey columns, n=118) or 6 μ g sM8 β (open columns, n=118). **D:** Comparison of maximal current densities (mean \pm s.e.m.) activated by menthol (500 μ M), icilin (10 μ M) and cold in the HEK-M8/Ctrl cells (black columns, n=10) and HEK-M8 cells transfected with with 1 μ g sM8 β (grey columns, n=12) or 6 μ g sM8 β (open columns, n=14).

Figure 6.

Ion channel mechanism underlying inhibition of the TRPM8 channel by the short TRPM8 isoforms.

A: Representative examples of the single channel activity observed in the cell-attached configuration at 120 mV in control (n=10) and TRPM8 α (n=9) or TRPM8 β (n=13) expressing cells. **B:** The sTRPM8 α and sTRPM8 β isoforms did not affect the single channel conductance (e.g., similar slope conductance values were obtained as indicated). **C:** Top – an example of the single channel activity in on-cell (control) patch devoid of multiple channel openings (consecutive traces recorded at 120 mV). Bottom - comparison of the open interval distributions in control and TRPM8 α or TRPM8 β expressing cells. Best-fit exponential components are shown by the superimposed smooth lines with the corresponding value of the mean open time indicated near each trace. **D:** Comparison of the shut interval distributions in control and TRPM8 β expressing cells. In each case three individual exponential components (τ_1 , τ_2 and τ_3) are shown with the best-fit values of the time constant and relative area indicated. **E:** Mean data showing significant reduction of the TRPM8 channel activity when it was co-expressed with either the M8 α or M8 β isoforms: left – channel open probability (NPo); right - the frequency of channel openings (NFopen) (n=9-13). **F:** Coexpression of the short TRPM8 isoforms did not affect the mean open time (left) but significantly increased the number of long shittings (right) evaluated as the relative area under the long closed exponential component (as shown by white in D).

Figure 7.

Effect of sTRPM8-6 expression on TRPM8 channel voltage dependence and thermosensitivity.

A: Raw currents in response to the depicted voltage-clamp protocol in the representative HEK-M8/Ctrl exposed to menthol (500 μ M), which were used to measure the apparent open probability (P_o) based on the amplitude of current tails (shown in the inset). The Tail current (I_{TAIL}) was measured at the moment indicated by the arrow. **B:** Voltage-dependence of TRPM8-mediated

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

current activation (P_o vs. voltage) in HEK-M8/Ctrl cells at 37° C (grey filled circles) and at 21° C in the presence of menthol (500 μ M) in HEK-M8/Ctrl (black filled circles) and HEK-M8/sTRPM8 β that encodes sTRPM8-6 protein (white circles). Solid lines represent the best fit of experimental data points with Boltzmann equation; dashed lines indicate respective values of $V_{1/2}$; note, the leftward shift of $V_{1/2}$ for TRPM8 activation by $\Delta V_{1/2}$ in the presence of cold and menthol. This $\Delta V_{1/2}$ is decreased by sTRPM8-6 expression in HEK-TRPM8. **C:** Comparison of $V_{1/2}$ values for TRPM8-mediated current activation (mean \pm s.e.m.) in the presence of menthol (500 μ M), icilin (10 μ M) or cold (21° C) in the control HEK-TRPM8 cells (black columns, n=32) and in HEK-M8 cells transfected with sM8 β (open columns, n=47); “*” designate significant differences ($P<0.05$). **D:** Magnified view of the dependencies of panel **B** for the “physiological” range of resting potentials to present physiologically relevant differences in voltage-dependence of TRPM8 activation conferred by sTRPM8-6 (hatched area). **E:** Comparison of the levels of TRPM8 activation (mean \pm s.e.m.) at -40 mV in the presence of menthol (500 μ M), icilin (10 μ M) or cold (21° C) in the control HEK-M8 cells (black columns, n=32) and in HEK-M8 cells transfected with sM8 β (open columns, n=47); P_o values were normalized to the value in the presence of menthol for HEK-M8/Ctrl cells. “*” designate significant differences ($P<0.05$). **F:** Arrhenius plots of α (fitted with blue lines) and β (fitted with red lines) for TRPM8 current recorded at +180 mV, in HEK-TRPM8/Ctrl (black plots) and in HEK-TRPM8/sM8 β (open plots). The ΔT marks the difference of temperature characterizing the intersection of α and β rates, in control and sTRPM8-6 expressing cells (HEK-TRPM8/sM8 β).

Supplemental Figure 7.

A: PCR controls validating expression of TRPM8 with sTRPM8s in stably transfected HEK cell clones. As displayed in panel **B**, these cells lines overexpress the epitope-tag TRPM8-myc/6xHis channel following tetracycline induction (upper panel), though they overexpress constitutively either the wild type sTRPM8 α or the wild type sTRPM8 β (PCR detection in **C**, middle panel). Actin is used as loading control.

Table 1.

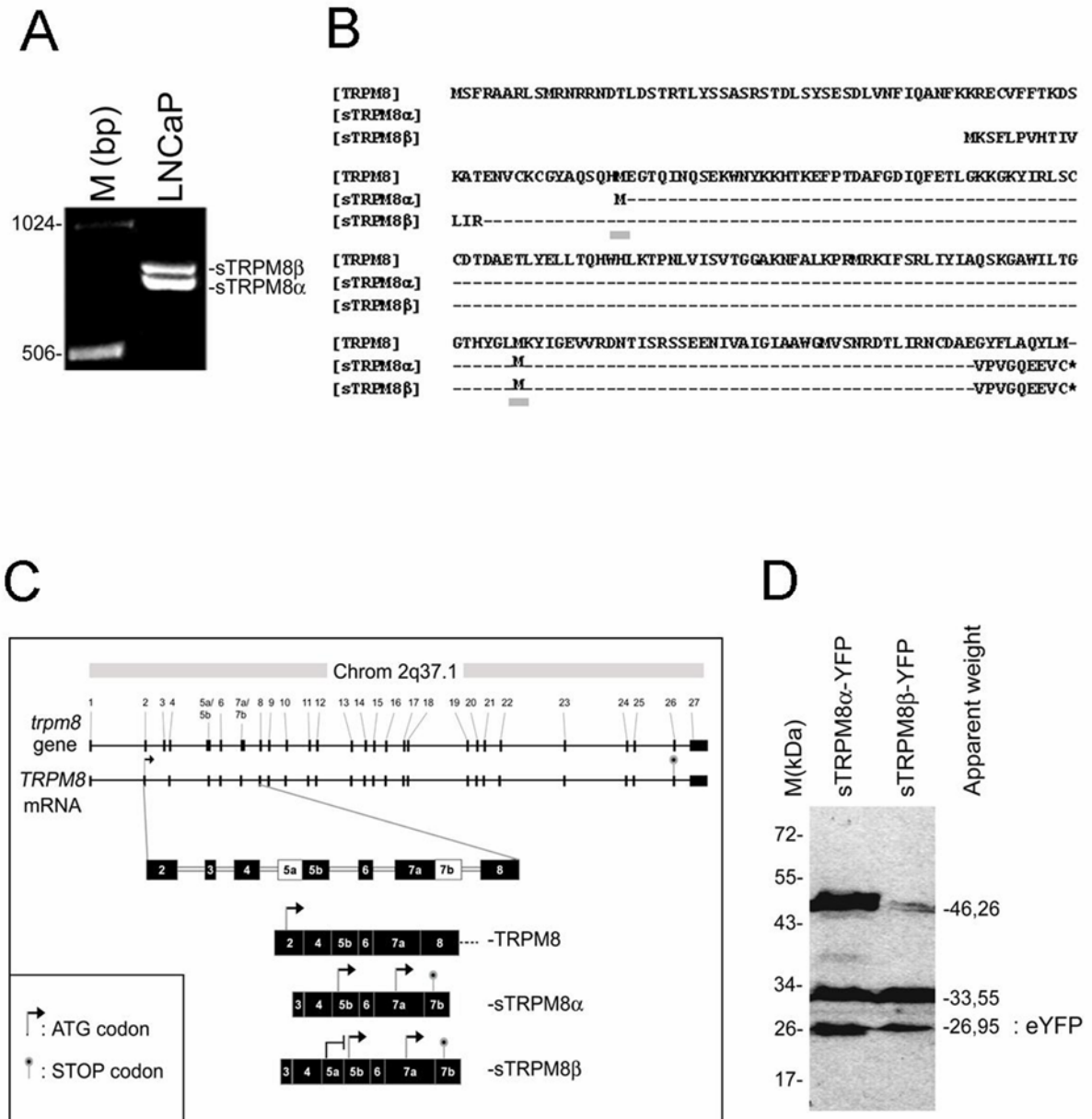
Blast analysis of TRPM8-matching RNA and ESTs for specific TRPM8 sequence or TRPM8 and sTRPM8 β homologous sequence. Identity of blasted sequences with matched sequences is represented by e-value. Probability that the full length matched sequences could be either TRPM8 or one of the two sTRPM8 isoform is figured out by 0 (no compatibility), 1 (match) or “?” (not possible to determine).

Short TRPM8 isoforms regulate TRPM8 activity

Table one :

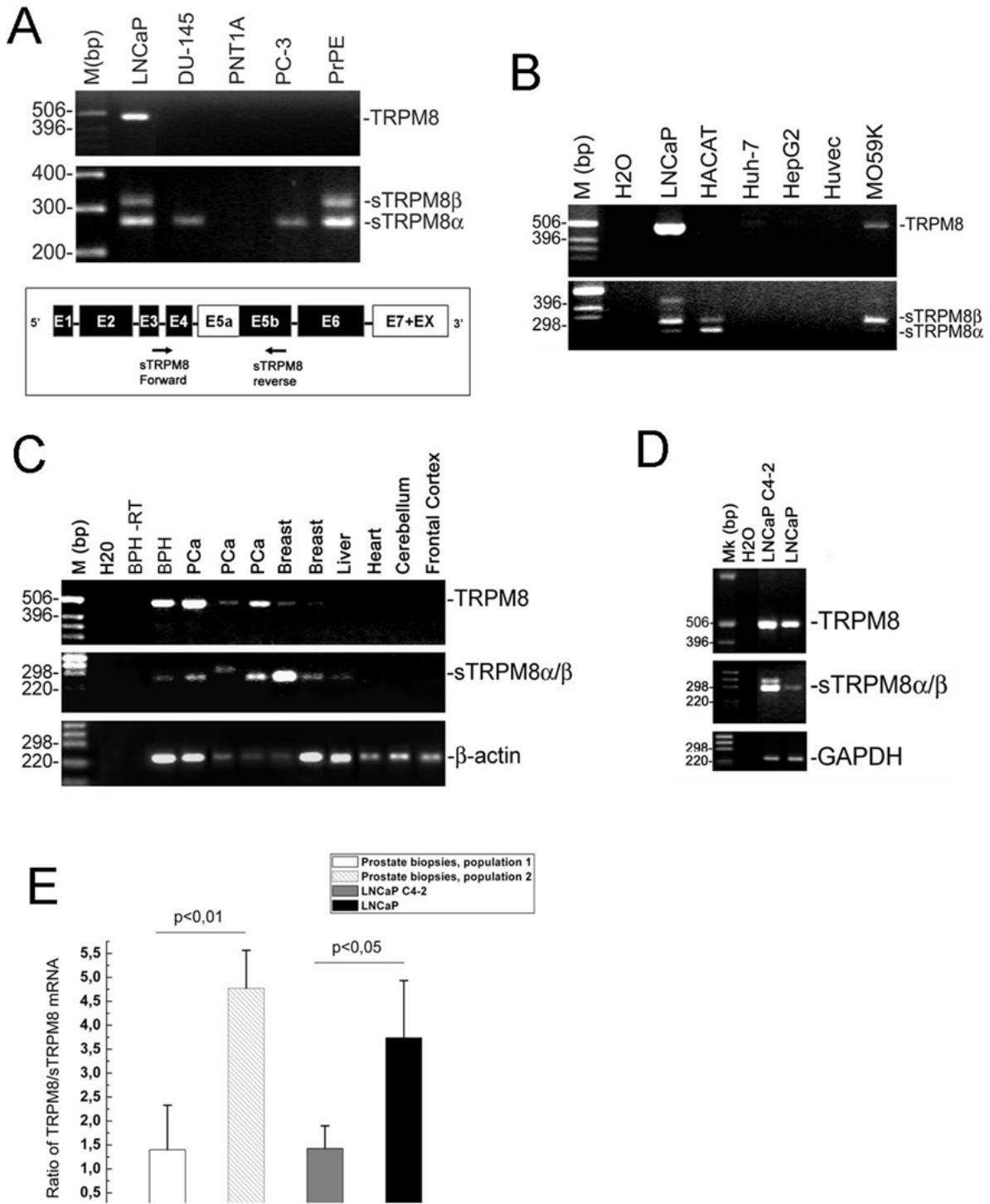
Accession number	origin	e-value	TRPM8	sTRPM8 α	sTRPM8 β
BE274448.1	Menanotic melanoma	0.0	0	0	+
BE390627.1	Endometrium, adenocarcinoma cell line	0.0	0	0	+
BF477681.1	prostate	0.0	0	?	+
AW451174.1	prostate	e-162	0	?	+
AW295430.1	prostate	9e-88	0	?	+
A1659131.1	prostate	3e-58	0	?	+
AA622057.1	Colon tumor	3e-25	0	?	+
BE791173.1	Small cell carcinoma	0.0	+	0	0
BE207083.1	Small cell carcinoma	0.0	+	0	0
BE408880.1	choriocarcinoma	e-133	+	0	0
AA493512.1	prostate	e-123	+	0	0
AV658319.1	Non cancerous liver tissue	e-111	+	0	0
A1671853.1	pooled germ cell tumors	3e-58	+	0	0
AA313170.1	liver	4e-54	+	0	0

Fig. 1



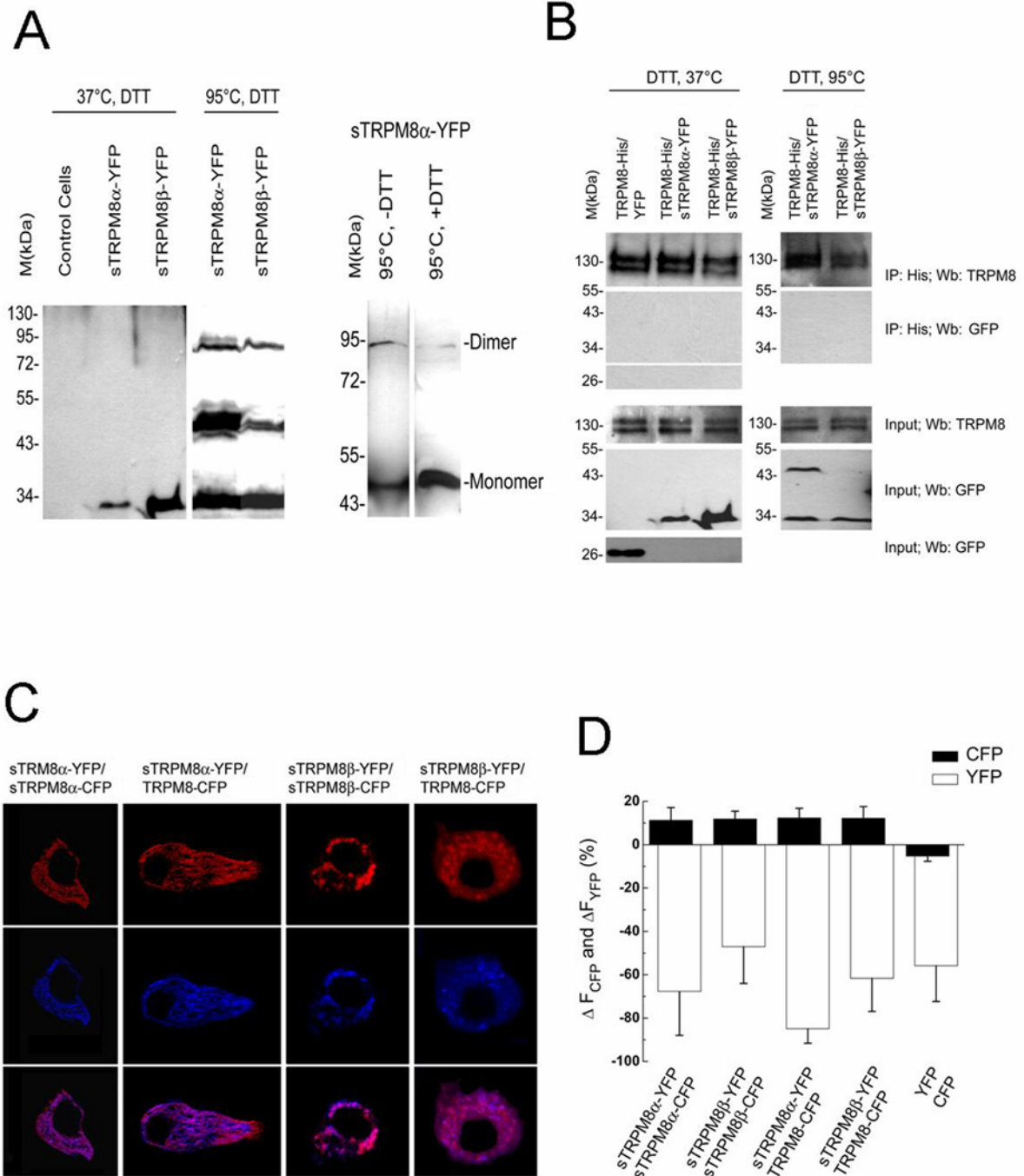
Bidaux *et al.*

Fig. 2



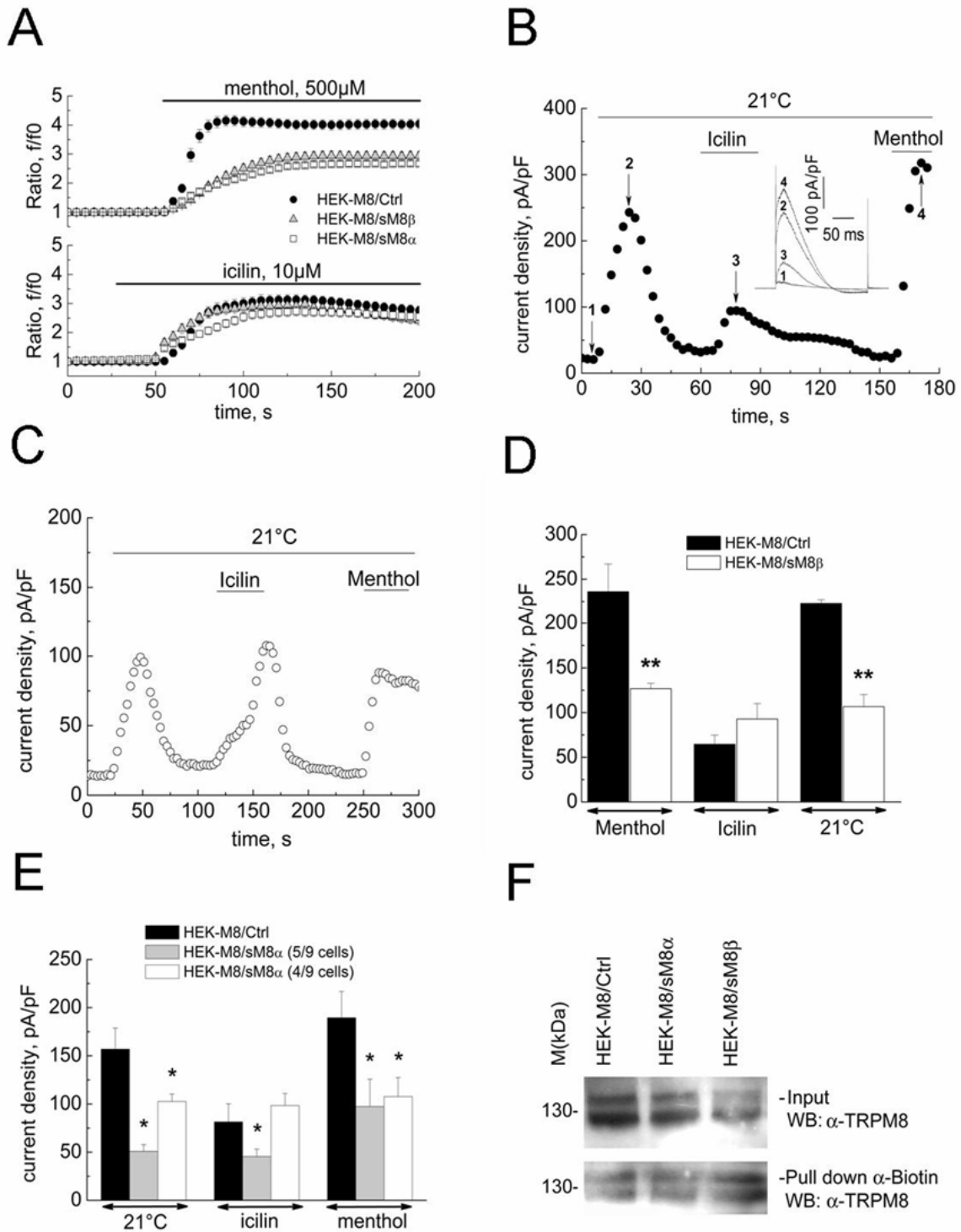
Bidaux *et al.*

Fig. 3



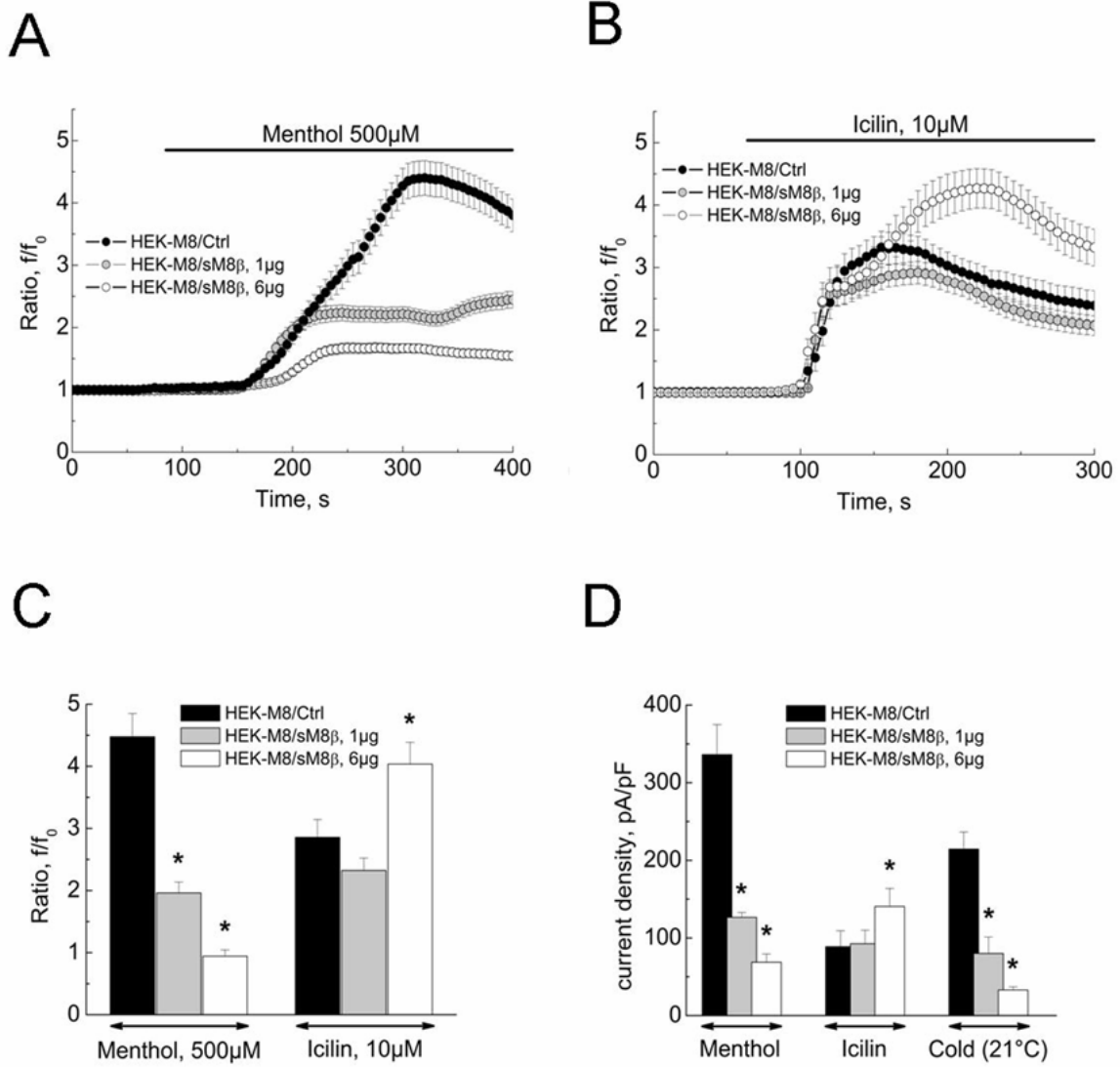
Bidaux *et al.*

Fig. 4



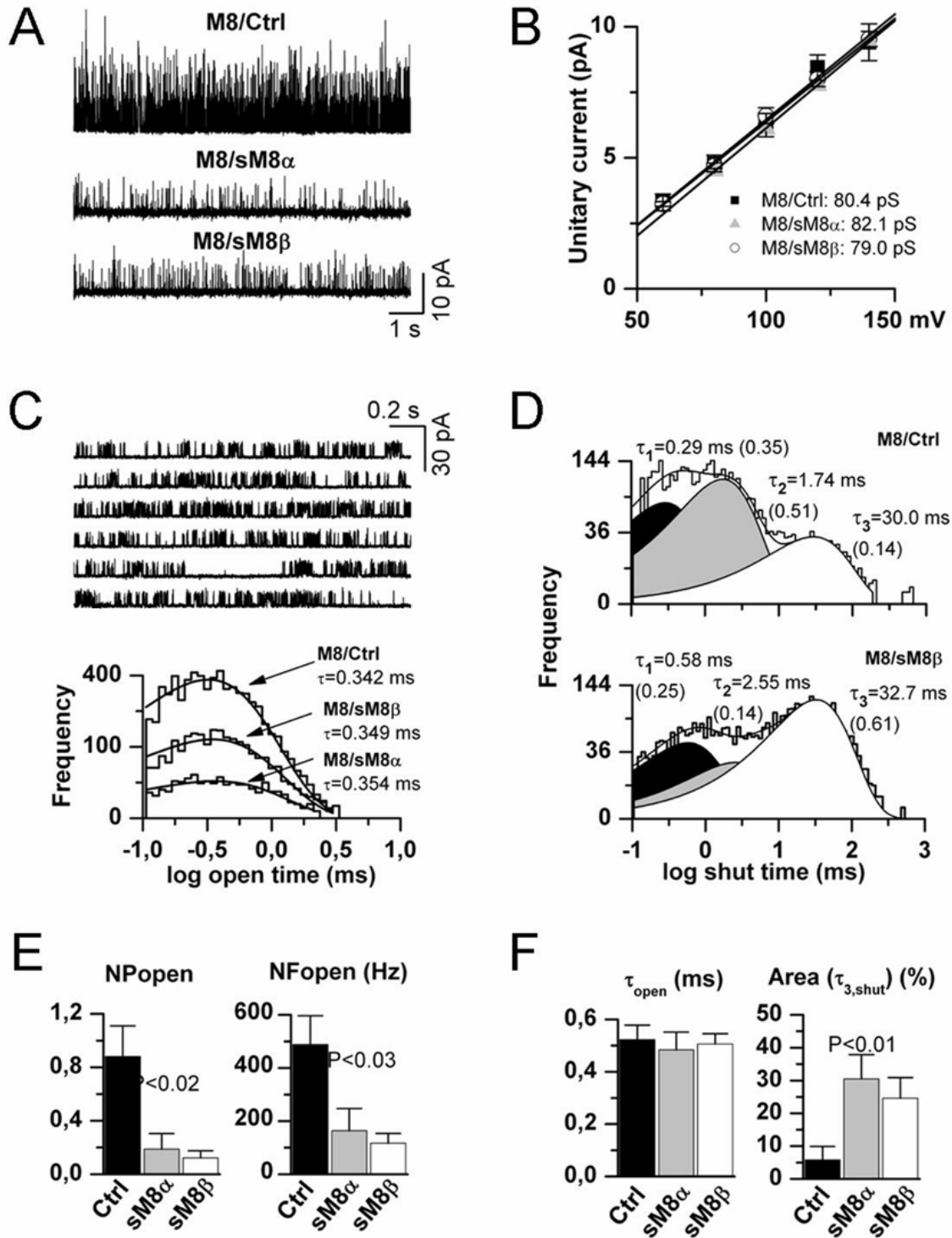
Bidaux *et al.*

Fig. 5



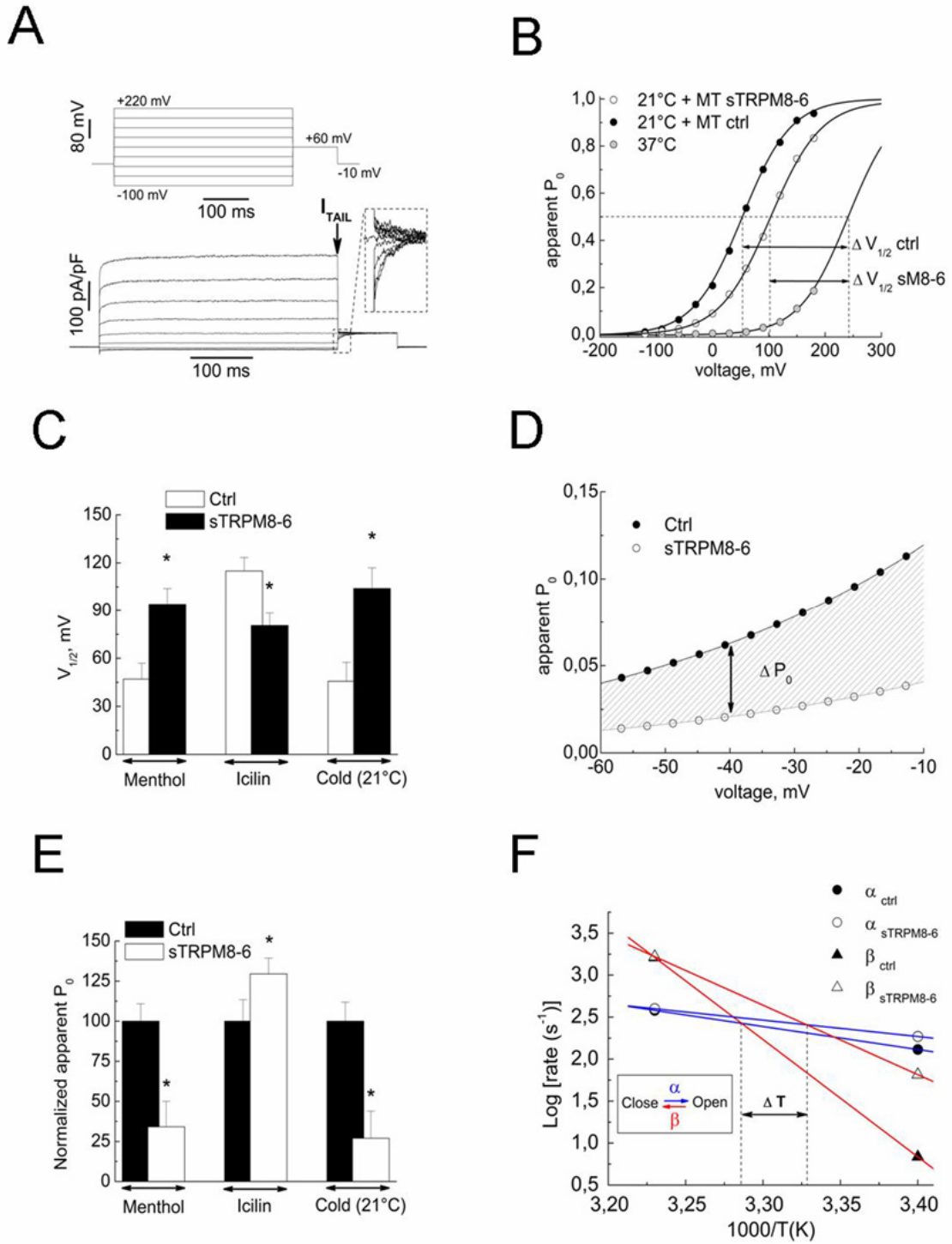
Bidaux *et al.*

Fig. 6



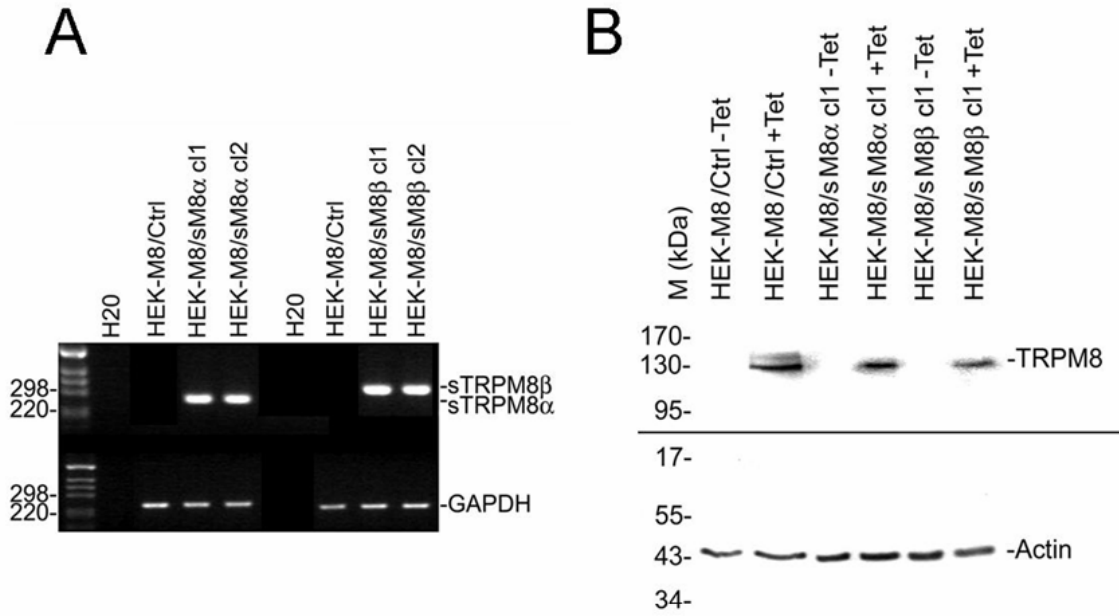
Bidaux *et al.*

Fig. 7



Bidaux *et al.*

Fig. supp 1



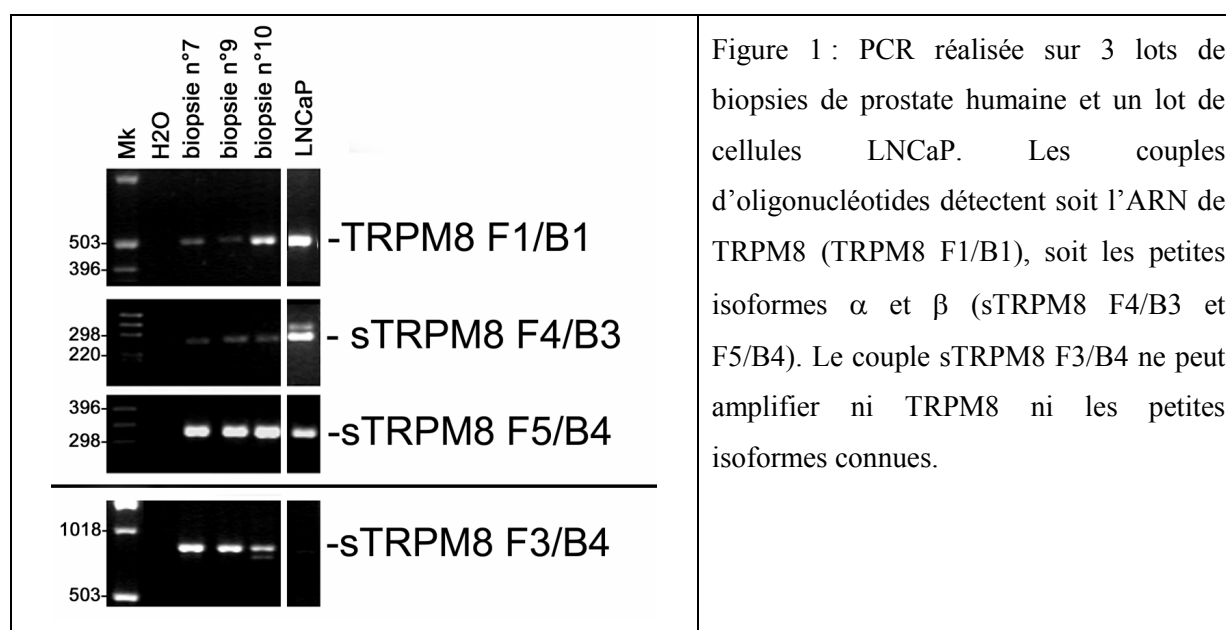
Bidaux *et al.*

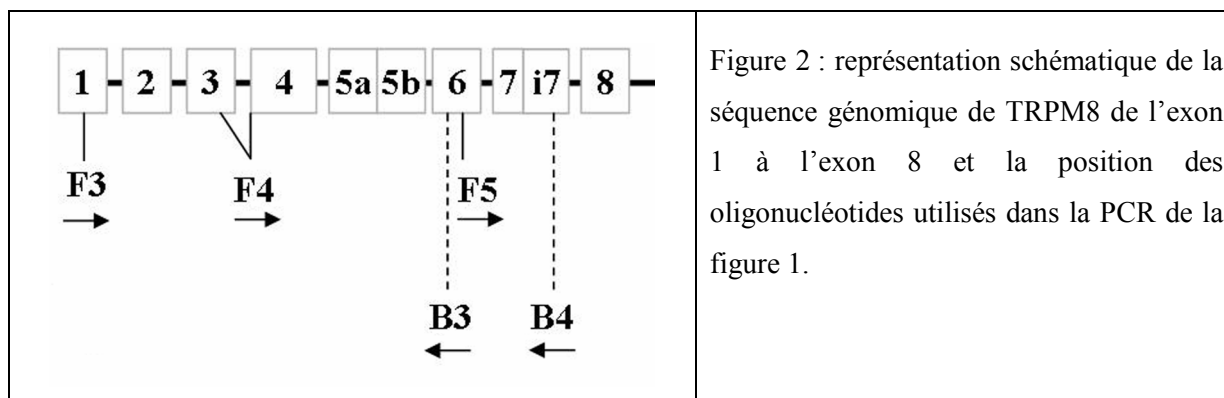
II.D) Résultats supplémentaires : clonage de sTRPM8-7b

En marge du travail sur sTRPM α et sTRPM8 β , j'ai découvert une autre petite isoforme en réalisant une analyse scrupuleuse de l'expression de TRPM8 dans des lots d'ARN issus de biopsies de prostate humaine.

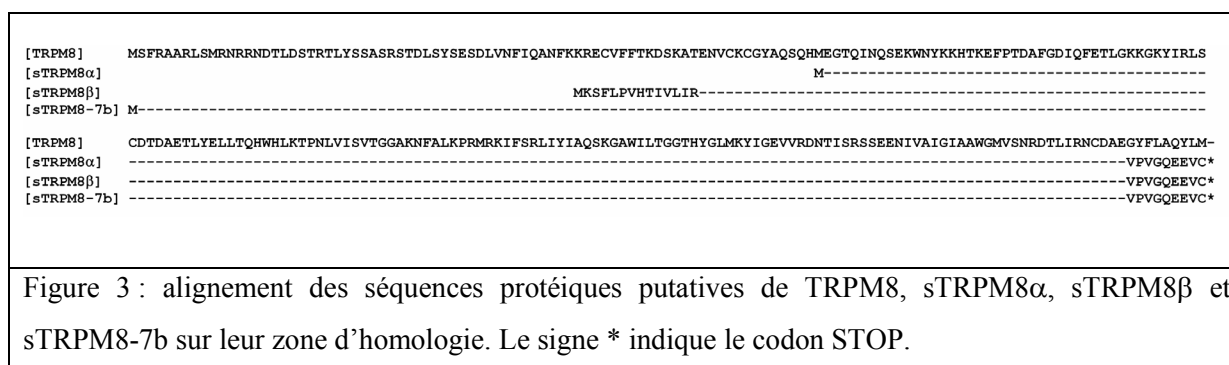
En réalisant des expériences de PCR avec différents couples d'oligonucléotides, je me suis aperçu qu'il existait une grande hétérogénéité d'expression en fonction des zones amplifiées (figure 1). Ainsi, l'ARN de TRPM8 était détecté à des degrés différents selon les lots de biopsies (couple TRPM8 F1/B1). L'ARN de sTRPM8 α était détecté très faiblement dans tous les lots (couple sTRPM8 F4/B3, bande inférieure), alors que l'ARN de sTRPM8 β n'était exprimé qu'exclusivement dans les cellules LNCaP (couple sTRPM8 F4/B3, bande supérieure). De manière surprenante, le couple sTRPM8 F5/B4, que j'utilisais ici pour amplifier sTRPM8 α et sTRPM8 β en un seul fragment (se reporter à la figure 2), amplifiait une bande intense dans tous les lots de biopsie. Dans les cellules LNCaP, le résultat obtenu avec le couple sTRPM8 F5/B4 correspondait bien à l'amplification simultanée, attendue de sTRPM8 α et sTRPM8 β (sTRPM8 F4/B3). Or, comme l'amplifiait sTRPM8 F5/B4 dans les biopsies présentait une intensité sans relation avec l'expression des isoformes sTRPM8 α et sTRPM8 β (sTRPM8 F4/B3), j'ai émis l'hypothèse qu'il devait exister un autre ARN n'incluant pas l'exon 3 mais terminant de façon précoce dans l'intron 7 (ou exon 7b) comme les isoformes sTRPM8 α et sTRPM8 β (cf. figure 2).

L'amplification avec le couple sTRPM8 F3/B4 (exon 1 à exon 7b) confirme l'expression d'une nouvelle isoforme appelée sTRPM8-7b (figure 1).





Le clonage et le séquençage de cette isoforme sTRPM8-7b confirment qu'elle est parfaitement homologue à TRPM8 jusqu'à l'exon 7. La non-utilisation du site donneur d'épissage à la fin de l'exon 7 provoque l'utilisation du codon STOP précoce inclus dans l'exon 7b ou intron 7 (figure 3).



Il est particulièrement intéressant de noter que cette nouvelle isoforme sTRPM8-7B n'est pas exprimée dans les cellules LNCaP alors qu'elle présente une très forte expression dans les biopsies. D'autre part, en tenant compte des hypothèses émises sur le fonctionnement et le rôle des isoformes, il est essentiel de tenir compte du ratio TRPM8/sTRPM8-7B qui est très favorable à l'isoforme dans les lots de biopsie.

Ce travail étant très récent, nous n'avons pas encore acquis de données fonctionnelles sur cette isoforme. Cependant, étant donnée son expression dans la prostate et sa forte homologie avec les deux autres isoformes, nous pouvons nous attendre à détecter un rôle dans la régulation de l'activité du canal TRPM8.

Conclusion du chapitre.

Depuis quelques années, l'étude des isoformes des canaux TRP a décuplé les mécanismes de régulation de ces canaux ioniques. Dans cette thèse je me suis intéressé à deux types d'isoformes du canal TRPM8 : des isoformes-canal (suffisantes en elles même pour former un canal ionique) et des petites isoformes tronquées jouant le rôle de sous-unités régulatrices.

Dans les cellules de la prostate, nous avons proposé l'existence d'au moins une isoforme-canal de TRPM8 exclusivement localisée dans le réticulum endoplasmique, dont l'expression diffère de celle du canal TRPM8 classique. En outre, notre travail plus récent sur les kératinocytes nous permet d'affirmer qu'une isoforme réticulaire de TRPM8 est aussi présente dans ces cellules. Il semblerait donc que l'expression de cette (es) isoforme(s)-canal réticulaire (s) de TRPM8 possèdent une expression plus ubiquitaire que celle de la forme TRPM8 classique. Bien que la (es) fonction (s) de ces isoformes ne sont pas encore connue (s), nos premiers résultats indiquent qu'elles pourraient intervenir dans la régulation du cycle cellulaire.

Nos études portant sur les petites isoformes du canal TRPM8 ouvrent de nouvelles hypothèses quant à la structure multimérique du canal ainsi que sur les mécanismes de régulation de son activité. En effet, nous démontrons que ces petites isoformes agissent comme sous-unités régulatrices du canal en modifiant ces propriétés biophysiques. En outre, nous mettons en évidence que la multiplicité de ces isoformes génèrent des modes de régulations spécifiques du canal.

Appliqués à la thermosensation, nos travaux sur les petites isoformes permettent d'envisager de nouveaux mécanismes affinant le seuil de température déclenchant un message nerveux et ainsi d'augmenter la gamme de température pouvant être discriminée par nos capteurs sensoriels. Cependant, appliquée à la prostate, l'hypothèse de l'activation du canal TRPM8 par le froid reste, certes, envisageable mais peu probable vu la localisation intracorporelle de la prostate. C'est pourquoi, nous avons recherché des voies d'activation du canal TRPM8 plus compatible avec la localisation de la prostate.

Chapitre III

III) Contrôle de l'activité du canal TRPM8

III.A) Article 5

“IPLA₂-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids”

Fabien Vanden Abeele[†], Alexander Zholos[†], Gabriel Bidaux[†], Yaroslav Shuba, Stephanie Thebault, Benjamin Beck, Matthieu Flourakis, Yuri Panchin, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya

(Article accepté dans JBC, septembre 2006).

[†]: Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

Dans cet article, nous décrivons le rôle de la phospholipase A2 indépendante du calcium (iPLA2 β) dans l'activation du canal TRPM8 par l'intermédiaire des lysophospholipides.

En utilisant la lignée HEK-TRPM8 et grâce aux techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie, nous démontrons que l'application de taspigargine (TG) entraîne une activation du canal TRPM8. En nous basant sur le mécanisme d'activation du courant SOC par la TG via la iPLA2 β , nous reportons que l'inhibition ou la suppression de la iPLA2 β inhibe en grande partie l'activation de TRPM8 par la TG mais aussi par le menthol. Nous démontrons ensuite que certains des produits de dégradation des phospholipides par la iPLA2 β : le LysoPhospholipide-Inositol (LPI) et la LysoPhospholipide-Choline (LPC) entraîne l'activation du canal TRPM8 par stabilisation de sa conformation dans l'état « ouvert ».

Pour finir, nous démontrons que l'activation de TRPM8 par les LPC et LPI peut être supprimée par des molécules connues pour déformer la membrane plasmique. En effet, la variation de structure de la membrane lipidique produit un effet appelé « effet créateur ». Cet effet créateur est connu pour induire l'activation des canaux potassiques TRAAK et TREK lors d'application de substances comme le chloroforme et d'autres anesthésiques, ainsi que les lysophospholipides. Plus exactement, il semblerait que la répartition asymétrique des LPC et LPI soit responsable de la génération de cet effet créateur au sein des microdomaines lipidiques. L'utilisation de substances anti-crénatrices comme la tétracaïne entraîne l'inhibition de cet effet créateur. Nous proposons donc que l'activation de TRPM8 par les LPI et LPC soit, en fait, indirecte car transmise par cet effet créateur.

Finalement, la question reste posée de savoir s'il existe un lien entre cet effet créateur et l'effet thermodynamique de la température lors de l'activation de TRPM8.

Pour conclure, nous démontrons dans cet article que la voie de la iPLA2 est une voie physiologique contrôlant l'activité du canal TRPM8.

Ma participation à ce travail a consisté à construire la lignée HEK-TRPM8 et à réaliser les mesures d'activité et d'expression de la iPLA2.

iPLA₂-DEPENDENT GATING OF TRPM8 BY LYSOPHOSPHOLIPIDS

**Fabien Vanden Abeele¹, Alexander Zholos^{1,2}, Gabriel Bidaux¹, Yaroslav Shuba³,
Stephanie Thebault, Benjamin Beck, Matthieu Flourakis, Yuri Panchin⁴, Roman
Skryma and Natalia Prevarskaya**

**Inserm, U800, Equipe labellisée par la Ligue contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, F-
59650 France ; Univ Lille 1, Villeneuve d'Ascq, F-59650 France**

Running Title: Gating of TRPM8 by Lysophospholipids

Address correspondence to: Natalia Prevarskaya, Laboratoire de Physiologie Cellulaire,
INSERM U800, Bâtiment SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650
Villeneuve d'Ascq, France, Tel. (33) 3 20 33 60 18; Fax. (33) 3 20 43 40 66; E-mail:
Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr

¹Contributed equally

²Present address: Department of Physiology, School of Medicine and Dentistry, Queen's
University, Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL, UK.

³Present address: The Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of
Ukraine, Bogomoletz Strasse, 4, 01024 Kiev-24, Ukraine.

⁴Present address: Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of
Sciences, Moscow 101447, Russia; and the A.N. Belozersky Institute of
Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119899,
Russia.

TRPM8 represents an ion channel activated by cold temperatures and cooling agents such as menthol, that underlies the cold-induced excitation of sensory neurons. Interestingly, the only human tissue outside the peripheral nervous system, in which the expression of TRPM8 transcripts has been detected at high levels, is the prostate – a tissue not exposed to any essential temperature variations. Here we show that the TRPM8 cloned from human prostate and heterologously expressed in HEK293 cells is regulated by the Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) signaling pathway with its end products, lysophospholipids (LPLs), acting as its endogenous ligands. LPLs induce prominent prolongation of TRPM8 channel openings which are hardly detectable with other stimuli (e.g., cold, menthol, and depolarization) and which account for more than 90% of the total channel open time. Down-regulation of

iPLA₂ resulted in a strong inhibition of TRPM8-mediated functional responses and abolished channel activation. The LPLs action on TRPM8 channels involved either changes in the local lipid bilayer tension, or interaction with the critical determinant(s) in the transmembrane channel core. Based on this, we propose a novel concept of TRPM8 regulation with the involvement of iPLA₂ stimulation. This mechanism employs chemical rather than physical (temperature change) signaling, and thus may be the main regulator of TRPM8 activation in organs not exposed to any essential temperature variations, as in the prostate gland.

Although TRPM8 - a member of the transient receptor potential (TRP) channel family - was originally cloned from the prostate (1), recent studies have firmly established its function as a cold/menthol receptor in sensory neurons (2,3). Thus, an outstanding problem heightened by a significant TRPM8 up-regulation in several

tumors (prostate, lung, breasts, skin) concerns the whole spectrum of the physiological and patho-physiological roles of TRPM8 in those tissues devoid of any significant temperature variations. Revealing possible alternative molecular events leading to TRPM8 activation at constant temperature would undoubtedly help to uncover other TRPM8 functions beyond the cold sensation.

Recently a model ascribing TRPM8 activation to cold/menthol-induced shifts in the channel voltage dependence towards physiological membrane potentials has been proposed (4). Although attractive in its explanation of the temperature sensitivity, this model seems to be insufficient to account for TRPM8 activation in those tissues which are not exposed to any essential temperature variations, such as prostate. Moreover, prominent rundown of TRPM8 activity in excised patches (4,5) raised a possibility that some endogenous ligands might be necessary for channel activation. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) has recently been found to be such a factor, as it was capable not only of restoring menthol-activated TRPM8 current after its rundown in excised patches, but also of activating the current independently of menthol (5,6). This would suggest the importance of this endogenous lipid signaling in sustaining the TRPM8 function. Notably, high concentrations of diC8 PIP₂ (e.g., 500 μM) allowed channel opening even at 32-37°C (6). The functional importance of the PIP₂-dependent TRPM8 gating has thus become evident in the cold sensation, since any of the well-known PIP₂ depletion scenarios (e.g., activation of G_{q/11}-PLC coupled receptors or Ca²⁺-dependent activation of some PLC isoforms) would limit TRPM8 activation by shifting its gating towards lower temperatures or higher voltages. However, the possibility of channel activation (rather than desensitization) with the involvement of PIP₂ seems more remote. Experimentally this can be achieved by co-expression of enzymes, which catalyze PIP₂ formation (e.g., PIP5K), and this maneuver

indeed significantly attenuated TRPM8 desensitization (6), suggesting a physiological relevance of this mechanism in connection with the (over)expression of PIP₂-forming enzymes. PIP₂ replenishment also requires Ca²⁺ influx (the mechanism remains unknown) and TRPM8 desensitization is also known to be accelerated by Ca²⁺ withdrawal.

Since the prostate has not been shown to be exposed to any temperature variations, the issue of physiological TRPM8 activation in the prostate is even less clear. The problem is complicated by the fact that TRPM8 may be localized not only in the plasma membrane (PM), but also in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER), where it can operate as a Ca²⁺ release channel (7,8,9). Intracellular Ca²⁺ store depletion is known to be causally associated with the stimulation of the Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) (10), which catalyzes the production of lysophospholipids (11,12) (LPLs) – important lipid messengers, which were implicated in the activation of a number of ion channels (13,14,15) including the TRPC5 channel (16). Considering this as well as a potential role of lipid messengers in the way TRPM8 functions, in the present study we asked whether or not iPLA₂ plays a role in TRPM8 functions and if so what the mechanism of this coupling would be.

Experimental Procedures

Cloning of trpm8 cDNA and fusion protein construction - *Trpm8* gene from normal human prostate was cloned from 1 μg of Human prostate polyA+ RNA (Clontech, Palo Alto, USA) by SMART PCR cDNA synthesis Kit (Clontech). Primers for TRPM8 amplification were: 5'-ACGGGGTACCACCATGTCCTTTCGGG-3' (TRPM8-dir) and 5'-AGATCTCGAGTTTGATTTTATTAGCAATCTCTTTCA-3' (TRPM8-rev). PCR product was purified by MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) and partially

digested with KpnI (NEB) and completely with XhoI (NEB). pcDNA4.TO.A plasmid (Invitrogen) was linearized with the same restrictases. The vector and digested PCR product was ligated, transformed into bacteria, and recombinant clones were selected by PCR. Plasmid DNA was purified by Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and the insert was sequenced.

Creation of HEK-293 cell line stably expressing TRPM8 - Tetracycline repressor-expressing HEK-293 cells defined as "HEK-TREx" were obtained from Invitrogen. The cells were cultured in a 6-well plate (Nunc) and then transfected with 2 µg (per well) of TRPM8-pcDNA4.TO.A plasmid using a Gene PorterTM2 Transfection Reagent (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego). 3 days after transfection, cells were submitted to Zeocin selection (500 µg/ml) for 10 days and 8 positive clones were later isolated and propagated. All 8 clones were thoroughly checked for the tetracycline-induction of the full-size TRPM8 channel expression and function, and all of them appeared to be equivalent. Therefore, no distinction between the clones was made in the functional studies.

iPLA₂ activity assays - The activity of iPLA₂ was assayed as detailed in the original works (15) using a modified kit originally designed for cPLA₂ (cPLA₂ assay kit, Cayman chemicals). The activity of iPLA₂ was expressed in units: absorbance per minute per mg of total protein. iPLA₂ anti-sense efficiency was calculated on the BEL-dependant iPLA₂ activity (total iPLA₂ activity subtracted by iPLA₂ activity treated with 5µM BEL). Thapsigargin-mediated iPLA₂ induction was calculated specifically for the iPLA₂beta (sense iPLA₂ activity subtracted with anti-sense treatment).

Electrophysiology and solutions - Membrane currents were recorded in the whole-cell, cell-attached and inside-out configurations of the patch-clamp techniques using the Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA, USA). The

resistance of the patch pipettes fabricated from borosilicate glass capillaries (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) when filled with the intracellular solution was 2-3 MΩ for the whole-cell recordings and 5-7 MΩ for the single-channel recordings. In the whole-cell experiments, series resistance was compensated for by about 70%. Currents were filtered at 1 or 2 kHz and sampled at 10 kHz.

Whole-cell currents were measured under nearly symmetrical ionic conditions, i.e. standard extracellular solution (SECS) containing (in mM): 150 NaCl, 1 MgCl₂, 5 glucose, 10 HEPES, pH 7.3 (adjusted with NaOH), whilst the pipette was filled with the intracellular solution (ICS) containing (in mM): 150 NaCl, 3 MgCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.3 (adjusted with NaOH). In the cell-attached mode, cells were bathed in a modified SECS with an equimolar substitution of KCl for NaCl to bring the resting potential close to zero, whilst the patch pipette was filled with SECS. The bath was replaced with ICS prior to patch excision. For temperature control and solution exchange, the TC1-SL25 system (Bioscience Tools, San Diego, CA, USA) was used with the temperature probe placed near the patch pipette tip. The system provided a temperature stability of at least 0.2°C.

Fluorescence measurements of [Ca²⁺]_c - Cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c) was measured using the fura-2AM ratiometric dye as detailed previously (17). Temperature and solution changes were performed as described for electrophysiology.

Data analysis - Membrane current recordings obtained from 172 cells were analyzed and plotted using the pCLAMP 9 (Axon Instruments, Inc.) and Origin 5 software (Microcal Software Inc., USA). Single channel transitions were identified on the basis of the half-amplitude threshold crossing criteria. Shut durations were generally not analyzed, since two or more active channels were present in a membrane

patch. Open time histograms were constructed as distributions of the duration logarithm (in ms, 20 bins per decade) and were fitted with exponentials, using the built-in “compare models” algorithm of the pCLAMP software. Amplitude and dwell time histograms were constructed for fitted levels ignoring brief transitions which lasted less than $2T_R$, where T_R is filter rise time (e.g., 0.165 ms for 2 kHz filter). Amplitude histograms fitted with Gaussian components showed equal spacing between the peaks (Fig. 2C), indicating multiple openings of the same conductance channel (from 1 to 7 in different patches). Unitary amplitudes at negative potentials were measured in a relatively small number of patches where sufficiently long openings could be collected. Channel activity was expressed as NP_O where N – the (unknown) number of channels in the patch and P_O – open probability determined from idealized traces. Results were expressed as the means \pm standard error of the mean (s.e.m.). Statistical analysis was performed using the t test (differences considered significant when $P < 0.05$).

Drugs and treatments - All chemicals were purchased from Sigma, except for thapsigargin and fura-2AM, which were from Calbiochem and Molecular Probes, respectively.

iPLA₂ hybrid depletion was performed by treating HEK-293/TRPM8 cells for up to 5 days with either 0.5 μ M phosphorothioate anti-sense oligodeoxynucleotides (ODNs) (Eurogentec) targeted at the iPLA₂ coding region and 2.5 μ M cytofectin (GS 3815 to DOPE at a 2:1 molar ratio, unsized) (Eurogentec) or sense (for control purposes) ODNs by adding them directly to the culture medium. The 18-mer ODNs used in these studies had the following sequences: 5'-CTCCTTCACCCGGAATGGGT-3' for anti-sense ODN and 5'-ACCCATTCCGGGTGAAG.

For siRNA-mediated TRPM8, knockout NPE/BPHE cell cultures were transfected with 15-50 nM of siRNA against

TRPM8 (siRNA_{TRPM8}, synthesized by Dharmacon Inc, Lafayette, USA) using 6 μ l of TransIT-TKO transfection reagent (Mirus Inc, Madison, USA) following the manufacturer's instructions. The siRNA sense sequence used was: 5'-UCUCUGAGCGCACUAUUCA(dTdT)-3'. This sequence is located at position 894 of the *trpm8* gene (accession number: AY328400).

Cell treatments with BEL (50-100 μ M) were performed for 30 min at 37°C in the standard extracellular solution, followed by a thorough washout before using them in the experiments.

Menthol was dissolved in ethanol as 1 M stock and was added to the experimental solution by consecutive dilutions to reach the concentration required.

RESULTS

Our study was performed using HEK-293 cells stably expressing human TRPM8 under control of a tetracycline-inducible promoter (HEK-293/TRPM8). HEK-293/TRPM8 cells without tetracycline induction were used as controls (HEK-293/ctrl cells).

Plasmalemmal TRPM8 can be activated by ER calcium store depletion. Recent studies have established dual localization of TRPM8 in the PM as well as in ER membranes (7,8,9). The functional evidence of the plasma- and endolemmal targeting of the heterologously expressed TRPM8 was obtained using cytosolic Ca²⁺ ([Ca²⁺]_c) measurements and the “classical” protocol that permits dissociation of Ca²⁺ release from Ca²⁺ entry in response to menthol. Fig. 1A shows that consistent with the dual targeting, exposure of HEK-293/TRPM8 cells to menthol (100 μ M) in the absence of extracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_o) caused a transient [Ca²⁺]_c increase, obviously due to Ca²⁺ release from the ER, followed by a sustained [Ca²⁺]_c elevation upon switching to [Ca²⁺]_o=2 mM in the continued presence of menthol due to the

initiation of Ca^{2+} entry. Neither Ca^{2+} release nor Ca^{2+} entry could be detected in response to menthol in HEK-293/ctrl cells (Fig. 1A, open symbols), thus suggesting that both of them are exclusively linked to TRPM8 expression.

The experiments in Fig. 1A indicate that TRPM8 functions as a menthol-activated Ca^{2+} release channel in HEK-293/TRPM8 cells. Thus, overall Ca^{2+} entry in response to menthol may result from the activation of two potential PM pathways: endogenous store-operated Ca^{2+} channels (SOC) of HEK-293 cells as well as foreign PM-localized TRPM8 channels, which in previous studies have been shown to be Ca^{2+} permeable (2,3).

To distinguish between these possibilities, we next proceeded to experiments with combined applications of menthol, thapsigargin (TG) and La^{3+} , of which TG was used as the “classical” store-depleting agent acting independently of TRPM8 via the inhibition of SERCA-mediated Ca^{2+} uptake, whilst La^{3+} was used as a specific SOC blocker (17). Fig. 1B shows that the presence of La^{3+} (10 μM) in the Ca^{2+} -free bathing solution did not interfere with the ability of TG (1 μM ; a concentration known to induce maximal SOC activation (18)) to produce ER store depletion in HEK-293/ctrl cells, but it almost completely eliminated Ca^{2+} entry following readmission of 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$, suggesting a reliable blockade of the endogenous SOC. The same experiment conducted in HEK-293/TRPM8 cells revealed a substantially La^{3+} -insensitive Ca^{2+} entry (Fig. 1B). Moreover, application of menthol (100 μM) during the TG-evoked Ca^{2+} entry plateau in HEK-293/TRPM8 cells produced an additional Ca^{2+} entry (Fig. 1B), which elevated $[\text{Ca}^{2+}]_c$ to nearly the same maximal level as menthol alone (Fig. 1B, C).

Taken together, these results can only be explained on the following assumptions: 1) TG-induced store depletion is somehow coupled to a partial activation of the plasmalemmal Ca^{2+} -permeable TRPM8

channels, and 2) menthol can activate plasmalemmal TRPM8 via two mechanisms, one that involves direct action on TRPM8 channel and another one via a functional coupling of store depletion to PM-localized TRPM8.

To test these hypotheses we undertook patch-clamp measurements of menthol- and TG-induced membrane currents in control and TRPM8-expressing cells. To avoid contamination of TRPM8-mediated current with Ca^{2+} -carried store-operated current (I_{SOC}), activated in response to menthol- or TG-induced ER store depletion (even though its contribution was expected to be negligible, as I_{SOC} density even at elevated $[\text{Ca}^{2+}]_o$ typically does not exceed 3 pA/pF (17,19)) we used nominally Ca^{2+} -free extracellular solutions. The absence of extracellular Ca^{2+} also minimized spontaneous rundown as well as desensitization of menthol-induced TRPM8-mediated current (2).

The currents recorded in HEK-293/TRPM8 cells were characterized by “classical” temperature- and menthol-dependence as well as by those biophysical properties, which were initially described for the recombinant TRPM8, operating as PM channel (2,3,4). Indeed, at room temperature (20°C) HEK-293/TRPM8 cells, but not control cells, showing substantial outwardly rectifying current, which diminished upon heating to 36°C, could be reactivated at this temperature by menthol (100 μM) and diminished again by further heating to 45°C in the presence of menthol (Fig. 2A). Consistent with the previous observations, both cooling (from 36°C to 20°C) and menthol (100 μM) shifted the half-maximal activation voltage ($V_{1/2}$) of the TRPM8-mediated current negatively by 100 ± 19 mV ($n=7$) and 156 ± 19 mV ($n=9$), respectively, without any measurable change in the Boltzmann slope factor (k), which was about 30 mV in all cases. As evident from Fig. 2A, the density of the cold- or menthol-activated membrane currents ($I_{\text{cold/menthol}}$) in HEK-293/TRPM8 cells was great (i.e., exceeding

200 pA/pF at 120 mV), suggesting significant plasmalemmal expression of the TRPM8 channel. Consistent with this, the cell-attached patches usually contained more than one active channel (on average 3.5 ± 0.6 , $n=26$; see also Fig. 2C showing an example of 6 channels at a high time resolution). Fig. 2B shows that single channel activity was temperature-dependent, as expected for TRPM8. This was further confirmed by the outwardly rectifying shape of the mean patch current I-V relationship (Fig. 2C, squares) and by the 74 ± 4 pS ($n=15$) unitary conductance (Fig. 2C, circles), which was quite close to the ~ 83 pS reported before (2).

Consistent with our hypothesis of functional coupling between plasmalemmal TRPM8 and ER Ca^{2+} store, pretreatment of HEK-293/TRPM8 cells with TG (1 μM , 10 min) resulted in a significant current response development (termed I_{TG}) at 36°C , which was characterized by the same hallmark features as $I_{\text{cold/menthol}}$ (i.e., prominent outward rectification and close to 0 mV reversal potential, Fig. 2D, squares). Since TG was unable to induce such a current in HEK-293/ctrl cells (Fig. 2D, circles), we attributed I_{TG} to the activation of plasmalemmal TRPM8 channels due to their coupling to the ER store depletion.

It should be noted that although the whole-cell $I_{\text{cold/menthol}}$ experienced rundown in the course of cell dialysis with the artificial intracellular solution (data not shown), the rundown of I_{TG} was even faster and more complete (the time constant of 83 ± 10 s, $n=5$), suggesting that the presumed store-to-TRPM8 coupling may involve a diffusible cytoplasmic messenger that is washed out during cell dialysis. The fact that menthol was able to activate a much larger current than TG in HEK-293/TRPM8 cells (i.e., current density 350 pA/pF for menthol vs. 130 pA/pF for TG at +100 mV, Figs. 2A, D), which in addition was less prone to rundown, indicated that plasmalemmal TRPM8 gating by menthol most probably involved ER store-dependent (SD) and store-

independent (SI) mechanisms, whilst TRPM8 gating by TG occurred solely via the store depletion. The existence of the two modes of TRPM8 gating allows the whole TRPM8-mediated membrane current (I_{TRPM8}) to be represented as the sum of two components: one that is associated with store depletion ($I_{\text{TRPM8/SD}}$), and another one that is not ($I_{\text{TRPM8/SI}}$). In the framework of such a convention, $I_{\text{cold/menthol}} = I_{\text{TRPM8/SD}} + I_{\text{TRPM8/SI}}$, where $I_{\text{TRPM8/SD}} = I_{\text{TG}}$.

TG-dependent activation of TRPM8 in HEK-293/TRPM8 cells was directly confirmed in single-channel experiments. Fig. 2E, top left, shows representative recordings from a cell-attached patch at different periods following bath application of TG (1 μM) at 36°C . Single channel conductance derived from such patches was 71 ± 5 pS ($n=5$), similar to that found in the cold/menthol experiments. In the presence of TG, open channel probability (NP_o) increased with time and reached a maximum at about 10 min, consistent with the idea of the involvement of a gradual intracellular process (i.e., store depletion) rather than any direct drug action on the channel (Fig. 2F). From a physiological standpoint, the most important feature of the TG-dependent TRPM8 activation was the appearance of channel opening at negative potentials at 36°C (Fig. 2E) at which conditions no unitary activity, not even brief isolated open events, could be resolved before TG application. Such a negative shift of channel gating on the voltage axis was directly confirmed by measuring NP_o voltage dependence before and after TG application (Fig. 2E, top right).

Even more strikingly, following TG treatment long channel openings became apparent, which with time made a progressively larger contribution to the channel activity (Fig. 2E, bottom panels). Analysis of the relative probabilities based on the distributions of open lifetimes (Fig. 2E) predicted that these longer openings contributed up to 90% of the total channel open time. Notably, the two “classical”

stimuli, cooling and menthol, were considerably weaker in promoting long openings, which contributed only 6 and 17% of the total channel open time, respectively, even at strong depolarization (see Fig. 3I, left panels). Thus, the store-dependent mechanism appears to be potent enough to provide physiologically relevant TRPM8 activation in tissues not experiencing any cooling. We next aimed to establish the mechanism of the store-to-TRPM8 coupling.

Signaling pathway involved in the store-dependent TRPM8 activation. Since, on the one hand, ER store depletion is known to stimulate iPLA₂ (10,20) and, on the other hand, iPLA₂ stimulation and resultant generation of lysophospholipids as the active end-products, has been implicated in SOCs activation (15,21), we focused on the iPLA₂ pathway as a possible mediator of store-to-TRPM8 coupling. In the framework of this model, store depletion induces displacement of the inhibitory calmodulin (CaM) from iPLA₂, thereby turning it into a catalytically active state capable of producing two important second messengers – arachidonic acid (AA) and lysophospholipids, of which the latter activate the channels in a “membrane-delimited” fashion (15). Thus, when testing the role of the iPLA₂ pathway, our strategy was to show that: 1) iPLA₂ activity is stimulated by TG, 2) pharmacological or anti-sense iPLA₂ impairment leads to the down-regulation of menthol- and TG-activated, TRPM8-mediated responses and, finally, 3) the products of iPLA₂-catalyzed lipid breakdown, lysophospholipids or AA, are capable of TRPM8 activation.

Consistent with the previously demonstrated causal link between ER depletion and iPLA₂ stimulation (10,20), our experiments on assaying iPLA₂ activity have shown a 2.5-fold enhancement above the basal level following HEK-293/TRPM8 cell treatment with TG (1 μM, 10 min, n=4, Fig. 3A). Moreover, using specific iPLA₂ inhibitor, bromoenol lactone (BEL), to prevent iPLA₂ stimulation by store depletion

resulted in about an 80% suppression of the TG-induced, La³⁺-insensitive Ca²⁺ influx in HEK-293/TRPM8 cells (Fig. 3B). BEL also effectively antagonized menthol-induced Ca²⁺ influx in the presence of La³⁺ (Fig. 3C), although in this case the percentage of suppression was smaller (i.e., 55±4%, n=25), most probably due to the contribution of the store-independent TRPM8-mediated influx component. Furthermore, S-enantiomer of BEL ((S)-BEL, 10 μM), known to be a selective inhibitor of the CaM-dependent iPLA₂β isoform (22) antagonized menthol-activated current more potently (i.e., 45±6% inhibition, n=6) than R-enantiomer ((R)-BEL, 10 μM, 5±2% of current inhibition, n=5), which is selective of CaM-independent iPLA₂γ, thereby confirming iPLA₂β involvement.

The specificity of the inhibition of menthol-activated Ca²⁺ influx via iPLA₂ impairment was also demonstrated in the experiments employing anti-sense iPLA₂ mRNA hybrid depletion. In these experiments, we used anti-sense oligodeoxynucleotides (ODNs) with proven specificity and efficacy (21). In our hands, they inhibited iPLA₂ activity (Fig 3D). The fact that this was paralleled by 39±6% (n=21) suppression of the menthol-activated Ca²⁺ influx (Fig. 3C, inset) provided further support for the hypothesis of iPLA₂ involvement in the store-to-TRPM8 channel coupling (note that the substantial remaining iPLA₂-insensitive component is due to I_{TRPM8/SI} according to our convention).

When activated, iPLA₂ catalyzes the production of two important lipid messengers – AA and lysophospholipids (11,12), which can influence ion channels in a membrane-delimited fashion (12-15). So, next we asked which of these two products is involved in plasmalemmal TRPM8 activation via store depletion. To answer this question, we used single channel recordings in inside-out patches while applying the agents to the cytosolic side of the membrane. Fig. 3E shows that patch excision from a HEK-293/TRPM8 cell maintained at room

temperature resulted in a dramatic reduction in the single TRPM8 channel activity from NP_O of 0.056 ± 0.023 in the cell-attached configuration to NP_O of 0.010 ± 0.002 (i.e., 4.6 \pm 0.7-fold if individual patches were compared, $n=13$). This effect is explained by PIP_2 depletion by lipid phosphatases in isolated membrane fragments (5,6). However, application of LPLs, lysophosphatidylcholine (LPC, 10 μ M) or lysophosphatidylinositol (LPI, 10 μ M), not only restored the activity, but also augmented it significantly above the cell-attached level (Fig. 3E, G). Unitary events during LPC/LPI action were of the same amplitude as those induced by cold or menthol, thereby indicating an enhanced TRPM8 channel activity as in the above described case of TG action, LPLs were capable of activating TRPM8 at negative potentials (Fig. 3E, bottom traces), pointing towards a physiological relevance of this effect, which is also consistent with our Ca^{2+} measurement tests of the $iPLA_2$ role in unclamped cells (Fig. 3B, C). The effects of LPLs in inside-out patches were evidently unrelated to a change in TRPM8 temperature sensitivity (compare Fig. 3E and 2B), or to the fact that these patches were presumably PIP_2 -depleted (5,6). On the other hand, the fact that the potentiating action of TG on TRPM8 activity was abolished by BEL treatment (Fig. 3H) strongly implies its relation to the $iPLA_2$ /LPLs pathway.

Notably, the observed NP_O increase mainly occurred via the LPC/LPI-induced promotion of the long TRPM8 channel openings. This was evidenced by the appearance of a second significant exponential component associated with the long openings in the distribution of open times (Fig. 3I, right panels). In contrast, the primary mode of TRPM8 channel activation in response to depolarization, cold or menthol, was characterized by the dominance of channel openings with a mean open time (τ_{op}) in the range of 0.4–0.7 ms (depending on the membrane potential, Fig. 3I, left panels), whilst any increases in NP_O

were associated with an increase in the frequency, rather than an open event's duration. Indeed at 20°C, long openings of around 3 ms were detectable in only 3 out of 12 patches, making a trivial contribution of $1.3 \pm 1.0\%$ even at 120 mV. Even after menthol application, although more readily detectable (6 out of 6 patches examined) the long τ_{op} remained the same (2.74 ± 0.21 ms) while its contribution increased to only $6 \pm 4\%$ of all events. However, employment of the agents that activated TRPM8 channel via store-dependent pathway, like TG (see Fig. 2E) and especially LPC and LPI (Fig. 3I), induced a strong shift to the major contribution (up to 50% of all events and up to 90% of the total open time) of the long channel openings, with a simultaneous prolongation of the slow τ_{op} to 7.9 ± 2.4 ms ($n=7$).

From these results, one can conclude that the store-dependent mechanism of TRPM8 channel gating preferentially recruits the activation mode that relies on long openings, whilst the store-independent mechanism relies on short openings of accelerated frequency (i.e., shortening of the closed state). This also suggests that the two modes of gating probably involve different molecular determinants of the TRPM8 channel, and thus justified our separation of the overall TRPM8-mediated whole-cell current into $I_{TRPM8/SD}$ and $I_{TRPM8/SI}$ components.

None of the activating effects observed with LPC/LPI could be detected with AA (data not shown).

Possible mechanism of LPC/LPI action on TRPM8 channel. LPC and LPI are representatives of conical neutral lysophospholipids, which by having conically-shaped molecules when partitioned into a single leaflet of membrane lipid bilayer, tend to stabilize its convex curvature (13). The resulting change in the local tension around the channel can affect channel function (23,14). Such a mechanism has been implicated in the LPLs-mediated activation/modulation of a number of

channels including a thermosensitive member of a novel family of mammalian background two-pore (2P) domain K^+ channels, TREK-1 (14), which was shown to respond not only to thermal stimuli, but also to mechanical force arising from the membrane lipid bilayer deformation (13,14). Thus, we hypothesized that the LPC/LPI stimulatory action mechanism on TRPM8 channel may at least in part be explained by the change in the local bilayer microcurvature. Such a hypothesis was supported by the fact that LPI, which has a larger polar head than LPC and is therefore capable of producing stronger membrane deformation, was a more potent TRPM8 activator (see Fig. 3H). In verifying this hypothesis our strategy was to use other interventions known to cause changes in physical membrane properties in the attempt either to mimic or to antagonize LPC/LPI effects.

Application of positive or negative pressure (± 60 mm Hg) to the cell-attached patches from HEK-293/TRPM8 cells did not alter the basal TRPM8 unitary activity observed at room temperature (data not shown), suggesting that mechanical membrane stretch is not critical for the channel function. Extracellularly applied AA (10 μ M) or anionic amphipath, trinitrophenol (TNP, 500 μ M), both being potent TREK-1 openers due to membrane crenation (13) (i.e., forming of convex curvature), also failed to affect menthol-activated $[Ca^{2+}]_c$ rise or membrane current in HEK-293/TRPM8 cells (data not shown). However, cationic amphipaths, tetracaine (100 μ M) and chlorpromazine (CPZ, 1 μ M), which promote changes in physical membrane properties such as formation of cup-shape membrane invaginations (13), antagonized menthol-induced $[Ca^{2+}]_c$ by more than 50% and menthol-activated current by nearly 100% (Fig. 4A-C). Inclusion of tetracaine (100 μ M) in the patch pipette also prevented single TRPM8 channel activity in the cell-attached patches (Fig. 4D), suggesting that cup-like

invaginations might indeed play a role in TRPM8 channel closure.

Extracellular application of LPC activated an outwardly-rectifying membrane current in HEK-293/TRPM8 cells, which by its biophysical properties was identical to I_{TRPM8} and could be blocked by CPZ (Fig. 4E), thereby demonstrating that LPLs are able to activate TRPM8 not only from the inside, but also from the outside of the membrane.

DISCUSSION

Collectively, the results of our study demonstrate that TRPM8, which was initially viewed as just a molecular counterpart of the cold/menthol receptor in sensory neurons, is in fact characterized by bimodal activation involving store-dependent and store-independent mechanisms. Based on this, we propose a novel concept of TRPM8 activation involving $iPLA_2$ stimulation. Such an activation may play a role at least in the prostate, which is not exposed to any essential temperature variations. The link of $iPLA_2$ to TRPM8 may be important in the establishment of the pro-apoptotic roles of $iPLA_2$ (12,24). Indeed, $iPLA_2$ activation has been implicated in ER stress-induced apoptosis, whilst menthol has been shown to promote apoptosis of LNCaP prostate cancer cells (7). Therefore, it is likely that promotion of apoptosis by menthol in addition to the ER depletion-related mechanism may also include the Ca^{2+} entry component associated with the activation of TRPM8 and SOC channels as a result of $iPLA_2$ stimulation.

We have found that the active substances in the store-dependent mechanism of TRPM8 activation were LPC/LPI, lysophospholipids, which are produced upon $iPLA_2$ stimulation. It is interesting that recently yet another lipid messenger, PIP_2 , has been established as a crucial element in maintaining TRPM8 channel function (5,6). PIP_2 serves as a substrate for PLC, which in response to the

stimulation via PLC-coupled membrane receptors breaks down into the secondary messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). Of these two messengers IP₃ is the major store-releasing agent acting via the ER IP₃ receptors (IP₃-R). The fact that receptor-mediated stimulation of PLC will potentially produce oppositely directed effects on TRPM8 – inhibition via decreasing PIP₂ levels and activation via IP₃-mediated store depletion – seems puzzling. It can be explained assuming differential roles for the two lipid messenger pathways: the PIP₂ primarily controlling TRPM8 *desensitization* (6) while LPLs providing the main chemical *activation* input. In connection with this, it is important that TRPM8 activation by LPLs can occur after channel run-down in PIP₂-depleted inside-out patches (Fig. 3E, H), obviously indicating that the activation mechanism is powerful enough to override the PIP₂-dependent desensitization. Furthermore, it is important to note that the existence of a number of ER sub-compartments has been suggested (25). Therefore, it is quite possible that IP₃R and TRPM8 deplete the ER from different sub-compartments and physiologically, iPLA₂ is activated by store depletion *via* TRPM8 (but not *via* IP₃R). In our work, we used TG as pharmacological tool for ER store depletion and iPLA₂ activation. Further studies are needed to understand this ER - plasma membrane TRPM8 coupling. Overall, these two regulatory lipid-mediated pathways appear to act in parallel and their physiological significance would be primarily determined by the input signal. In case of cold sensation, the interplay between voltage, temperature and PIP₂ levels (6) are the main determinants of the channel activity, but in case of store-dependent activation at physiological temperature, PIP₂ levels would be irrelevant.

When considering the various mechanisms of TRPM8 activation, our single channel recordings have revealed a unique difference in the modes of TRPM8 NP₀ increase. While cooling, depolarization,

menthol and PIP₂ primarily act by accelerating channel openings (i.e., the main effect is to destabilize the closed state of the channel) the effect of LPLs is to stabilize the open state of the channel. This effect was mimicked by TG-induced store depletion providing additional biophysical evidence for the common ion channel mechanism. Our single channel analysis showing differential effects on varying channel conformational states adds to the recent significant developments concerning the requirement of different TRPM8 residues for activation by cold, PIP₂ and menthol (6,26). It should be noted that store-dependent mechanisms have recently been shown to contribute to the activation of such “apparently store-independent” TRP members as TRPM3 (27) and noxious cold-sensitive ANKTM1 (28), although the mediators in this mode of activation remain unknown.

The surface potential of biological membranes varies according to their lipid composition (29). Most lipids are electrically neutral, however PIP₂ is highly negatively charged (for review see (30)). It has recently been shown that positively charged residues in the highly conserved TRP domain of the TRPM8 channels are important for their activation by PIP₂ (6). Here, we show that both conic neutral lysophospholipid (LPC) and conic anionic lysophospholipid (LPI) are potent openers of TRPM8. Therefore, the potential role of alterations in charge distribution in TRPM8 activation by LPLs is not clear.

Interestingly, extracellular application of LPC activated TRPM8 current which could be blocked by CPZ. Thus, LPLs seem to be able to activate TRPM8 not only from the inside, but also from the outside of the membrane. This argues against a simple mechanistic hypothesis that LPLs might exert their action on TRPM8 channel by promoting a certain type of membrane deformation, as intra- and extracellular LPLs would favor the formation of the opposite deformations – cup-like and convex

curvatures, respectively. Inefficiency of anionic amphipaths, which facilitate convex membrane deformation, though via a different mechanism than extracellular LPLs (i.e., due to the negative molecular charge, as opposed to the molecule shape in case of LPLs), also contradicts such a hypothesis. Therefore, it is likely that the action of LPLs on TRPM8 may involve a more complex membrane deformations leading to the changes in the local compression, surface tension and/or splay around the channel core (23) that do not depend on the side of the agent's application. Alternatively, they may directly interact with some determinants of the channel located in its transmembrane core, which is equally accessible from both sides of the membrane. Likewise, the blocking action of cup-forming cationic amphipaths on TRPM8 may also be unrelated to their cup-forming ability.

Indeed, the precise mechanism(s) by which LPLs activate TRPM8 are still not fully understood and should be addressed in future studies. It is now strongly suggested (for review see (31)) that a number of so-called non-bilayer lipids (including LPLs) could affect peripheral and membrane proteins according to a "lateral-pressure" model. It has been demonstrated that the asymmetrical insertion of LPC into sonicated vesicles (which are spheres with the highest curvature that can withstand a phospholipid bilayer) did not change the membrane curvature but was able to induce the formation of surface tension (lateral pressure) (32). The authors suggested that this strain in the membrane can be a physiological way of modulating the conformation of membrane proteins. Lipid asymmetry can also mean a difference in surface density resulting from a difference in the number of lipids between the two coupled monolayers. Such a difference in lipid surface density can be achieved artificially by the addition of LPC to the external surface of a biological membrane. Because of the very slow flip-flop of lipids,

the asymmetrical surface density is stable. However, the mismatch causes a difference in lateral pressure or tension between the two leaflets. In biological membranes, the lateral pressure formed by asymmetrical lipid distribution could affect the structure and function of intrinsic membrane proteins such as TRPM8. It is therefore, quite possible that intracellular addition of LPC also leads to a difference in lateral pressure, which in turn activates TRPM8.

Several members of the TRP family are emerging as candidates as mechanosensors (for review see (33)). Some of them (TRPY and TRPC1) are likely to be directly activated by force conveyed through membrane lipid tension. Others, including TRPN1 (NOMPC), TRPA1, the invertebrate TRPVs Nanchung and Inactive, and perhaps PKD2, are probably directly activated by mechanical force delivered through structural proteins. However, indirect activation by force conveyed to a mechanically sensitive protein that does not form the channel, has also been demonstrated for some types of TRP channels, including osmotically activated channels such as the mammalian TRPV4. In this case, a second messenger carries the signal to a ligand-activated TRP channel. It is therefore, quite possible that TRPM8 activation by lysophospholipids could be explained by one of these mechanisms. Future work focused, on the one hand on determining the specific mechanisms of TRPM8 activation, and on the other, on potential activation of already known mechano-sensitive TRP channels by LPLs, will probably show which activation mechanisms are shared between all these channels.

Our data show the involvement of the iPLA₂ pathway in a previously unsuspected chemical regulation of the TRPM8 channel and suggest that variable degrees of store-dependence may be a common feature in the activation of different TRP channels.

REFERENCES

1. Tsvaler, L., Shapero, M.H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001) *Cancer Res.* **61**, 3760-3769.
2. McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., and Julius, D. (2002) *Nature* **416**, 52-58.
3. Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., and Patapoutian, A. (2002) *Cell* **108**, 705-715.
4. Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004) *Nature* **430**, 748-754.
5. Liu, B., and Qin, F. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 1674-1681.
6. Rohacs, T., Lopes, C.M., Michailidis, I., and Logothetis, D.E. (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 626-634.
7. Zhang, L., and Barritt, G.J. (2004) *Cancer Res.* **64**, 8365-8373.
8. Tsuzuki, K., Xing, H., Ling, J., and Gu, J.G. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 762-771.
9. Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 39423-39435.
10. Wolf, M.J., Wang, J., Turk, J., and Gross, R.W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1522-1526.
11. Kudo, I., and Murakami, M. (2002) *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**, 3-58.
12. Murakami, M. (2004) *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1179-1182.
13. Patel, A.J., Lazdunski, M., and Honore, E. (2001) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**, 422-428.
14. Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10128-10133.
15. Smani, T., Zakharov, S.I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E.S., and Bolotina, V.M. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 113-120.
16. Flemming, P.K., Dedman, A.M., Xu, S.Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C.D., Bateson, A.N., Muraki, K., and Beech, D.J. (2005) *J. Biol. Chem.* **281**, 4977-4982.
17. Vanden Abeele, F., Roudbaraki, M., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15381-15389.
18. Mignen, O., and Shuttleworth, T.J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 9114-9119.

19. Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J.B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30326-30337.
20. Gross, R.W. (1998) *Biochem Soc. Trans.* **26**, 345-349.
21. Smani, T., Zakharov, S.I., Leno, E., Csutora, P., Trepakova, E.S., and Bolotina, V.M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11909-11915.
22. Jenkins, C.M., Han, X., Mancuso, D.J., and Gross, R.W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32807-32814.
23. Lundbaek, J.A., and Andersen, O.S. (1994) *J. Gen. Physiol.* **104**, 645-673.
24. Shinzawa, K., and Tsujimoto, Y. (2003) *J. Cell Biol.* **163**, 1219-1230.
25. Huang, Y., and Putney JW Jr. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19554-19559.
26. Bandell, M., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Orth, A., Mathur, J., Hwang, S.W., and Patapoutian, A. (2006) *Nature Neurosci.* **9**, 493-500.
27. Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K.R., Rich, A., Huang, M., Lin, J.H., Feder, J.N., Janovitz, E.B., Levesque, P.C., and Blonar, M.A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20890-20897.
28. Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Hogestatt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. (2004) *Nature* **427**, 260-265.
29. Yeung, T., Terebiznik, M., Yu, L., Silviu, J., Abidi, W.M., Philips, M., Levine, T., Kapus, A., and Grinstein, S. (2006) *Science* **313**, 347-351.
30. McLaughlin, S., and Murray, D. (2005) *Nature* **438**, 605-611.
31. Van den Brink-van der Laan, E., Killian, J.A., and de Kruijff, B. (2004) *Biochim Biophys Acta.* **1666**, 275-288.
32. Traikia, M., Warschawski, D.E., Lambert, O., Rigaud, J.L., and Devaux, P.F. (2002) *Biophys J.* **83**, 1443-1454.
33. Lin, S.Y., and Corey, D.P. (2005) *Curr Opin Neurobiol.* **15**, 350-357.

FOOTNOTES

This work was supported by grants from INSERM, the Ministère de l'Éducation, La Ligue

Nationale Contre le Cancer, l'ARC, the Nord/Pas-de-Calais region and INTAS. A.Z. was supported by the region Nord/Pas-de-Calais and the Ministère de l'Education. Y.S. was supported by the Ministère de l'Education. The authors wish to thank Dr. W. Gross and Dr. V.M. Bolotina for providing BEL enantiomers. The authors wish to thank Dr. E. Honore concerning the studies of mechanical membrane stretch on trpm8.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. **Heterologously expressed human TRPM8 functions, such as Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release channel.** A, B, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ responses in HEK-293/TRPM8 (TRPM8) and HEK-293/ctrl (control) cells evoked by either menthol (100 μM , A) or TG application (1 μM , B). A "classical" protocol was employed, which permits dissociation of Ca^{2+} release in nominally Ca^{2+} -free external solution (0/Ca) from Ca^{2+} entry in 2 mM Ca^{2+} (2/Ca). Note that 10 μM La^{3+} was co-applied with TG to inhibit SOC, but not TRPM8 channels. C, a summary of the effects of menthol, TG/ La^{3+} and a combination of TG/ La^{3+} plus menthol on the Ca^{2+} entry phase in HEK-293/TRPM8 (TRPM8) and HEK-293/ctrl (control) cells; mean \pm s.e.m. from 10-42 measurements.

Fig. 2. **TRPM8-mediated currents apart from the "classical" activation by cold and menthol are also induced by Ca^{2+} store depletion.** A, mean I-V relationships of the currents recorded under different conditions, as indicated (n=15-39), with representative examples of superimposed current traces shown in the inset and marked by the corresponding symbols. Current traces plotted in the left and right columns were recorded in two different HEK-293/TRPM8 cells; note that the bottom set of traces on the right was acquired at 45°C in the presence of menthol. B, channel activity (cell-attached configuration, 60 mV) is reversibly inhibited by heating. The bottom graph shows channel NP_O as a function of temperature with the $t_{1/2}$ value of 29°C (continuous line). C, I-V relationships of the unitary current (circles) and mean patch current (squares). The latter was measured by integrating 30-second-long recording episodes in the cell-attached configuration at 20°C. Unitary current amplitudes were measured from the amplitude histograms as shown in the inset. A linear fit of the mean data points indicated a 70.4 pS channel conductance and a reversal potential of 3.8 mV. The mean value obtained from individual patches was 73.8 \pm 3.6 pS (n=15). Voltage dependence of the channel activity derived as a ratio of the mean and single-channel I-Vs could be approximated by the Boltzmann equation with the following parameters: maximal NP_O of 0.51 \pm 0.18, the potential of half-maximal activation, $V_{1/2}$, of 116.2 \pm 11.4 mV and the slope factor of 27.5 \pm 1.9 mV (n=8). The top inset shows two high-resolution examples of channel activity at 100 and -60 mV with NP_O values of 1.27 and 0.004, respectively. D, averaged I-V relationships (mean \pm s.e.m.) of membrane currents in HEK-293/TRPM8 (TRPM8, n=6) and HEK-293/ctrl (control, n=5) cells measured at 36°C following cells' pre-treatment with TG (1 μM , 10 min); representative current traces are shown in the inset. E, Upper panels – representative tracings of single TRPM8 activity in the cell-attached patch from HEK-293/TRPM8 cell at 36°C showing its progressive enhancement after 2 min and 5 min TG (1 μM) bath application; membrane potential was -60 mV. The appearance of significant channel activity at negative potentials was associated with about 150 mV TG-induced negative shift of the NP_O voltage

dependence (right plot). Bottom panels – open time distributions at 5 (left) and 10 min (right) after TG application. Note that the number of events (N) is shown conventionally on the square root scale. Exponential components (dotted lines) fitted by the maximum likelihood method showed a progressively larger contribution of the longer open times: at 5 min $\tau_{op1}=0.57$ ms (86% contribution), $\tau_{op2}=1.90$ ms (14%) while at 10 min $\tau_{op1}=0.71$ ms (43%), $\tau_{op2}=4.92$ ms (57%). NP_O increased, respectively virtually from zero to 0.62 and 0.87 after 5 min and 10 min of TG application, respectively. *F*, mean NP_O values before and after 1 μ M TG application measured at room temperature in the cell-attached configuration at 120 mV ($n=10$).

Fig. 3. Involvement of the iPLA₂/lysophospholipid pathway in the store-dependent TRPM8 activation. *A*, Thapsigargin-mediated iPLA₂ induction. iPLA₂ activity was expressed in units: absorbance per minutes per mg of total protein. *B, C*, inhibition of TG- (1 μ M, *A*) and menthol- (100 μ M, *B*) induced $[Ca^{2+}]_c$ responses in HEK-293/TRPM8 cells by pre-treatment with the specific iPLA₂ blocker bromoenol lactone (BEL, 100 μ M, 30 min at 37°C; $n=25-35$). The inset summarizes the antagonistic effects of iPLA₂ impairment either by BEL or by iPLA₂ mRNA antisense (iPLA₂/as) treatment (vs. sense, iPLA₂/s) on menthol-induced $[Ca^{2+}]_c$ rise relative to untreated cells (100%, mean \pm s.e.m., $n=21-25$). *D*, iPLA₂ anti-sense efficiency was calculated on the BEL-dependant iPLA₂ activity (total iPLA₂ activity subtracted by iPLA₂ activity treated with 5 μ M BEL). *E*, representative TRPM8 channel activity recorded at 80 mV (20°C, the closed level is marked as “c”) from the same membrane patch first, in the cell-attached (c-a) configuration, then after formation of the inside-out configuration (i-o) and finally, following application of LPI (10 μ M) to the cytoplasmic side of the membrane; the lowermost traces represent activity from a different inside-out patch held at -80 mV before and after LPC (10 μ M) application to its inner face. *F*, temperature dependence of TRPM8 activity in an inside-out patch approximated by a sigmoidal curve with $t_{1/2}=25.5^\circ$ C. Membrane potential was 80 mV (two representative current traces recorded at 20 and 32°C are shown in the inset). *G*, The time course of NP_O changes (measured in 2 s intervals at 80 mV) upon inside-out patch excision (i-o) followed by LPI bath application (10 μ M). *H*, Summary of TRPM8 channel activity (expressed as NP_O) in cell-attached patches from BEL-treated HEK-293/TRPM8 cells in response to TG (1 μ M, $n=4$) and in inside-out patches from HEK-293/TRPM8 cells in the presence of either LPC ($n=6$) or LPI ($n=4$) from their cytoplasmic side. Control denotes NP_O measured at 80 mV in inside-out patches (i.e., combined controls for LPC and LPI, $n=10$). *I*, Comparison of the open time distributions for TRPM8 activity enhanced by membrane depolarization, menthol and either LPC or LPI application, as indicated. Top left, in the cell-attached patch the histogram was approximated by one exponential component with the time constant of 0.34, 0.44, 0.56 and 0.94 ms at 60, 80, 100 and 120 mV, respectively, while NP_O in the same range of potentials increased from 0.01 to 0.54, which was mainly due to a significant increase in the frequency of openings (e.g., 247 Hz at 60 mV vs. 713 Hz at 120 mV). Bottom left, in another patch held with a menthol-containing pipette (250 μ M) at 150 mV longer channel openings were apparent, but they made a trivial contribution: $\tau_{op1}=0.68$ ms (98%) and $\tau_{op2}=2.08$ ms (2%). In contrast, these were much more pronounced when LPC or LPI were applied to inside-out patches, as shown on the right, with the best-fit parameters as follows: LPC – $\tau_{op1}=0.44$ ms (60%), $\tau_{op2}=17.72$ ms (40%); LPI – $\tau_{op1}=0.62$ ms (28%), $\tau_{op2}=13.09$ ms (72%).

Fig. 4. Modulation of TRPM8 by lipid bilayer-modifying agents. *A, B*, antagonizing effects of cup-forming cationic amphipaths (see text for details), chlorpromazine (CPZ, 1 μ M, *A*) and

tetracaine (100 μ M, *B*) on menthol- (100 μ M) induced $[Ca^{2+}]_c$ responses in HEK-293/TRPM8 cells; mean \pm s.e.m., n=27-22; interventions are marked by horizontal bars. *C*, representative voltage ramp-derived I-V relationships demonstrating the blockade of menthol- (100 μ M) activated current by chlorpromazine (CPZ, 1 μ M) in HEK-293/TRPM8 cell; inset shows time-courses of the current (measured at \pm 100 mV) changes in the same cell in response to the respective interventions (marked by horizontal bars). *D*, representative recordings from two HEK-293/TRPM8 cell-attached patches at room temperature showing basal TRPM8-mediated single-channel activity under control conditions (left) and its suppression by inclusion of cup-former tetracaine (100 μ M, right) in the pipette. *E*, time-courses of the current (measured at \pm 100 mV) changes in the same cell in response to lysophosphatidylcholine (LPC, 10 μ M) and its antagonization by chlorpromazine (CPZ, 1 μ M) in HEK-293/TRPM8 cell; before LPC the responsiveness of the cell was tested by menthol (100 μ M). Experiments on panels A-C and E were conducted at 32 $^\circ$ C.

Fig. 5. Schematic depiction of TRPM8 activation modes evident from our study. Cold/menthol by acting directly on plasma membrane(PM)-localized TRPM8 via an as yet unknown mechanism in case of cold and via TRP and S2 domains in case of menthol²⁶ cause its partial activation resulting in a conduction of the store-independent current component ($I_{TRPM8/SI}$). Simultaneous activation by cold/menthol of TRPM8 localized in the endoplasmic reticulum membrane (ERM) evokes store depletion and stimulation of the Ca^{2+} -independent phospholipase A₂ (iPLA₂) via displacement of the inhibitory calmodulin (CaM). It results in the generation of lysophospholipids, LPC/LPI, which activate PM-localized TRPM8 as well as store-operated channels (SOC) in a “membrane-delimited” fashion. The store/iPLA₂/LPC/LPI pathway leads to the activation of a store-dependent TRPM8-carried current component ($I_{TRPM8/SD}$). The same store/iPLA₂/LPC/LPI pathway for TRPM8 activation can be recruited by store depletion via ER leak channels as a result of SERCA pump inhibition by thapsigargin.

Figure 1

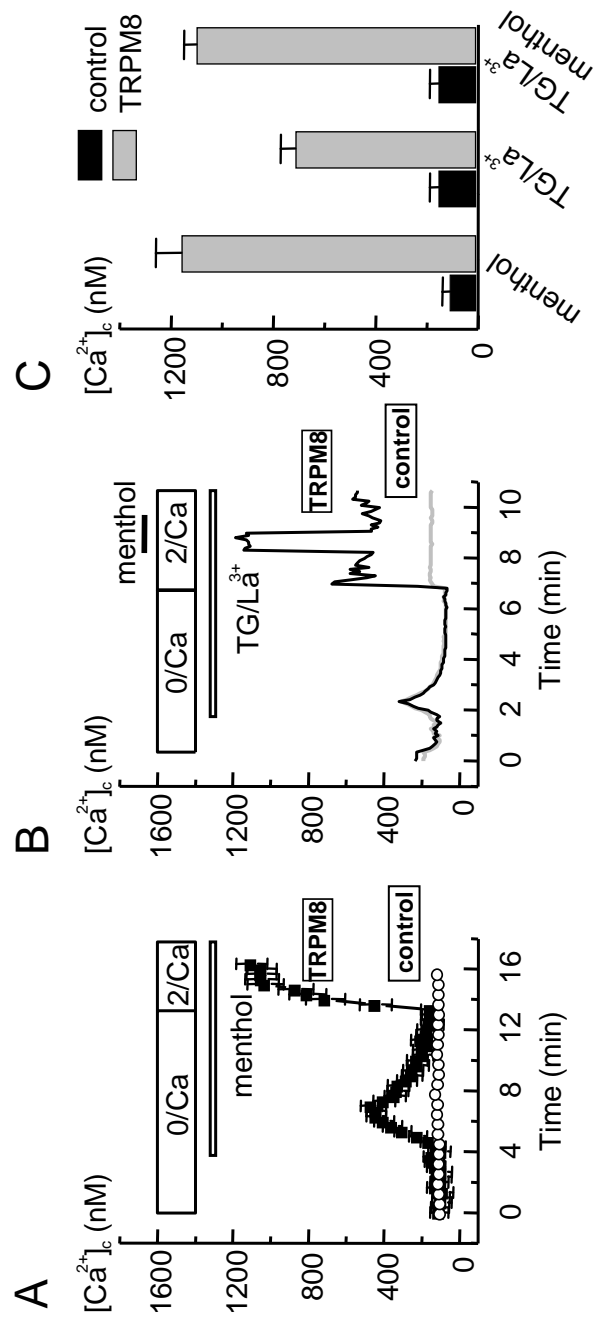


Figure 2

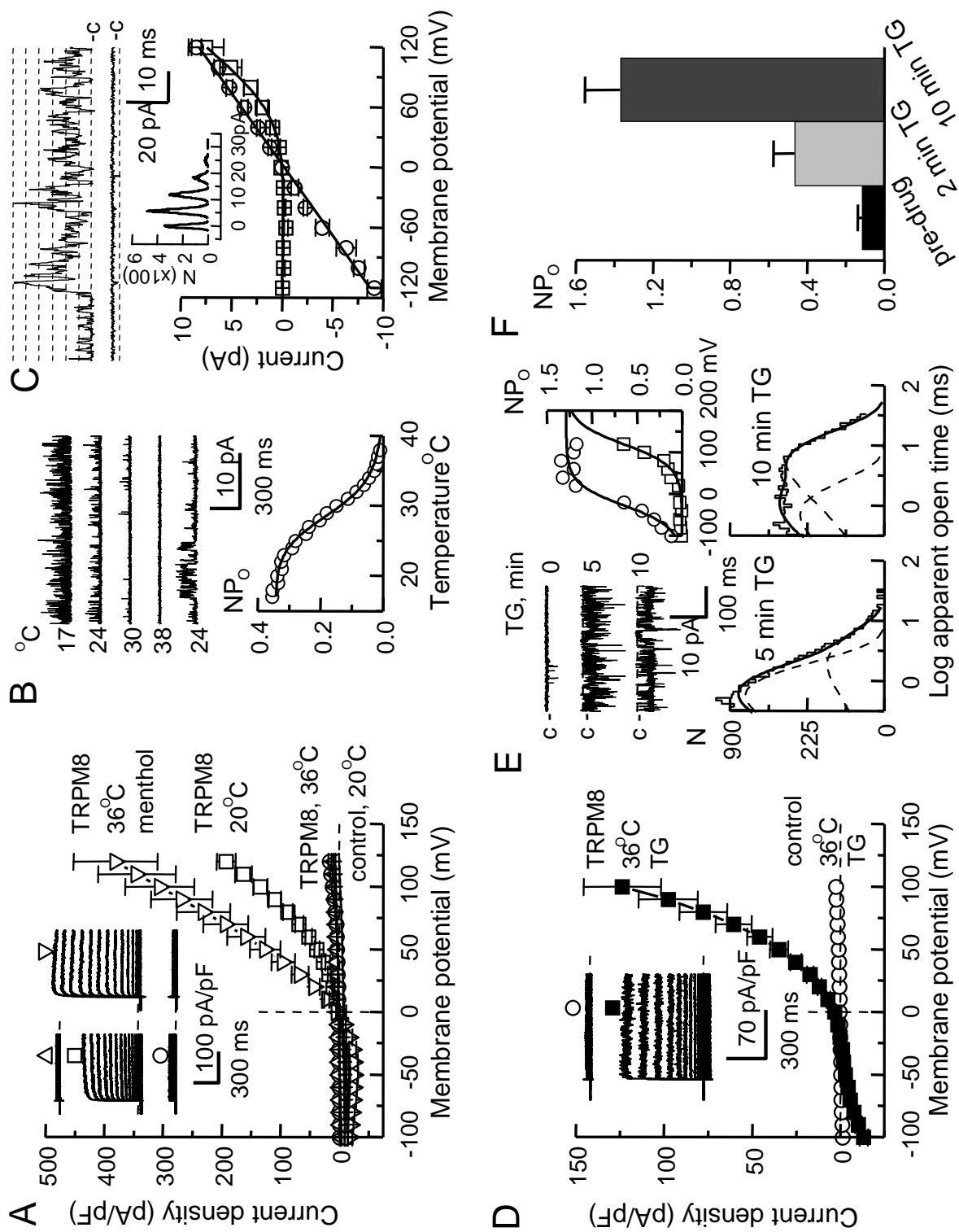


Figure 3

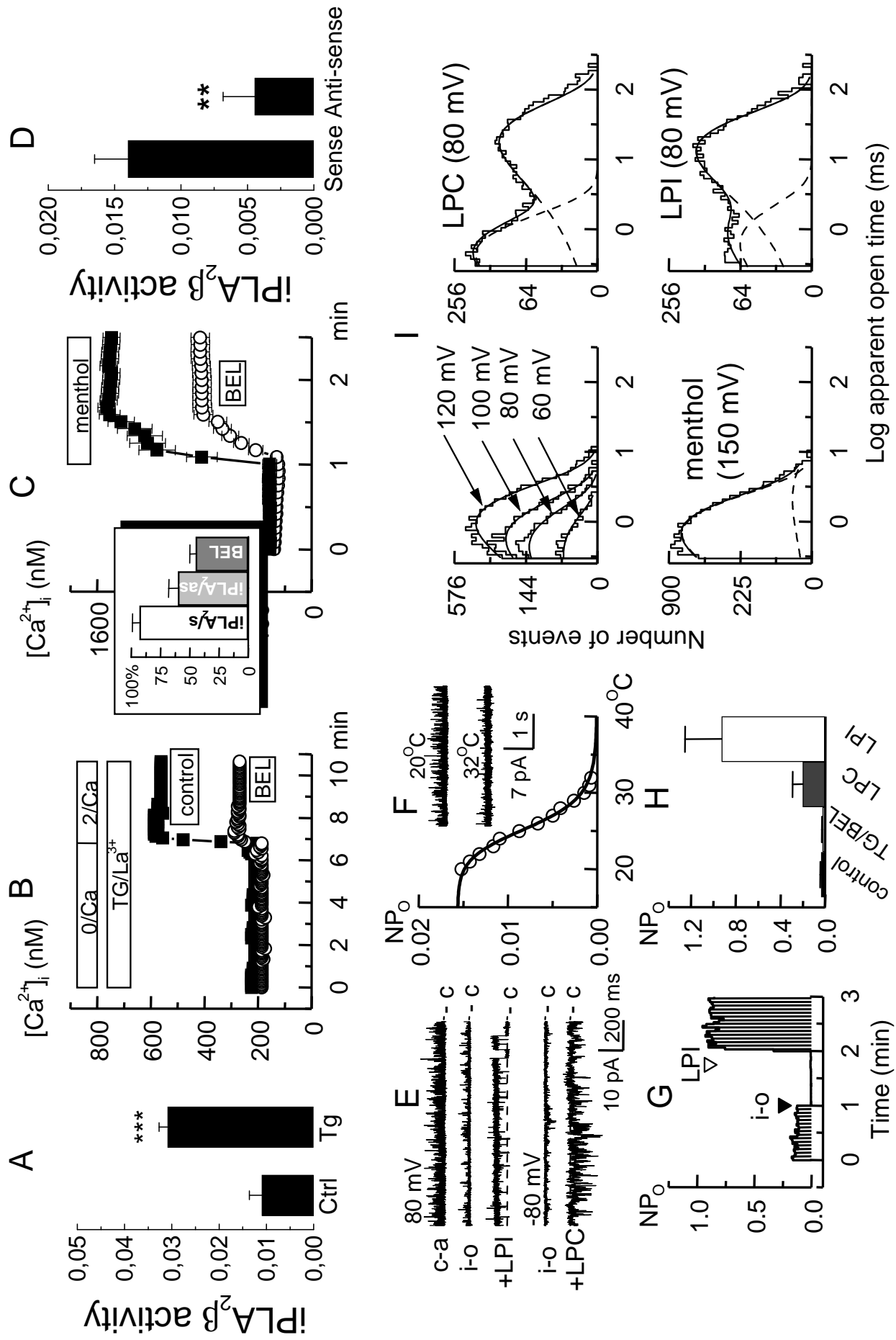


Figure 4

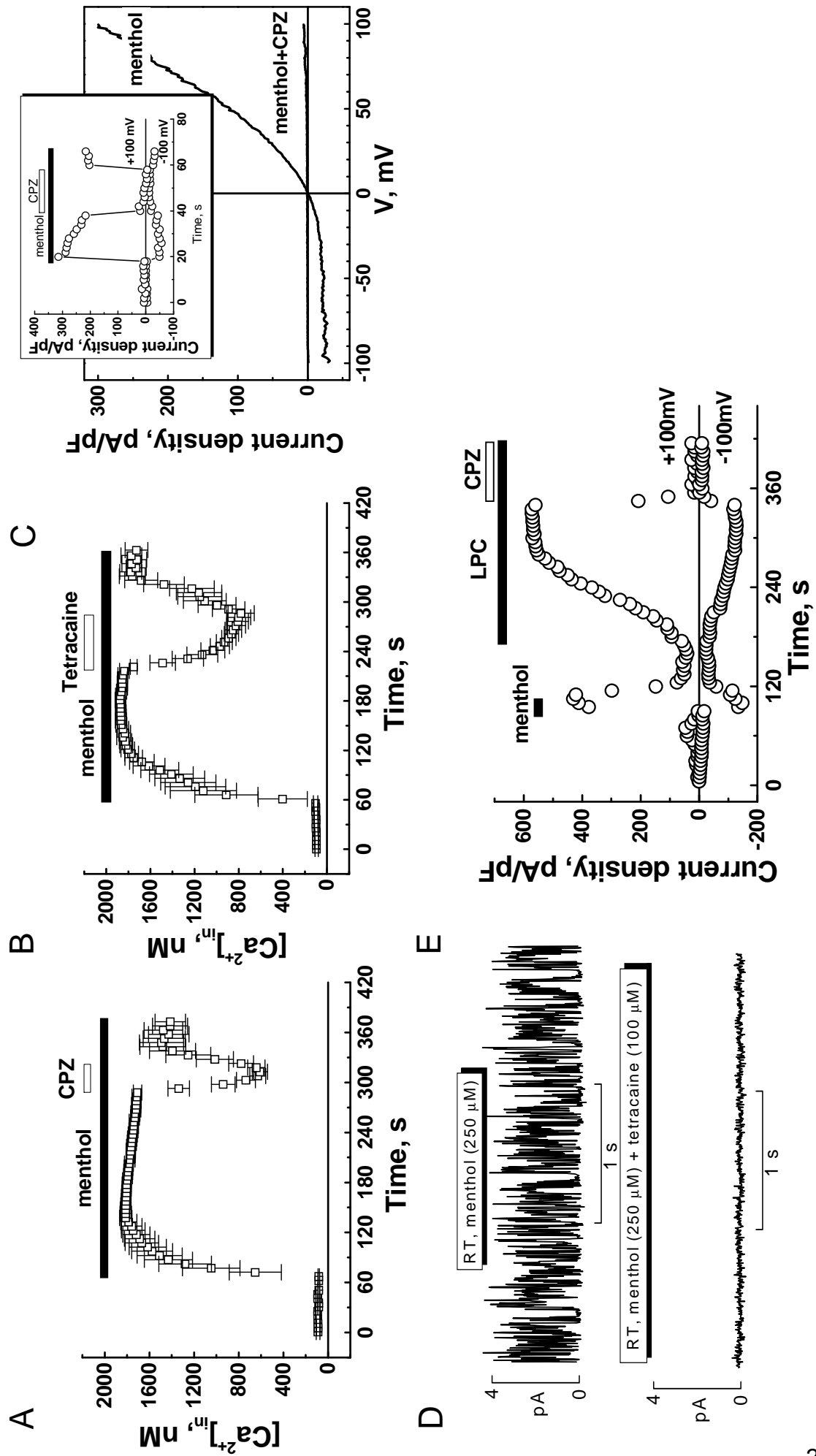
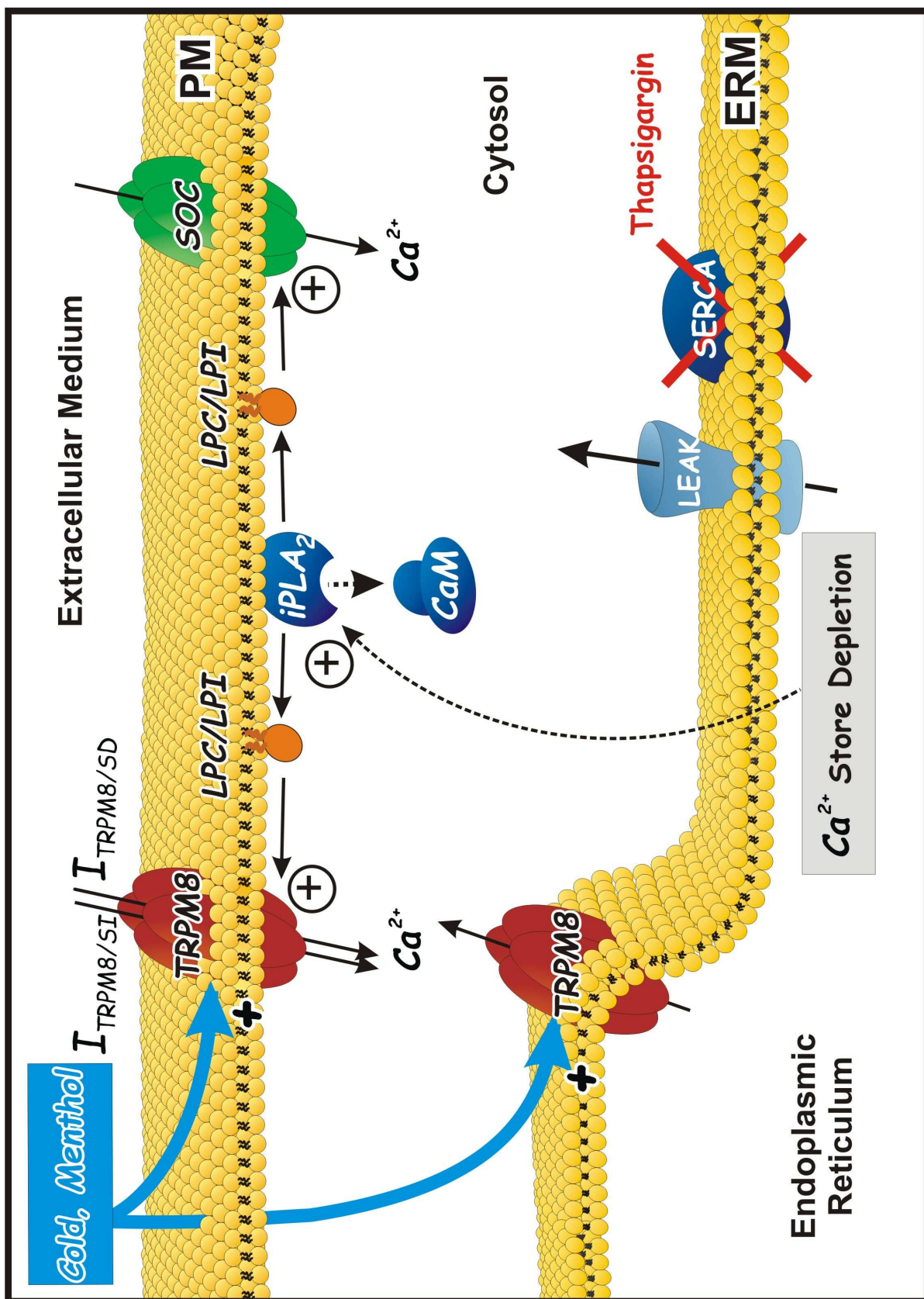


Figure 5



III.B) Article 6

“Prospects for prostate cancer imaging and therapy using high-affinity TRPM8 activators”

Benjamin Beck, Gabriel Bidaux, Alexis Bavencoffe, Loïc Lemonnier, Stephanie Thebault, Yaroslav Shuba, Greg Barrit, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya (Cell Calcium. 2006 Aug 31; [Epub ahead of print]).

Dans cet article, nous décrivons l'activation du canal TRPM8 par une nouvelle classe de molécule. L'un de ces composants : WS-12 possède une affinité pour TRPM8 2000 fois supérieure à celle du menthol, ce qui fait de lui la molécule activatrice la plus affine pour TRPM8.

La génération de substances dérivées de l'iciline ou du menthol par l'industrie pharmaco-chimique a considérablement augmenté les outils pharmacologiques dont nous disposons pour mener à bien notre projet de recherche sur TRPM8. Le développement des composants appelé « WS » à partir de l'iciline, nous a offert l'opportunité de cribler ces molécules sur l'activité de TRPM8 dans le but de trouver des molécules activatrices plus affines. La génération de notre modèle inductible HEK-TRPM8 a facilité ce travail tout en permettant l'obtention de résultats très reproductibles.

Ma participation à ce travail a consisté à construire la lignée HEK-TRPM8 et à réaliser une étude sur la cinétique d'expression du modèle afin de définir les paramètres d'induction optimale dans le but d'améliorer la reproductibilité des expériences.



Prospects for prostate cancer imaging and therapy using high-affinity TRPM8 activators

Benjamin Beck^{a,b}, Gabriel Bidaux^{a,b}, Alexis Bavencoffe^{a,b}, Loic Lemonnier^c,
Stephanie Thebault^d, Yaroslav Shuba^e, Greg Barrit^f, Roman Skryma^{a,b,1},
Natalia Prevarskaya^{a,b,*,1}

^a Inserm, U800, Equipe Labellisée par la Ligue Contre le Cancer, Villeneuve d'Ascq F-59650, France

^b Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq F-59650, France

^c National Institute of Environmental Health Sciences, NIH, Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC 27709, USA

^d Department of Physiology, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Center, P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

^e Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kiev, Ukraine

^f Department of Medical Biochemistry School of Medicine, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide SA 5001, Australia

Received 23 June 2006; accepted 11 July 2006

Abstract

One of the best-studied temperature-gated channels is transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8), which is activated by cold and cooling agents, such as menthol. Besides inducing a cooling sensation in sensory neurons, TRPM8 channel activation also plays a major role in physiopathology. Indeed, TRPM8 expression increases in early stages of prostate cancer and its involvement in prostate cell apoptosis has recently been demonstrated. Thus, as TRPM8 is a tumor marker with significant potential use in diagnosis, as well as a target for cancer therapy, there is a need for new TRPM8-specific ligands. In this study, we investigated the action of “WS” compounds on TRPM8 channels. We compared the affinity of these molecules to that of menthol and icilin. This enabled us to identify new TRPM8 agonists. The menthol analog with the highest affinity, WS-12, had an EC₅₀ value about 2000 times lower than that of menthol and is, therefore, the highest-affinity TRPM8 ligand known to date. Finally, incorporating a fluorine atom in the WS-12 retained 75% of the activity of the parent compound. The high affinity of this new TRPM8 ligand and the possibility of incorporating a radiohalogen could thus be useful for diagnosis, monitoring and, perhaps, even therapy of prostate cancer.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: TRPM8 channels; Cold; Menthol; Imaging; Radiotherapy; Prostate cancer

1. Introduction

Over the last decade, many studies have investigated the mechanisms ruling thermosensation. The structures responsible for this temperature sensitivity are ion channels in the transient receptor potential (TRP) superfamily. Indeed, several proteins in this family are activated by sensory stimuli, including temperature [1,2]. Hence, members of the TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin) and TRPA (ankyrin) subfamilies in thermosensation are known as thermo-TRPs [3]. To date, the best-studied temperature-gated channels

Abbreviations: TRP, transient receptor potential; WS-11, 2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (2-hydroxy-1,1-dimethyl-ethyl)-amide; WS-12, (2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (4-methoxyphenyl)-amide); WS-14, 2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid *tert*-butylamide

* Correspondence to: Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Bat. SN 3, UFR de Biologie, USTL, Villeneuve d'Ascq 59650, France. Tel.: +33 3 20 33 60 18; fax: +33 3 20 43 40 66.

E-mail address: natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr (N. Prevarskaya).

¹ Share the senior authorship.

are TRPV1, activated by high temperatures (>42 °C) and TRPM8, activated by cold (<28 °C).

Certain chemical agonists also evoke psychophysical sensations of heat or cold [4–6]. Thus, capsaicin, the active compound in hot pepper, is involved in the sensation of heat via TRPV1 activation, while menthol is responsible for a cooling sensation, via TRPM8 gating. It is now well known that menthol, as well as other cooling agents like icilin, modulate TRPM8 channel activation. Moreover, different compounds have varying impacts on channel activation. For example, icilin is a synthetic “super cooling” agent, –200-fold more potent than menthol. These differences may be related to the mechanism within which the compounds activate human TRPM8, as menthol and icilin have no common structure and a mutation in a single amino acid on TRPM8 inhibits sensitivity to icilin but not to cold or menthol [7].

Beyond the cooling sensation induced by TRPM8 activation in sensory neurons, this channel seems to play a major role in physiopathology. Indeed, it has been observed that abnormal TRPM8 expression is associated with a cancerous phenotype that includes breast, lung, colon and prostate tissue [8]. In the prostate, TRPM8 expression, regulated by androgens, increases at early stages in cancer [9,10]. Furthermore, it has recently been demonstrated that TRPM8 is involved in epithelial prostate cancer cells survival. Indeed, the authors showed that menthol enhanced apoptosis of lymph node carcinoma of prostate cells (LNCaP) via stimulation of the TRPM8 receptor, pointing to a potential involvement of TRPM8 channels in cancer cell growth [10]. Nevertheless, the physiological agonist of TRPM8 is still unknown. Thus, identifying the mechanism that controls TRPM8 gating as well as finding new specific activators are crucial factors for developing cancer therapy.

In this study, therefore, we have further investigated TRPM8 channel pharmacology, especially the action of “WS” compounds, chemically related to menthol. “WS” are compounds developed in the seventies in order to increase the ability of menthol to evoke cold on skin and in the oral cavity. We used the patch clamp technique to test the action of several WS compounds, derived from a menthol structure, on TRPM8 over-expressing HEK cells. We then studied the action of the most affine compound on prostate cancer cells from the LNCaP cell line to assess the efficiency of menthol analogs on endogenous TRPM8 channels. Finally, we tested a parent compound with an incorporated halogen, which could be used as a specific marker for PET scan imaging of prostate cancer. Finally, we propose these new, very high-affinity compounds as potential drugs for prostate cancer imaging and even therapy.

2. Materials and methods

2.1. Establishing the TRPM8-inducible HEK cell line–cell culture

HEK cell line overexpressing tetracyclin-sensitive repressor (Hek T-RexTM, Invitrogen Inc.) was transfected with 2 µg hTRPM8pcDNA4 plasmid (as described in literature [11]) in a six-well plate for 6 h using a Gene PorterTM 2 reagent (Gene Therapy Systems, Inc. (GTS) San Diego).

The cells in culture were then maintained under selected pressures with 150 µg/mL Zeocin (Invitrogen Inc.) and 5 µg/mL blasticidin (Invitrogen Inc.) for about 10 days. The 10 colonies were identified using RT-PCR and calcium imaging, then subcloned and maintained under the selected pressure for a further week. Parameters for tetracycline induction were determined with Western-blot and calcium imaging experiments. Cells were then routinely induced with 2 µg/mL Tetracyclin for 12–24 h.

LNCaP cells from the American Type Culture Collection were cultured as previously described [11].

2.2. Analysis of TRPM8 mRNA expression (standard RT-PCR)

Total RNA was isolated using the guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction procedure [12]. After a DNase I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) treatment, 2 µg total RNA was reverse transcribed into cDNA at 42 °C using random hexamer primers (Perkin-Elmer) and MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer), followed by PCR as described below. The PCR primers used for each experiment are listed in Table 1. For PCR, 1 µL RT template was added to a mixture of (final concentrations): 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 250 nM forward and reverse primers and 1 U AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer), in a final volume of 25 µL. DNA amplification conditions included an initial 5 min denaturation step at 95 °C, followed by 27–40 cycles (depending on the gene of interest) consisting of 30 s at 95 °C, 30 s at 58 °C, 40 s at 72 °C and, finally, 5 min at 72 °C.

2.3. Western-blot assay

Total protein from TRPM8-HEK-cells was harvested in PBS then sonicated in an ice-cold buffer (pH 7.2) containing (in mM) 20 HEPES, 50 NaCl, 10 EDTA, 1 EGTA, 1 PMSF, 1% NP40, a mixture of protease inhibitors (Sigma, L’Isle d’Abeau Chesnes, France) and a phosphatase inhibitor

Table 1
Sequence of selected oligonucleotides used as RT-PCR primers

Target fragments	5'-Forward-3'	5'-Reverse-3'	Expected size (bp)	Accession number
TRPM8	GATTTTCACCAATGACCGCCG	CCCCAGCAGCATTGATGTCG	503	AY328400
β-Actin	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	210	NM.001101

(sodium orthovanadate, Sigma). After a 10 min centrifugation (12,000 × g) to eliminate all organelles, the supernatant was recovered and total protein content was measured with BCA kit (Samples were electrophoretically analyzed on 10% polyacrylamide gel using the SDS-PAGE technique. The proteins were then transferred for 1.30 h (50 mA, 25 V) onto a PVDF membrane using a semi-dry electroblotter (Bio-Rad). The membrane was blocked in 5% TNT-milk (15 mM Tris buffer pH 8, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and 5% non-fat dry milk) with 5% donkey serum (Chemicon International Inc.) at room temperature for 30 min, then soaked in a 1/2000 diluted primary rabbit polyclonal anti-TRPM8 antibody (code: ab3243, Abcam, Cambridge, UK) in 3% TNT-milk at +4 °C overnight. After rinsing three times in TNT for 15 min each time, the membrane was transferred into anti-rabbit-IgG horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Chemicon, USA), diluted in 3% TNT-milk (1/20,000) for 1 h. After three 10-min washes in TNT, the membranes were processed for chemiluminescent detection using Supersignal West Dura chemiluminescent substrate (Pierce, Chemical Company, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. The blots were then exposed to X-Omat AR films (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

2.4. Patch-clamp recordings

Membrane currents in HEK cells were recorded in the whole-cell configuration using the patch-clamp technique and a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic, Germany), as previously described [13]. Patch pipettes were made on a P-97 puller (Sutter, USA) from borosilicate glass capillaries (WPI, USA). Patch-pipettes (resistance 3–5 MΩ) were filled with the following solution (in mM): KCl 120, MgCl₂ 1, EGTA 4, CaCl₂ 2.5 (calculated free Ca²⁺ concentration: 150 nM), HEPES 10, pH adjusted to 7.3 with KOH (osmolality: 305 mosmol/L). Extracellular solution used to record TRPM8 current contained (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 0.3 Na₂HPO₄, 0.4 KH₂PO₄, 4 NaHCO₃, 5 glucose, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with NaOH), osmolality: 330 mosmol/L).

Membrane currents in LNCaP cells were recorded in the whole-cell configuration using the patch-clamp technique, as previously described [13]. Extracellular solution used to record Ca²⁺-carried I_{SO}C contained (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 glucose, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with TEA-OH). The pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs Methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA, 6 MgCl₂ (pH adjusted to 7.2 with CsOH).

2.5. Calcium imaging

Calcium imaging experiments have been performed as described previously [11]. Briefly, [Ca²⁺]_{cyt} was measured using ratiometric dye FURA-2 and quantified according to Grynkiewicz and Tsien formula [14]. The bath

solution contained in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 0.3 Na₂HPO₄, 0.4 KH₂PO₄, 4 NaHCO₃, 5 glucose, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with NaOH), osmolality 330 mosmol/L). For Ca²⁺-free HBSS, CaCl₂ was removed and EGTA (0.5 mM) added.

2.6. Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). The final concentration of ethanol and DMSO in the experimental solution did not exceed 0.1%.

WS-11, 2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (2-hydroxy-1,1-dimethyl-ethyl)-amide; WS-12, (2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (4-methoxyphenyl)-amide); WS-14, 2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid *tert*-butylamide; were kindly provided by Pr Edward T. Wei and developed by Wilkinson Sword [15]. WS-12-F was synthesized in the laboratory of Dr. Ahamindra Jain, College of Chemistry, at the University of California at Berkeley.

3. Results

In a first time, we have established a TRPM8-inducible HEK cell line using a HEK cell line overexpressing tetracyclin-sensitive repressor (described in Section 2). By using RT-PCR, we checked that without tetracycline in the growth medium, TRPM8-HEK cells did not express TRPM8 mRNA and so, confirmed the action of the repressor (Fig. 1A). Moreover, using immunocytochemistry, we observed TRPM8 protein expression from 6 to 48 h following the induction by tetracycline (2 μg/mL). In view of the stable level of TRPM8 protein expression, we chose to work from 24 to 48 h after induction (Fig. 1B).

In these conditions, application of menthol (500 μM), the most classical cooling agent, induced a large outward current (285.93 ± 23.44 pA/pF at +100 mV, *n* = 174) in TRPM8 expressing HEK cells (Fig. 2A). In this model, cold- (21 °C) and menthol-evoked TRPM8 currents were outwardly rectifying, as shown on a voltage ramp evoked current/voltage (I/V) relationship (Fig. 2B). This feature is indeed, typical of TRPM8 in literature and the consequence of a rapid and voltage-dependent closure of the channels at negative voltages [16]. Menthol-induced TRPM8 current was also characterized by slow activation for positive potential (>20 mV) as demonstrated by voltage step stimulation. The TRPM8 I/V relationship showed a reversion potential close to 0 mV, suggesting a non-selective cationic selectivity of the channel (Fig. 2C). Hence, by using calcium imaging and FURA-2 loaded TRPM8-HEK cells, we observed that perfusion of menthol (500 μM) or icilin (10 μM), the so called "super cooling agent", induced a calcium entry, demonstrating that TRPM8 carries calcium amongst other cations (Fig. 2D). Moreover, menthol- and icilin-evoked cytoplasmic calcium entries had distinct kinetics. Menthol, indeed, induced a sus-

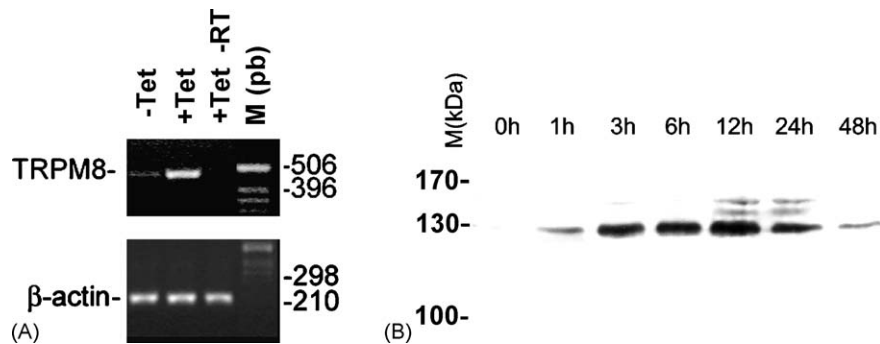


Fig. 1. (A) Measurement of TRPM8 mRNA expression by RT-PCR in TRPM8-HEK cells: without induction of TRPM8 expression by tetracycline (-Tet), 24 h after induction by tetracycline (+Tet) and under the same conditions without reverse transcriptase (+Tet-RT). (B) Kinetic of TRPM8 protein expression in Western-blot experiments. TRPM8 protein expression was recorded from 0 h (before induction) to 48 h.

tained calcium entry (499.21 ± 50.02 nM, $n = 348$), while icilin evoked a transient calcium influx (599.05 ± 42.47 nM; $n = 191$), suggesting different mechanisms of TRPM8 activation, as proposed in literature [7,17].

3.1. The effect of WS compounds on heterologously expressed TRPM8 in HEK 293 cells

We have then studied the action of menthol analogs on TRPM8-HEK cells, WS-11 (2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (2-hydroxy-1,1-dimethyl-ethyl)-amide) and WS-14 (2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid *tert*-butylamide). WS are compounds developed in the

seventies in order to increase the ability of menthol to evoke cold on skin and in the oral cavity. Perfusion of WS-11 or WS-14 activated TRPM8 current in TRPM8-HEK cells, like cold or menthol (Fig. 3A). In order to assess the affinity of each compound, we have then studied the dose response of TRPM8 to WS-11 and WS-14. By measuring the maximal current activated by WS-11 and WS-14 between 10^{-8} and 10^{-3} M at +100 mV, we figured out an EC_{50} value at respectively 6.25 and 21.19 μ M (Fig. 3B). These values were therefore lower than the EC_{50} value of menthol-evoked TRPM8 current (~ 100 μ M) but higher than the EC_{50} value of icilin-evoked TRPM8 current (~ 0.5 μ M) described in literature [16,18]. Given the analogy between WS-11, WS-14

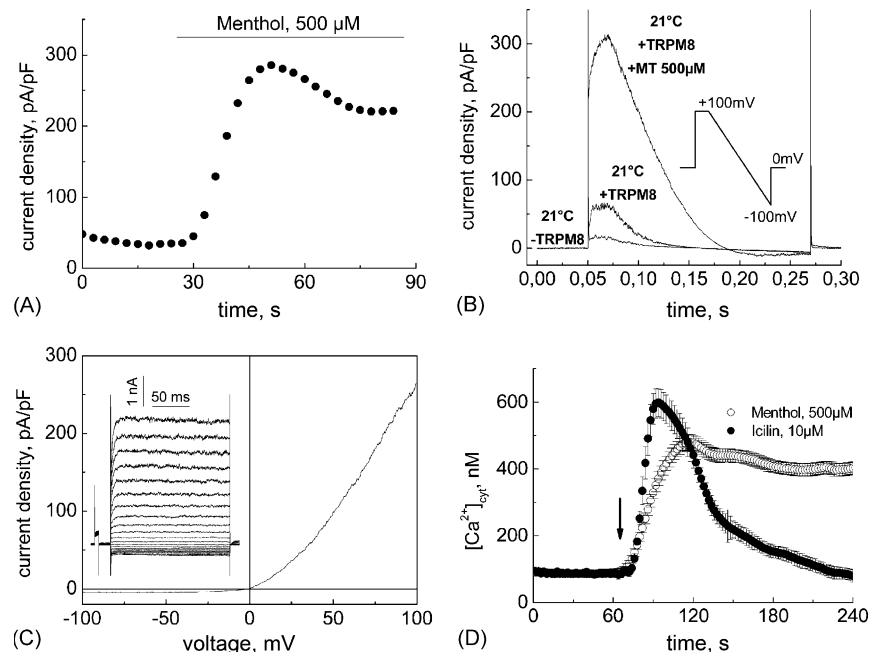


Fig. 2. Activation of TRPM8 current in TRPM8 over-expressing HEK cells (A) Time course of menthol-evoked current at +100 mV in a representative TRPM8-HEK cell. (B) Representative currents recorded after stimulation by a voltage ramp protocol between +100 and -100 mV (insert). Representative current from TRPM8-HEK cells stimulated by menthol and cold (21 °C) after induction by tetracycline (+TRPM8) or without induction (-TRPM8). (C) Representative current/voltage (I/V) relationship of menthol-induced TRPM8 current in HEK cells obtained from voltage ramp stimulation. Representative voltage step stimulation induced I/V relationship and its scale are represented as an inset. (D) Measurement of cytoplasmic calcium concentration increase activated by menthol (open circles) and icilin (black circles) in TRPM8-expressing cells ($n = 59$ per condition). Arrow indicates menthol and icilin application.

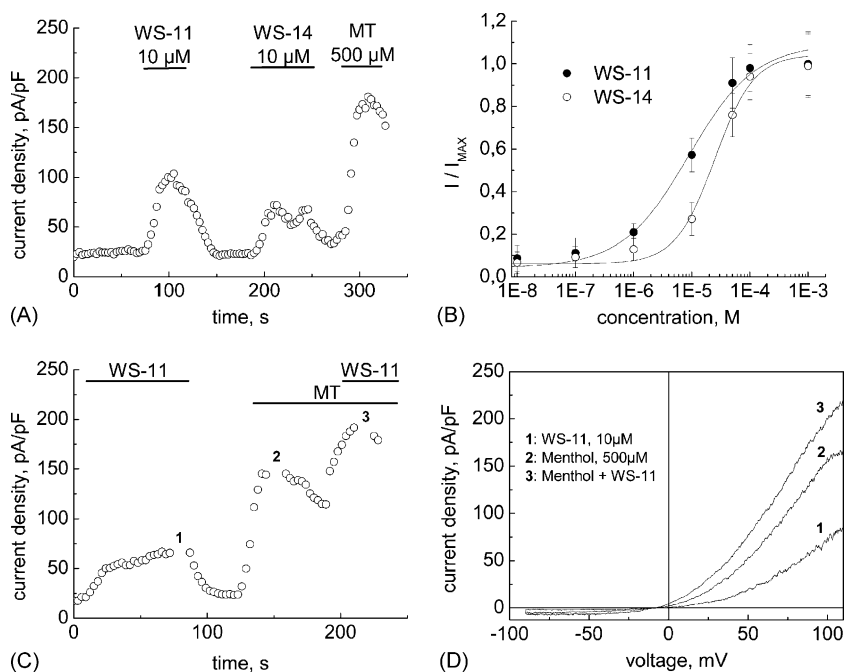


Fig. 3. Action of two menthol analogs, WS-11 and -14 on TRPM8. (A) Time course of TRPM8 current at +100 mV in a representative cell. Application of WS-11 (10 μ M), WS-14 (10 μ M) and menthol (500 μ M) are represented by corresponding bars. (B) Dose response relationship of WS-11 (black circles) and WS-14 (open circles) evoked TRPM8 current recorded at +100 mV. (C) Time course of TRPM8 current at +100 mV. Application of WS 11 (10 μ M) and menthol (500 μ M) are represented by the upper bars. The figures indicated above the layout represent the moment when the I/V relationships in figure D were measured. (D) I/V relationship of maximal TRPM8 current activated by: (1) WS-11, (2) menthol and (3) WS-11 with menthol simultaneously.

and menthol, we have then studied the potential cooperation of each compound on TRPM8. So, we observed that perfusion of WS-11 (10 μ M) on maximal menthol-activated current induced an additive current (Fig. 3C) and observed the same phenomenon with the WS-14 (not illustrated). Investigation of the I/V relationship showed that addition of WS-11 on menthol-evoked current altered neither the outward rectification nor the reversion potential, demonstrating that the overlap we observed was not the consequence of an increase in the leak current (Fig. 3D). This result demonstrated that there was a cooperation of WS-11 and menthol on TRPM8. Thus, WS-11 and WS-14 seemed to activate TRPM8 channels apparently without competition with menthol.

We have then studied another menthol analog, WS-12 (2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (4-methoxy-phenyl)-amide). Using the patch clamp technique, we observed that perfusion of a low concentration of WS-12 activated typical TRPM8 current in TRPM8-HEK cells (Fig. 4A). It was characterized by outward rectification, slow activation for positive potential and a reversion potential close to 0 mV (Fig. 4B and C). Nevertheless, maximum WS-12-activated current (77.17 ± 12.66 pA/pF; $n = 45$) was significantly lower than maximum menthol-evoked current (285.9 ± 11.84 pA/pF; $n = 174$) but close to maximum icilin-evoked current (72.08 ± 12.75 pA/pF; $n = 111$). As shown in Fig. 4D, WS-12 had a very low EC_{50} value. Indeed, the EC_{50} value of 39 nM was significantly lower than the icilin-related EC_{50} value (0.499 μ M) and 2000 times

lower than menthol-related EC_{50} value (83.6 μ M) in this model.

In view of the similarities between the icilin- and WS-12-evoked currents and the difference between each of these currents and the menthol-evoked current, we then studied the interaction between the icilin- and WS-12-evoked TRPM8 currents on the one hand and the menthol-evoked currents on the other. We observed that the application of icilin during the maximum of the menthol-evoked current, induced rapid inhibition of the TRPM8 current and maintained current density at the same level as the current evoked by icilin alone (Fig. 5A and B). This result suggested that icilin and menthol activated TRPM8 channels in different, competing, ways, as proposed in literature [7]. Similarly, perfusion of WS-12, during maximum menthol-evoked TRPM8 current, did not induce an additive current, but rapidly inhibited the current to a significant extent. Intriguingly, the remaining current was equal to WS-12-evoked current alone (Fig. 5C and D). Thus, icilin and WS-12 each induced similar, reversible, TRPM8 currents that inhibited the effect of menthol. This suggests that WS-12 and icilin may each activate TRPM8 in the same way, which is different to the pathway of activation by menthol.

3.2. The effect of WS compounds on endogenous TRPM8 in LNCaP cells

In view of the results for WS-12, especially the very low EC_{50} value, we studied the effect of this compound on

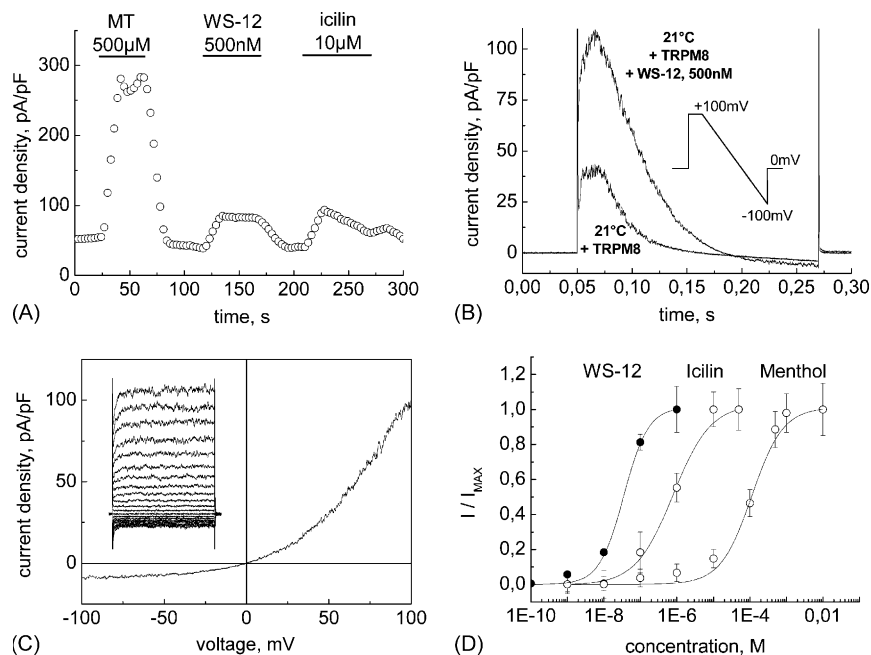


Fig. 4. Action of WS-12 on TRPM8 in TRPM8-HEK cells. (A) Time course of TRPM8 current followed at +100 mV in a representative cell. Application of menthol (500 μ M), WS 12 (500 nM) and icilin (10 μ M) are represented by corresponding bars. (B) Representative currents, in a TRPM8-HEK cell, evoked by WS-12 (500 nM) or cold (21 $^{\circ}$ C), recorded after stimulation by a voltage-ramp protocol between +100 and -100 mV (inset). (C) Representative current/voltage (I/V) relationship of menthol-induced TRPM8 current in a TRPM8-HEK cell, obtained by voltage-step stimulation. A voltage-step stimulation induced current is represented as an inset. (D) Dose response relationship of WS-12 (black circles), icilin (gray circles) and menthol (open circles) evoked TRPM8 current recorded at +100 mV.

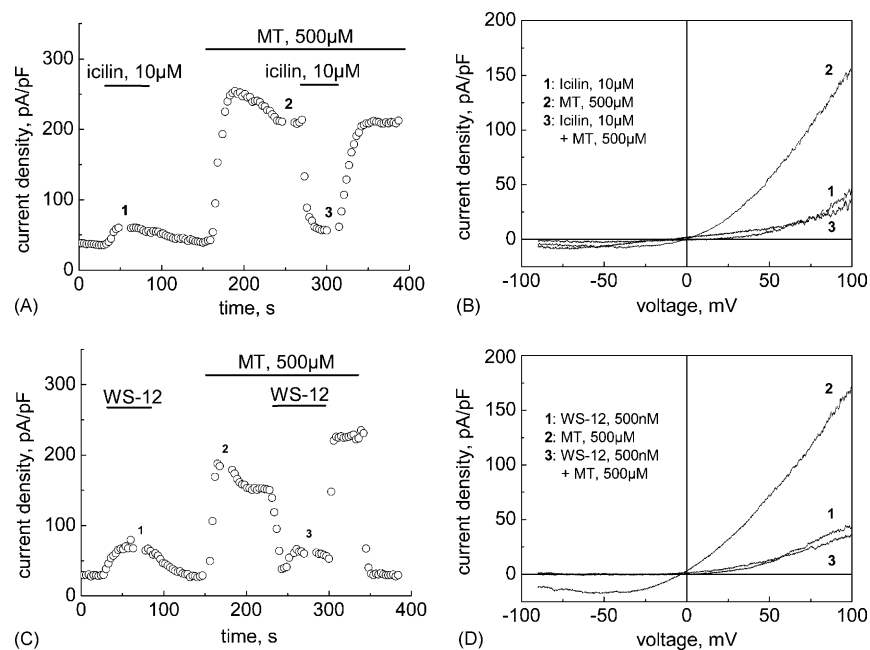


Fig. 5. Comparison of WS-12 and icilin to the effect of menthol on TRPM8 (A) Time course of TRPM8 current followed at +100 mV. Application of icilin (10 μ M) and menthol (500 μ M) are represented by upper bars. The figures indicated above the layout represent the moment when the I/V relationships in figure B were measured. (B) I/V relationship of maximum TRPM8 current activated by: (1) icilin, (2) menthol and icilin with menthol simultaneously (3). (C) Time course of TRPM8 current at +100 mV. Application of WS-12 (500 nM) and menthol (500 μ M) are represented by upper bars. The figures indicated above the layout represent the moment when the I/V relationships in figure D were measured. (D) I/V relationship of maximum TRPM8 current activated by: (1) WS-12, (2) menthol and (3) WS-12 with menthol simultaneously.

endogenous TRPM8 channels. We chose to work with lymph node carcinoma of the prostate cells (LNCaP), a prostate cancer epithelial cell model. It is well known that the TRPM8 protein is over-expressed in prostate cancer and the expression and function of TRPM8 in the LNCaP cell line had already been confirmed [11]. Furthermore, using this model, Zhang and Barritt, demonstrated that TRPM8 channels were involved in prostate cancer cells survival and apoptosis [10]. Our group reported previously that LNCaP cells expressed TRPM8 only on the endoplasmic reticulum (ER) membrane, but not on the plasma membrane [11]. The consequence of TRPM8 stimulation in LNCaP cells was, therefore, depletion of ER calcium stores followed by the activation of capacitative calcium entry via SOC (store operated channels) prior to ER calcium reuptake via calcium pumps.

Using calcium imaging technique and FURA-2 calcium-specific fluorescent dye, we observed that TRPM8 activation induced calcium store depletion (in a calcium-free medium), followed by capacitative calcium entry via SOCs, as soon as calcium was added to the bath solution (Fig. 6A). Hence, in the patch clamp experiments, we did not observe any current which could be attributed to TRPM8 but, rather, observed SOC current, generated as a consequence of calcium store depletion induced by TRPM8 activity on the ER membrane (Fig. 6B). TRPM8 and SOC are two different channel populations with distinct biophysical characteristics. Plasma membrane TRPM8-mediated current is a large, outwardly rectifying current with a reversion potential close to

0 mV (Figs. 2–5 (Fig. 2C, 3D, 4C, 5B and 5D), while SOC current, in LNCaP [19], is a small, inwardly rectifying current with a positive reversion potential value (Fig. 6B). In view of these characteristics, we followed TRPM8 activation by recording the inward SOC current at -100 mV. This confirmed that menthol perfusion ($200\mu\text{M}$) induced SOC current in LNCaP cells and that perfusion of a 20,000-times less concentrated WS-12 solution (10 nM) activated a similar current at physiological temperatures (Fig. 6C and D). The most striking point was, therefore, the high affinity of WS-12 compared to the other well-known TRPM8 activators. In view of findings by Zhang and Barritt, demonstrating that TRPM8 expression and activation by ligands is related to cancer cell survival [10,20], we suggest that this high-affinity TRPM8 activator could be used to induce apoptosis of TRPM8-expressing prostate cancer cells.

As shown in Fig. 7A, there are no obvious common features in the structures of menthol and icilin. The carboxamide group in *meta*-of the menthol cycle, characterizing WS-12, presumably increases this compound's affinity for TRPM8 compared with that of menthol and induces activation of the channel with an EC_{50} value in the nanomolar range. This concentration is therefore 20 times lower than the EC_{50} value of icilin, previously considered the most efficient TRPM8 activator [5]. Furthermore, examination of the structure of WS 12 (Fig. 7A) suggests that a radiohalogen may be directly incorporated, i.e., covalently bonded. Therefore, with a view to designing potential new drugs for treating prostate cancer,

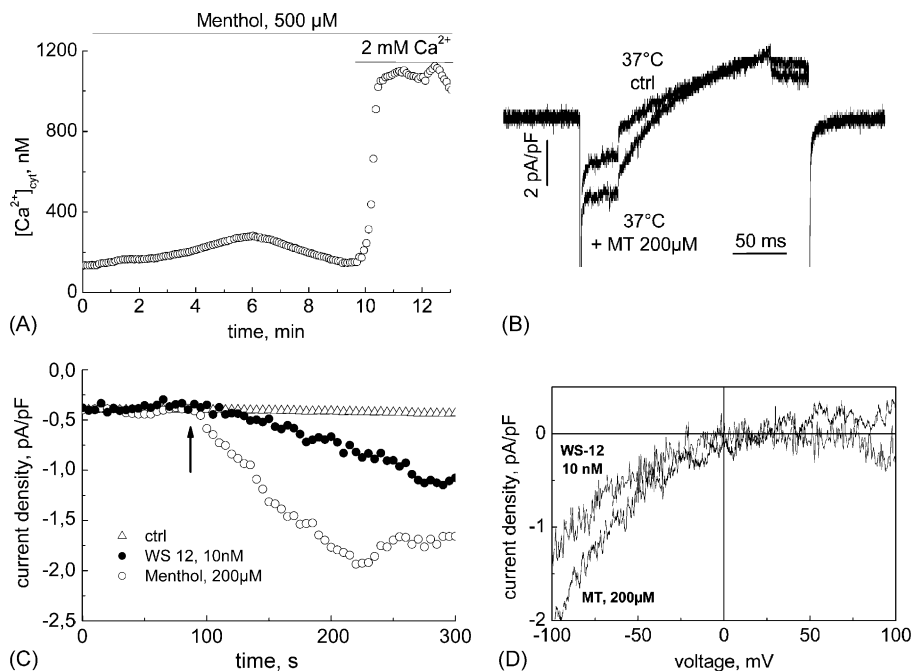


Fig. 6. Effect of WS-12 on TRPM8 in LNCaP cells. (A) Time course of cytoplasmic calcium concentration. Application of menthol ($500\mu\text{M}$) and calcium (2 mM) in the calcium-free bath solution are represented by upper bars. (B) Control and menthol-evoked current recorded after stimulation by a voltage ramp between -100 and $+100$ mV. (C) Time course of menthol (open circles) and WS-12 (black circles) activated SOC current followed at -100 mV. Application of WS-12 (10 nM) and menthol ($200\mu\text{M}$) is performed at the arrow. The time course of the current without any stimulation followed at -100 mV is set as control (open triangles). (D) I/V relationship of maximum TRPM8 current activated by WS-12 (10 nM) and menthol ($200\mu\text{M}$) obtained from voltage ramp stimulation protocol.

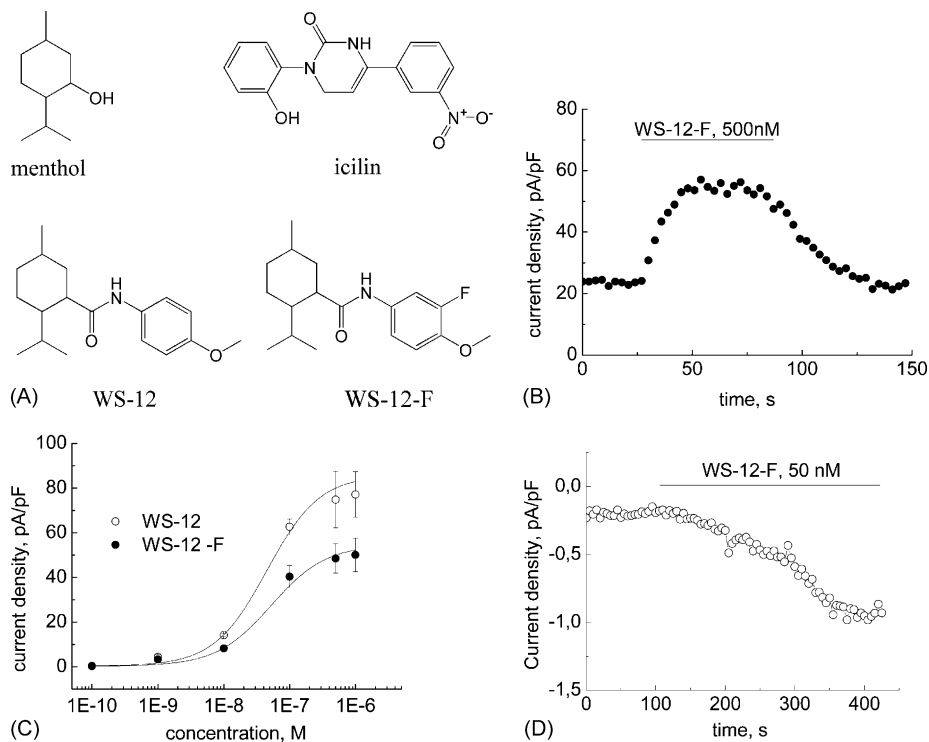


Fig. 7. Effect of Fluorine WS-12 (WS-12-F) on TRPM8. (A) Chemical structure of menthol, Icilin, WS-12 and WS-12-F. (B) Time course of WS-12-F-activated TRPM8 current followed at +100 mV in a representative TRPM8-HEK cell. Application of WS 12-F (500 nM) is represented by the bar. (C) Dose-response relationship of WS-12 (black circles) and WS-12-F (open circles) evoked TRPM8 current recorded at +100 mV in TRPM8-HEK cells. (D) Time course of WS-12-F-activated SOC current recorded at -100 mV. Application of WS 12 (50 nM) is represented by the upper bar.

we studied the efficiency of fluorine incorporated WS-12 (WS-12-F), to assess the action of this new compound on the TRPM8 target. We therefore tested the effect of WS-12-F on TRPM8 in HEK cells. We observed that application of 500 nM WS-12-F activated TRPM8 channels. Dose response curves showed a very high affinity (Fig. 7B). The EC_{50} value for WS-12-F was close to the EC_{50} value for WS-12 in TRPM8-HEK cells, although the maximum WS-12-evoked current was 25% lower than that for WS-12 (Fig. 7C). WS 12-F (10 nM) activated the SOC current in the prostate cancer cell model at $37^{\circ}C$ (Fig. 7D). The EC_{50} value for WS-12-F in prostate cancer cells was below 20 nM (results not shown), similar to that of WS-12. This fluorine-carrying compound was, therefore, still effective on endogenous TRPM8 channels at nanomolar concentrations in prostate cells and offers promising prospects for therapy. Taken together, these results suggest that highly selective TRPM8 activators may be useful for prostate cancer imaging and/or therapy.

4. Discussion

After prostate cancer is diagnosed, there is a need for better prognosis and treatment methods. Most importantly, there must be a method for targeting micro-metastases that are not accessible by surgery or external beam radiation. Biological markers for malignant prostate cancer cell behavior are, therefore, areas of intense current research. Tsavaler et

al. described the polynucleotide sequence of a novel protein present in malignant prostate cancer cells, but not in adjacent normal prostate or in tissues such as brain, viscera, or muscle [8]. The coded 1104-amino acid protein was named *trp-p8*. Moreover, the presence of this polynucleotide in human prostate samples is related to androgen-receptor sensitivity [9,10]. Loss of *trp-p8* marker is correlated to a predicted increase in morbidity [21,22]. The unique presence and importance of TRPM8 in the prostate was re-affirmed in two recent papers [10,23]. Indeed, the authors showed that menthol enhanced the apoptosis of LNCaP cells (lymph node derived prostate cancer cells) via stimulation of TRPM8 channels. Thus, the selective expression of TRPM8 in the prostate and its involvement in cancer cell growth makes this protein a target for the diagnosis and treatment of prostate malignancies. Hence, the discovery of new specific channel modulators is crucial for the development of cancer therapy.

TRPM8 is activated by cold temperature, compounds such as menthol and icilin, positive membrane potentials and PIP₂, an endogenous signaling lipid [16,24–26]. These distinct stimuli apparently affect TRPM8 in a cooperative manner, although each stimulus has its own characteristics [16,24]. Illustrating this potential cooperation, sub-activating concentrations of menthol potentiate the cold-sensitivity of TRPM8 [5,6]. Moreover, icilin sensitivity depends on specific structural elements in the TRPM8 S2-S3 linker not required for menthol or cold sensitivity [7]. In vivo, in prostate epithelial and prostate cancer cells the physiological activators of

TRPM8 are not known. Nevertheless, many analogues of menthol have been identified, constituting potential TRPM8 activators and are therefore potentially useful pharmacologically.

In this study, therefore, we investigated the effect of “WS” compounds, derived from menthol, on TRPM8 channels. A recent study has shown that WS-3, a parent compound, evoked TRPM8-mediated calcium entry [18]. However, this molecule was less affine than icilin ($EC_{50} = 3.7 \pm 1.7 \mu\text{M}$) and, therefore, did not retain our attention in this study. We also measured the affinity of other WS compounds, with the aim of highlighting potential drugs for prostate cancer therapy. WS-11 and WS-14 activated TRPM8, but their respective affinity for TRPM8 was too low. Indeed, their EC_{50} values were greater than $1 \mu\text{M}$, while the well-known “super cooling” agent, icilin had an EC_{50} value of $0.5 \mu\text{M}$. By testing WS-12 on TRPM8-HEK cells, we found a TRPM8 activator with a very high affinity. The EC_{50} value was 30 nM , about 20 times lower than the EC_{50} value for icilin. Thus, WS-12 is apparently the ligand with the highest affinity for TRPM8 found to date.

Intriguingly, we found a commonality between the effects of WS-12 and icilin on TRPM8. Indeed, menthol evoked current was partially inhibited by both icilin and WS-12 perfusion. Moreover, menthol was unable to activate an additive TRPM8 current in the presence of icilin or WS-12. In view of the structural analogy between menthol and WS-12, the commonality of the effect of icilin and WS-12 on TRPM8 may seem paradoxical. Nevertheless, a recent study has shown that, although menthol and icilin appear to have distinct binding sites on TRPM8 [7], some TRPM8 mutations inhibit the action evoked by both compounds, suggesting at least one common site of action [27]. These results indicated that menthol, icilin and the different WS compounds activated TRPM8 differently by binding to distinct sites, but used common processes downstream from the binding event. Hence, icilin binding may activate TRPM8 and inhibit the tethering of menthol to its binding sites. Further investigations, including mutagenesis, are required to demonstrate the exact TRPM8 activation mechanisms of each compound. Irrespective of the mechanism governing WS-12 binding to TRPM8, its high affinity for this site may be used for diagnosis, monitoring and, targeting for potential treatment of prostate cancer.

Finally, the carboxamide structure (e.g. WS-12) indicated that a radiohalogen could be directly incorporated, i.e. covalently bonded, within the agonist structure of the molecule. Incorporating a fluorine atom into the *meta*-position created a molecule that retained about 75% of the parent compound’s activity (Fig. 6). Thus, such molecules, using ^{18}F , may be considered for radioimaging of prostate cancer. Indeed, this fluoroaromatic compound could be used in PET imaging experiments. Furthermore, if it were possible to incorporate a radioisotope that selectively binds to TRPM8 protein, the new molecule would have radiodiagnostic or radiotherapeutic potential. Targeted iodine radiotherapy is a familiar, successful concept for the treatment of thyroid cancer

and this approach has been tried with breast cancer [28]. Moreover, a radioligand pharmaceutical strategy has also been proposed for ovarian cancer [29]. However, this small-molecule method has not previously been used for prostate cancer. A radiotherapeutic for prostate cancer has the advantage of targeting cancer cells more accurately than surgery, brachytherapy, or external beam radiation. Moreover, it can be administered without the side effects, including impotency and incontinence, associated with other procedures. Finally, a radiotherapeutic may have greater success in preventing recurrence of malignancy, as it will also selectively target micrometastases (microscopic spread of cancer cells). Radioactive fluorine may be used for diagnosis and imaging and radioactive iodine or astatine for possible therapy. Alternative isotopes with better-localized linear energy transfer may also be considered for therapy. This type of radiotherapy with radioactive iodine has been highly successful for thyroid malignancies, with significant long-term survival rates and permanent remission.

In conclusion, in this study, we found TRPM8 protein activators with the highest affinity reported to date. This high affinity of these ligands for TRPM8 and the possibility of incorporating halogen into their structure may be useful for the diagnosis, monitoring and, perhaps, even therapy of prostate cancer. Furthermore, WS-12 or analogous compounds could be used to treat breast, colon and lung cancers or other diseases related to TRPM8 pathological expression.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM, la Ligue nationale contre le cancer, le Ministère de l’éducation nationale and the Région Nord/Pas-de-Calais.

We thank Dr Edward T. Wei for having providing us the “WS” compounds and for his helpful scientific advices.

References

- [1] D.E. Clapham, TRP channels as cellular sensors, *Nature* 426 (2003) 517–524.
- [2] C. Montell, Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels, *Sci. STKE* (2001) RE1.
- [3] A. Patapoutian, A.M. Peier, G.M. Story, V. Viswanath, ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 529–539.
- [4] M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389 (1997) 816–824.
- [5] D.D. McKemy, W.M. Neuhausser, D. Julius, Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation, *Nature* 416 (2002) 52–58.
- [6] A.M. Peier, A. Moqrich, A.C. Hergarden, A.J. Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, T.J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, A. Patapoutian, A TRP channel that senses cold stimuli and menthol, *Cell* 108 (2002) 705–715.
- [7] H.H. Chuang, W.M. Neuhausser, D. Julius, The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel, *Neuron* 43 (2004) 859–869.

- [8] L. Tsavaler, M.H. Shaper, S. Morkowski, R. Laus, Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins, *Cancer Res.* 61 (2001) 3760–3769.
- [9] G. Bidaux, M. Roudbaraki, C. Merle, A. Crepin, P. Delcourt, C. Slo-mianny, S. Thebault, J.L. Bonnal, M. Benahmed, F. Cabon, B. Mauroy, N. Prevarskaya, Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement, *Endocr. Relat. Cancer.* 12 (2005) 367–382.
- [10] L. Zhang, G.J. Barritt, Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 8365–8373.
- [11] S. Thebault, L. Lemonnier, G. Bidaux, M. Flourakis, A. Bavencoffe, D. Gordienko, M. Roudbaraki, P. Delcourt, Y. Panchin, Y. Shuba, R. Skryma, N. Prevarskaya, 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, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39423–39435.
- [12] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [13] F. Vanden Abeele, L. Lemonnier, S. Thebault, G. Lepage, J.B. Parys, Y. Shuba, R. Skryma, N. Prevarskaya, Two types of store-operated Ca^{2+} channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 30326–30337.
- [14] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [15] H.R. Watson, R. Hems, D.G. Rowsell, D.J. Spring, New compounds with the menthol cooling effect, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 29 (1978) 185–200.
- [16] T. Voets, G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi, B. Nilius, The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels, *Nature* 430 (2004) 748–754.
- [17] D.A. Andersson, H.W. Chase, S. Bevan, TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH, *J. Neurosci.* 24 (2004) 5364–5369.
- [18] H.J. Behrendt, T. Germann, C. Gillen, H. Hatt, R. Jostock, Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay, *Br. J. Pharmacol.* 141 (2004) 737–745.
- [19] F. Vanden Abeele, Y. Shuba, M. Roudbaraki, L. Lemonnier, K. Vanoverberghe, P. Mariot, R. Skryma, N. Prevarskaya, Store-operated Ca^{2+} channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis, *Cell. Calcium* 33 (2003) 357–373.
- [20] L. Zhang, G.J. Barritt, TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr. Relat. Cancer* 13 (2006) 27–38.
- [21] S.M. Henshall, D.E. Afar, J. Hiller, L.G. Horvath, D.I. Quinn, K.K. Rasiah, K. Gish, D. Willhite, J.G. Kench, M. Gardiner-Garden, P.D. Stricker, H.I. Scher, J.J. Grygiel, D.B. Agus, D.H. Mack, R.L. Sutherland, Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse, *Cancer Res.* 63 (2003) 4196–4203.
- [22] A. Kiessling, S. Fussel, M. Schmitz, S. Stevanovic, A. Meye, B. Weigle, U. Klenk, M.P. Wirth, E.P. Rieber, Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8, *Prostate* 56 (2003) 270–279.
- [23] R.J. Stein, S. Santos, J. Nagatomi, Y. Hayashi, B.S. Minnery, M. Xavier, A.S. Patel, J.B. Nelson, W.J. Futrell, N. Yoshimura, M.B. Chancellor, F. De Miguel, Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract, *J. Urol.* 172 (2004) 1175–1178.
- [24] S. Brauchi, P. Orio, R. Latorre, Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 15494–15499.
- [25] B. Liu, F. Qin, Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *J. Neurosci.* 25 (2005) 1674–1681.
- [26] T. Rohacs, C.M. Lopes, I. Michailidis, D.E. Logothetis, PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 626–634.
- [27] M. Bandell, A.E. Dubin, M.J. Petrus, A. Orth, J. Mathur, S.W. Hwang, A. Patapoutian, High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol, *Nat. Neurosci.* 9 (2006) 493–500.
- [28] G.H. Daniels, D.A. Haber, Will radioiodine be useful in treatment of breast cancer? *Nat. Med.* 6 (2000) 859–860.
- [29] J.A. Holt, A. Scharl, S. Kullander, M.W. Beckmann, Intracellular actions of steroid hormones and their therapeutic value, including the potential of radiohalosteroids against ovarian cancer, *Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* 155 (1992) 39–54.

Discussion

I) Rôle de TRPM8 dans la physiologie de la prostate.

I.A) TRPM8, spécifique de la prostate ?

L'expression du gène *trpm8* dans la prostate a été décrite 2001 lorsque Tsavaler *et col* ont reporté la présence de l'ARNm de TRPM8 dans le tissu de la prostate humaine (Tsavaler et al., 2001). L'année suivante, les groupes de Julius et Patapoutian ont démontré que TRPM8 était exprimé dans les neurones sensoriels de la moelle épinière où il fonctionnait comme un récepteur au froid (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). Depuis, plusieurs études ont reporté la localisation de TRPM8 dans différents tissus dont le foie (Henshall et al., 2003), les muscles lisses des artères (Yang et al., 2006), ou encore les cellules papillaires de la langue (Abe et al., 2005), minimisant ainsi la localisation « tissu spécifique » de TRPM8 dans la prostate.

En conclusion, selon les critères définis dans ce travail, nous pouvons affirmer que l'ARNm classique de TRPM8 est exprimé dans les neurones thermosensoriels ainsi que dans les tissus de la sphère urogénitale. Proportionnellement, c'est dans la prostate que le plus important taux de TRPM8 peut être relevé. Néanmoins, l'expression des isoformes de TRPM8 semble être plus ubiquitaire que celle de la forme classique.

La double localisation réticulum/plasmalemme de TRPM8 complexifie la compréhension de son rôle dans la prostate. Nous commencerons donc par discuter le rôle hypothétique de la fonction plasmalemme avant d'aborder le rôle de la fonction réticulaire.

I.B) Rôle de $_{PM}$ TRPM8 ?

D'après nos travaux, le canal TRPM8 est principalement exprimé dans la zone périluminale des cellules apicales épithéliales de la prostate. Nos résultats d'électrophysiologie ont démontré la fonctionnalité de TRPM8 dans les membranes plasmiques et réticulaires. Néanmoins, TRPM8 semble aussi localisé dans les vésicules de sécrétion des cellules apicales épithéliales (figure 31).

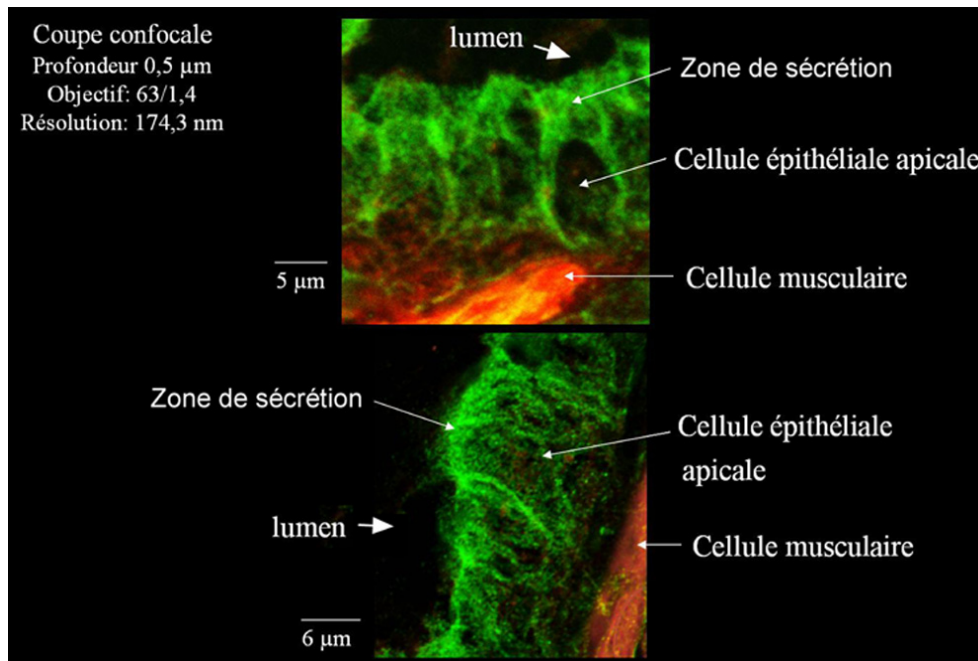


Figure 31 : image obtenue par microscopie confocale montrant la détection de TRPM8 (Alexa 488, vert) dans les cellules luminales de l'épithélium de la prostate humaine. Notez l'intense marquage au niveau de la membrane luminale et/ou dans la zone de sécrétion péri-luminale de ces cellules. Obj : *60.

Compte tenu des travaux publiés sur la translocation stimulée de TRPC5 et TRPV5 respectivement dans les vésicules des neurones et de l'épithélium rénal, il est fortement probable que TRPM8 soit présent dans les vésicules de sécrétion des cellules sécrétrices matures (Bezzarides et al., 2004; Lambers et al., 2006). Le canal TRPM8 pourrait soit participer directement au phénomène de sécrétion, soit être acheminé à la membrane plasmique pour y remplir son rôle.

La fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique nécessite un remodelage des lipides membranaires afin d'augmenter la proportion des lipides à capacité fusiogène comme les lysophospholipides (Karli et al., 1990; Roldan and Frago, 1993). Or, la phospholipase A2 groupe VIA (iPLA2) est connue pour jouer un rôle dans le remodelage de la composition lipidique des membranes (Balsinde et al., 1997; Balsinde et al., 1995; Kudo and Murakami, 2002), ainsi que dans la sécrétion stimulée d'insuline par les cellules β de Langerhans dans le pancréas (Ma et al., 2001).

En accord avec notre travail sur l'activation du canal TRPM8 par les lysophospholipides, il est probable que TRPM8 puisse être activé pendant la fusion vésiculaire et ainsi provoquer l'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol afin d'activer des protéines Ca^{2+} -dépendantes intervenant dans la

fusion membranaire. Néanmoins, TRPM8 pourrait aussi intervenir en aval de la fusion vésiculaire.

Dans la prostate, la sécrétion a pour but de libérer de nombreuses substances dans le liquide séminal comme la PSA, la PAP, le zinc (Zn^{2+}), le citrate et d'autres molécules. TRPM8 pourrait éventuellement participer à la recapture du Zn^{2+} .

TRPM8 est un canal cationique dit « non sélectif » car il transporte indifféremment les cations monovalents et divalents. Cependant, il existe une hiérarchie de transport définie d'une part par la « sélectivité » du pore ionique de TRPM8 (facilité avec laquelle un type d'ion transite à travers le canal), et d'autre part par le couple (gradient électrochimique des ions)/(potentiel de membrane). Des résultats non publiés du laboratoire ont confirmé que la perméabilité au Zn^{2+} de TRPM8 est au moins égale à celle du Ca^{2+} .

Dans le lumen des acini prostatiques, le Zn^{2+} , le Ca^{2+} et le Mg^{2+} libres sont présents à des concentrations respectives d'environ 2 mM, 6 mM et 3 mM (Chia et al., 2000; Costello and Franklin, 1998; Elzanaty et al., 2002; Wong et al., 2001) contre quelques nM pour les concentrations cytosoliques (le Zn^{2+} cytosolique est chélaté par des protéines ou par le citrate (Costello and Franklin, 1998)). Ainsi, les gradients électrochimiques de ces ions, du côté luminal des cellules épithéliales apicales sont relativement identiques. En comparaison, leurs concentrations dans la matrice extracellulaire (côté de la lame basale) sont respectivement de 0,02 mM, 2 mM et 1 mM. Ainsi, les gradients électrochimiques des ions Ca^{2+} et du Mg^{2+} sont plus ou moins les mêmes du côté basal et luminal des cellules apicales, alors que celui du zinc est environ 3 fois plus important du côté luminal que du côté basal.

En tenant compte de la sélectivité de TRPM8 pour ces ions et des différents gradients électrochimiques, il est très probable que l'ouverture de TRPM8 sur la membrane luminale des cellules apicales de la prostate laisse passer l'ion Zn^{2+} dans une proportion importante. Or cet ion Zn^{2+} serait quasiment exclu au niveau de la membrane basale, au profit des ions Ca^{2+} et du Mg^{2+} .

Bien que n'ayant pas de rôle direct dans la reproduction, le Zn^{2+} agit comme anti-bactérien, protège le citrate de l'oxydation par la m-aconitase, inhibe en partie l'activité du PSA dans le sperme et participe à la stabilisation de la chromatine des spermatozoïdes (Costello and Franklin, 1998; Evenson et al., 1993; Malm et al., 2000). D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence le lien étroit entre diminution des concentrations des ions Zn^{2+} et Ca^{2+} dans le liquide spermatique avec l'infertilité (Chia et al., 2000).

En conclusion, l'analyse de nos résultats nous conduit à penser que l'activité $PMTRPM8$ pourrait participer au phénomène de sécrétion du liquide prostatique.

I.C) Rôle de ERTRPM8 ?

Comme nous l'avons décrit, la vidange réticulaire de calcium par le canal TRPM8 entraîne l'activation de l'entrée capacitive de calcium (ECC). Ainsi le premier rôle de TRPM8 réticulaire (ERTRPM8) pourrait simplement d'être de participer à l'activation de l'ECC, elle-même nécessaire au remplissage des stocks réticulaires de calcium. Ce remplissage des stocks assure l'homéostasie calcique, mais aussi la régulation des grandes fonctions physiologiques comme la prolifération et l'apoptose.

Nos travaux sur l'implication de ERTRPM8 dans la modulation de la prolifération des kératinocytes et la présence de l'activité ERTRPM8 dans les cellules prolifératives apicales intermédiaires de la prostate renforcent l'hypothèse d'un rôle dans la régulation de la prolifération.

Cependant, nous ne pouvons exclure que le rôle de ERTRPM8 soit en partie défini par l'intensité de l'activité de TRPM8 dans la membrane du réticulum endoplasmique. En effet, dans les cellules de la prostate, la fonction ERTRPM8 est la résultante de l'expression de la forme classique de TRPM8 et d'une isoforme de TRPM8. Dans les cellules n'exprimant que l'isoforme de TRPM8, nous pensons que le rôle de l'activité ERTRPM8 est de moduler le cycle cellulaire. Or l'expression de forme classique de TRPM8 est concomitante à la différenciation des cellules apicales intermédiaires en cellules apicales sécrétrices matures, qui ne prolifèrent plus. Nous avons de surcroît démontré que l'expression de la forme classique de TRPM8 augmente considérablement l'intensité de la vidange réticulaire des cellules sécrétrices matures. Nous pensons donc que l'augmentation de l'activité ERTRPM8 due à l'expression de la forme classique de TRPM8 est associée à la génération d'un signal calcique différent dont le rôle ne serait plus de moduler la prolifération mais peut-être de participer soit à l'activité de sécrétion, soit à l'apoptose des cellules sécrétrices matures.

Plusieurs auteurs ont démontré le rôle du transfert de calcium depuis le réticulum endoplasmique jusque dans la matrice des mitochondries (Breckenridge et al., 2003; Hajnoczky et al., 2000). Par exemple, l'augmentation du calcium libre cytosolique ($[Ca^{2+}]_c$) induit l'activation de la calpaïne (protéase Ca^{2+} -dépendante) et de la calcineurine (phosphatase Ca^{2+} -dépendante) activent respectivement les protéines pro-apoptotiques Bax et Bad (Altnauer et al., 2004; Shou et al., 2004). Parallèlement, la recapture du calcium cytosolique par les mitochondries entraîne une augmentation du calcium libre mitochondrial ($[Ca^{2+}]_m$). Cette augmentation pourrait intervenir dans l'activation du Pore Transitoire de Perméabilité (PTP) et

provoquerait ainsi la libération vers le cytoplasme de deux facteurs pro-apoptotiques : le cytochrome C et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Korge and Weiss, 1999).

Paradoxalement, d'autres travaux démontrent que l'augmentation transitoire et cyclique de $[Ca^{2+}]_m$ induit la stimulation du cycle de Krebs par l'activation des pyruvate-, isocitrate- et oxoglutarate-déhydrogénases. Cette stimulation conduit à une augmentation de la synthèse d'ATP au sein des mitochondries. La synthèse optimale d'ATP par les mitochondries a été observée pour une concentration de $[Ca^{2+}]_c$ d'environ 1 μ M, ce qui représente la concentration atteinte localement lors d'une vidange réticulaire (Moreno-Sanchez, 1985). La balance entre apoptose/prolifération serait alors définie par l'intensité et la durée de cette augmentation de $[Ca^{2+}]_m$. La proximité entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (figure 32) dans les cellules primaires de prostate favorise la recapture du Ca^{2+} réticulaire par les mitochondries (figure 33).

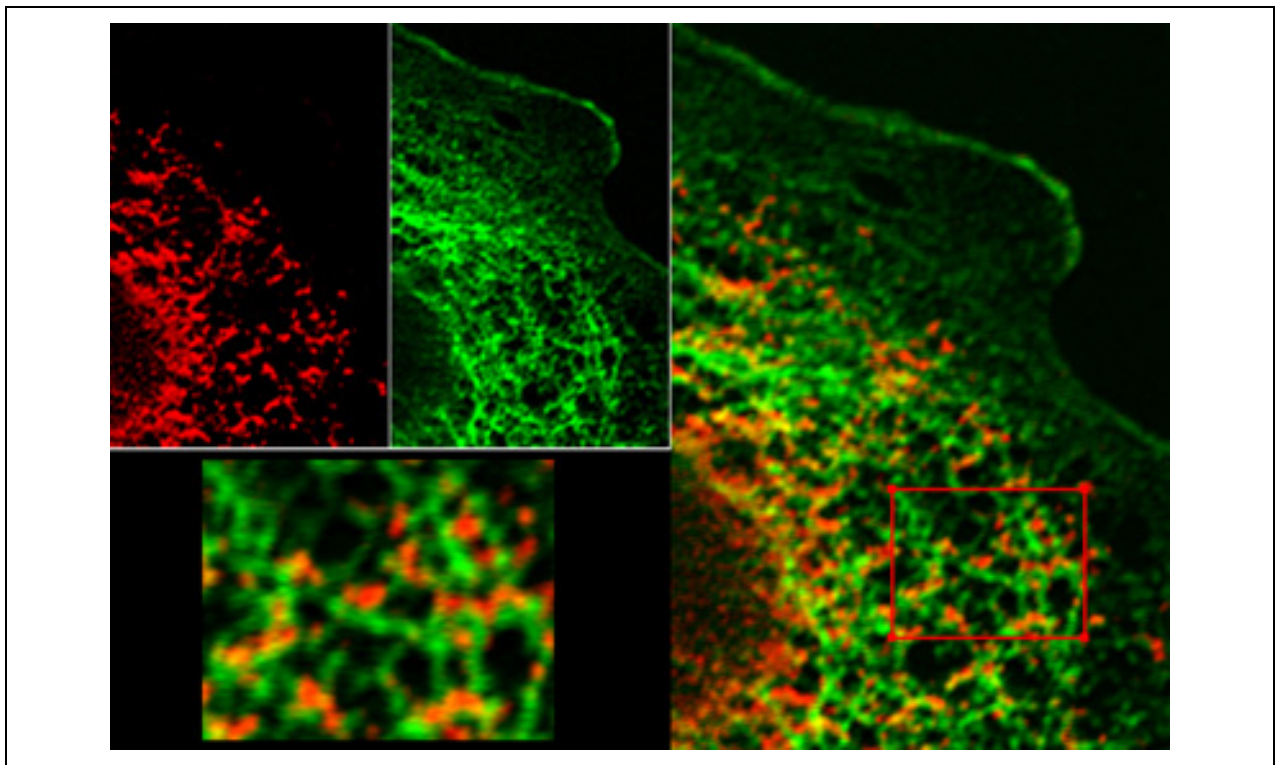


Figure 32 : Immunofluorescence démontrant la proximité du réseau réticulaire (marquage TRPM8, vert) et des mitochondries (ATP synthase, rouge) dans les cellules apicales sécrétrices matures de la prostate humaine. Notez la proximité des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

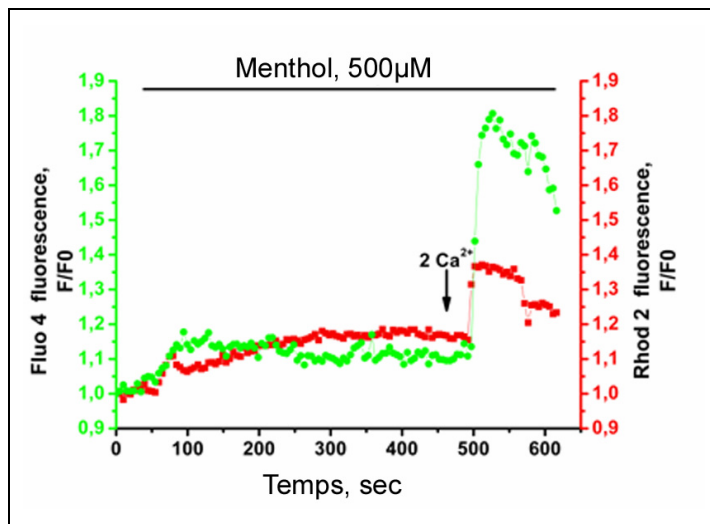


Figure 33 : Résultats d'imagerie calcique démontrant une augmentation des $[Ca^{2+}]_c$ (fluo-4, vert) et $[Ca^{2+}]_m$ (Rhod-2, rouge) dans les cellules apicales de prostate lors de l'application de 500 μ M de menthol. Notez la première augmentation lente correspondant à la vidange réticulaire suivie de l'ECC lors de l'ajout de 2 mM de Ca^{2+} externe.

En conclusion, nous pensons que le rôle du signal calcique engendré par l'activation de TRPM8 est différent selon les isoformes présentes sur la membrane du RE et selon leur quantité. Ainsi, lorsque seule l'isoforme réticulaire est présente, TRPM8 pourrait intervenir dans la régulation de la synthèse d'ATP et participer indirectement à la prolifération des cellules. Alors que la présence supplémentaire de la forme classique de TRPM8 pourrait intervenir dans la sécrétion ou l'apoptose des cellules. Dans les deux cas, TRPM8 semble jouer un rôle essentiel dans la fonction physiologique de la prostate. En conséquence, nous pensons que TRPM8 pourrait participer, indirectement, au bon déroulement de la reproduction.

II) Rôle de TRPM8 dans la cancérogenèse de la prostate.

II.A) TRPM8 et oncogénèse

Dès 2001, Tsavaler *et col* ont démontré la surexpression de l'ARN de TRPM8 dans le cancer de la prostate, mais aussi dans le cancer colorectal, dans le mélanome, et dans le cancer du sein (Tsavaler et al., 2001). D'autres groupes ont confirmé la surexpression du transcrit de TRPM8 dans l'adénocarcinome de la prostate (Fuessel et al., 2003; Henshall et al., 2003; Kiessling et al., 2003) par différentes techniques (SCRT-PCR, puce à ADN, hybridation in situ, PCR en temps réelle). La corrélation du niveau d'expression avec les grades cancéreux variait considérablement en fonction des études. Ces différences étaient principalement dues au choix des techniques. Ainsi, si tout le monde s'accordait à démontrer une augmentation parallèle de l'expression de TRPM8 et du grade cancéreux, la corrélation avec le score de Gleason n'était pas évidente. En effet, les équipes de Laus et de Wirth voyaient une augmentation significative du taux de TRPM8 pour les cancers avec un score de Gleason >7, alors que le groupe de Rieber reportait une diminution de TRPM8 pour les cancers avec un score de Gleason >7 (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003; Tsavaler et al., 2001). Cependant, la significativité de ces résultats est diminuée par le fait que les groupes respectifs de Wirth et Rieber ont travaillé dans la même université, ont réalisé leurs études respectives ensemble avec la même technique et les mêmes oligonucléotides, mais ont pourtant trouvé des résultats opposés. Néanmoins, ces deux groupes démontrent efficacement la corrélation du taux de l'ARNm de TRPM8 avec le stade TNM. Ainsi, le ratio cellules tumorales/cellules saines a été estimé à 4,6 pour les cancers intracapsulaires (T2) contre 1,4 pour les cancers métastatiques (T4).

En se basant sur ces études et sur nos travaux portant sur l'expression de TRPM8 au cours de la différenciation apicale des cellules épithéliales de la prostate, nous avons proposé un modèle expliquant la régulation des fonctions de TRPM8 au cours de l'oncogénèse (figure 34). Les cellules cancéreuses apicales surexpriment fortement TRPM8 et possèdent les deux fonctions $ERTRPM8$ et $PMTRPM8$ dont la fonction plasmique est considérablement stimulée. Ce modèle correspond bien au phénotype cancéreux « peu prolifératif » et « hypersécrétoire » (révélé par le taux sanguin de PSA) des cancers intracapsulaires de la prostate. Au fur et à mesure de l'acquisition de mutations, le cancer devient métastatique, s'affranchit en partie de l'AR ou détourne sa fonction de contrôle de la différenciation apicale au bénéfice de la prolifération (Karayi and Markham, 2004; Reddy et al., 2006). Lors de cette transition, la décroissance de l'activité $PMTRPM8$ est due soit à une répression génique (diminution de la

transcription) soit à l'inhibition de la translocation vers le plasmalemme (ex : lignée LNCaP). Cependant, la fonction $ERTRPM8$ se maintient, probablement pour stimuler la prolifération.

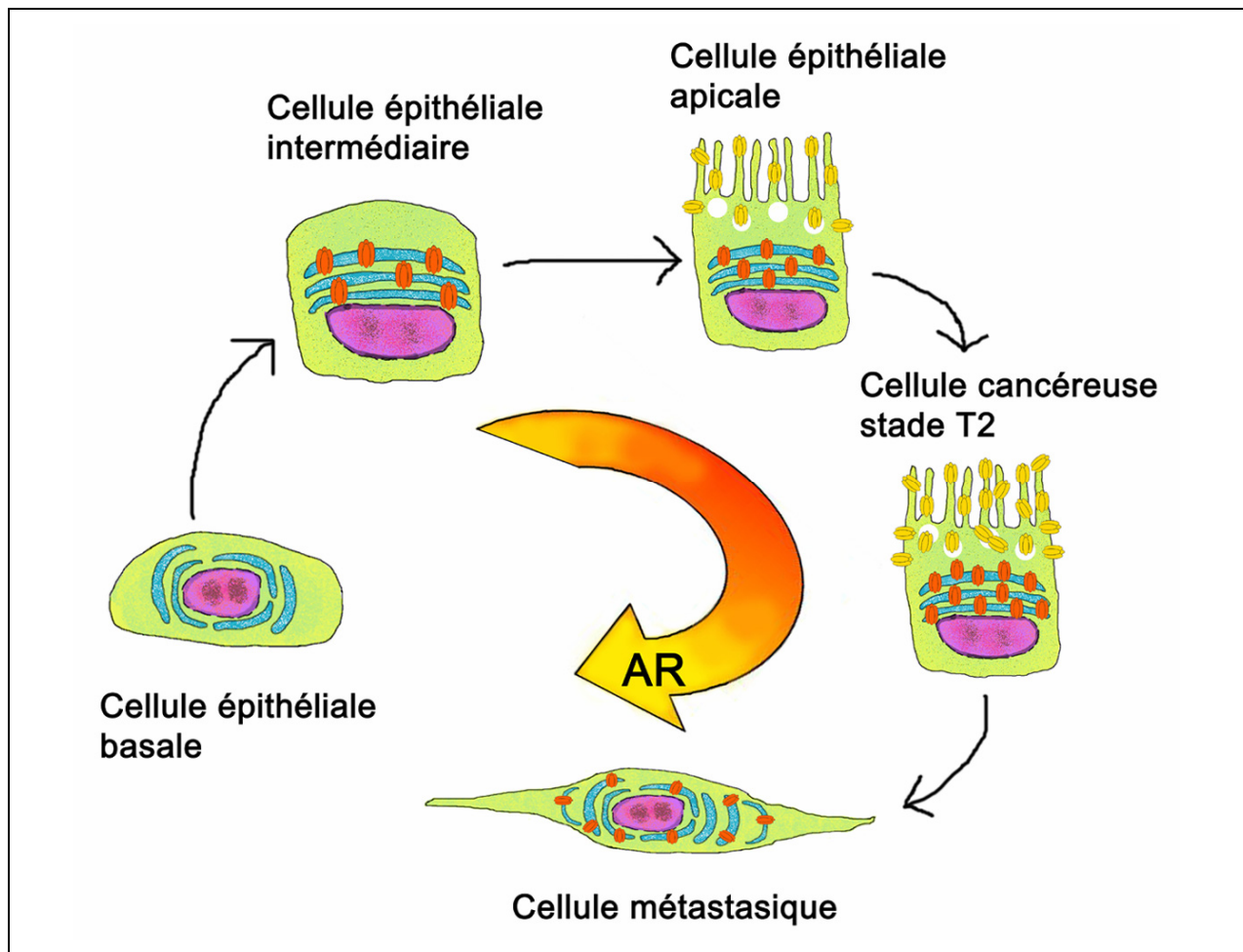


Figure 34 : représentation schématisée de l'expression et de la localisation de TRPM8 au cours de la différenciation épithéliale apicale puis au cours de l'oncogénèse des cellules prostatiques (stade T2 représente le cancer intracapsulaire caractérisé par la surexpression de TRPM8). $ERTRPM8$ représente l'activité de TRPM8 dans la membrane du réticulum endoplasmique alors que $PMTRPM8$ représente l'activité de TRPM8 dans le plasmalemme. La flèche représente l'expression et l'activité du RA.

II.B) TRPM8 : marqueur diagnostique ou pronostique du cancer ?

Les travaux de Fuessel et de Kiessling laissent à penser que le transcrite principal du gène *trpm8* puisse être utilisé comme marqueur clinique des cancers de stade T2 (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003). Cependant, l'utilisation en test diagnostique ou pronostique devant être réalisé sur des biopsies, les limites à l'exploitation de ce marqueur sont nombreuses : précision et confiance du prélèvement dans la zone cancéreuse, rapport cellules apicales/ cellules totales, rapport cellules cancéreuses/cellules saines, nombre d'échantillons par patients. Il est par contre

probable que son utilisation au sein d'une puce à ADN à but diagnostique ou pronostique permette de proposer un test clinique efficace et utilisable. Ce type de stratégie a, par exemple, été développé par la société Genomichealth™ dans le cadre du cancer du sein (Habel et al., 2006; Paik et al., 2004).

Cependant, les travaux d'Henshall *et coll* et les nôtres mettent en évidence que TRPM8 ne pourra pas être utilisé efficacement comme marqueur lors du traitement des patients par des molécules anti-androgéniques comme le Casodex® (Bidaux et al., 2005; Henshall et al., 2003), puisque le traitement en lui-même entraîne une diminution importante de l'expression de TRPM8.

II.C) Quel rôle pour TRPM8 dans le cancer ?

L'adénocarcinome de la prostate est caractérisé par un faible pouvoir prolifératif couplé à une résistance accrue à l'apoptose. Cependant, comme dans tout cancer, ces dérives apparaissent au rythme des mutations et s'amplifient avec la sélection clonale des cellules au sein de la tumeur. C'est pourquoi les cancers les plus avancés sont aussi les plus résistants et les plus agressifs.

Une autre caractéristique importante du cancer de la prostate est l'évolution de la sécrétion exocrine en sécrétion paracrine puis autocrine. Cette dérive permet aux cellules cancéreuses de sécréter leur propres facteurs de croissance (FGF, IGF, EGF, Thrombin, bombésin...) et/ou hormones et ainsi de s'affranchir des signaux régulateurs de leur environnement (Foley et al., 2004; Kaushal et al., 2006; Liao et al., 2005). Leur prolifération et leur résistance à l'apoptose augmentent alors de manière anarchique.

En tenant compte respectivement de l'activité de TRPM8 et du stade cancéreux, nos hypothèses actuelles sont que la surexpression de TRPM8 dans les cancers intracapsulaires pourrait jouer un rôle dans la sécrétion paracrine et autocrine.

La lignée LNCaP restant le meilleur modèle pour l'étude des cancers androgéno-dépendants de stade T4 ou des métastases, nous nous basons sur les résultats obtenus sur cette lignée pour comprendre le rôle de TRPM8 dans les cancers avancés. Nous partirons donc du principe que seule la fonction réticulaire de TRPM8 est conservée dans ces cellules, qu'elle soit formée par la seule isoforme réticulaire ou par la somme des activités de l'isoforme réticulaire et de la forme classique de TRPM8. Les expériences de Zhang *et coll* ont démontré que l'utilisation de siARN contre TRPM8 dans les cellules LNCaP augmentait leur apoptose (Zhang and Barritt, 2004).

Zhang *et coll* concluaient dans leur article que TRPM8 était nécessaire à la viabilité cellulaire, mais que son activation forcée déclenchait l'apoptose (Zhang and Barritt, 2004). Autrement dit, TRPM8 protège de l'apoptose mais peut aussi agir comme inducteur de la MCP. Cependant, nos travaux ont démontré d'une part que l'activation du canal TRPM8 par le menthol subit rapidement une inactivation totale et d'autre part que la vidange n'est inductible qu'une fois en présence continue de menthol (Thebault et al., 2005). Nous en concluons que la présence de menthol dans le milieu de culture pendant 12 heures consécutives n'entraîne pas une sur-activation de TRPM8, mais une unique vidange réticulaire de Ca^{2+} puis soit une inactivation du canal soit un équilibre du gradient de calcium dans les stocks réticulaires sensibles et vidangeables par le menthol. Dans ces deux cas, l'effet du menthol est d'inhiber l'activité endogène de TRPM8 après la vidange calcique initiale dans les cellules LNCaP et donc provoque le même effet que les siARN contre TRPM8.

En accord avec nos résultats sur les kératinocytes et des résultats préliminaires en LNCaP démontrant que la vidange réticulaire de Ca^{2+} est chélatée partiellement par les mitochondries, nous pensons que le rôle de TRPM8 dans les cellules LNCaP est de promouvoir une vidange réticulaire de Ca^{2+} faible mais ciblée, augmentant la production d'ATP en stimulant l'activité du cycle de Krebs. Selon cette hypothèse, l'inhibition de TRPM8 dans les cellules LNCaP et peut-être plus généralement dans les cellules métastatiques pourrait ralentir ou stopper la croissance de la tumeur.

Notre travail sur les WS permet ainsi d'entrevoir la possibilité d'un développement de molécules de hautes affinités inhibant directement l'activité du canal TRPM8. D'autres solutions techniques sont aussi envisageables comme, par exemple, l'utilisation de ces molécules comme « molécules d'adressage » permettant à un vecteur de synthèse d'interagir spécifiquement avec le canal TRPM8, détectant ainsi les cellules ciblées. Ce type de stratégie fait l'objet de recherches intenses dans les sociétés de biotechnologies.

Finalement, le couplage de ces molécules avec un isotope radioactif pourrait permettre le développement de « molécules suicides » ciblant les cellules exprimant PM TRPM8. Bien sûr ces idées restent théoriques et devront faire l'objet de recherches supplémentaires.

En conclusion, nos résultats, compilés avec d'autres, nous conduisent à penser que TRPM8 participerait à l'oncogenèse des cellules cancéreuses de la prostate en stimulant la sécrétion paracrine/autocrine et/ou en participant au contrôle du cycle cellulaire de part sa capacité éventuelle à moduler la synthèse d'ATP. Ces conclusions, certes hypothétiques, devront faire l'objet de recherches plus poussées afin d'être confirmées ou infirmées.

III) Rôles des petites isoformes de TRPM8

III.A) Dans les cellules de la prostate

L'interprétation du rôle des sTRPM8 dans la prostate est nettement plus délicate. En effet, nos travaux démontrent que ces sTRPM8 modulent la sensibilité de la forme TRPM8 classique dans le plasmalemme et dans le réticulum. Néanmoins, nous ne savons pas si les sTRPM8 sont également capables de moduler l'activité de la ou des isoformes réticulaires de TRPM8 exprimées par les cellules musculaires lisses et les kératinocytes. D'autre part, la sensibilité de la prostate au froid étant très limitée de part sa localisation au sein de l'organisme, la modulation par les sTRPM8 de l'activation de TRPM8 par le froid reste peu probable dans cet organe. Nous pensons que les isoformes pourraient moduler une voie physiologique d'activation de TRPM8 requérant un mode d'activation similaire à celui du menthol et du froid. L'analyse des travaux portant sur la relation entre la structure et l'activation des différents activateurs du canal TRPM8 peut nous donner des indications sur le rôle des isoformes de TRPM8 dans la prostate.

Des travaux ont démontré que les modes d'activation de TRPM8 par le menthol, l'icilin et le froid font intervenir des mécanismes différents. Par exemple, l'iciline interagit directement avec le canal, au niveau de la glycine 805 dans le 3^{ème} segment transmembranaire (Chuang et al., 2004). Le domaine « senseur » de température serait, lui, situé dans la boucle cytosolique carboxy terminale de la protéine (Brauchi et al., 2006), alors que plusieurs sites importants pour l'action du menthol sont dispersés dans la boucle cytosolique carboxyterminale (Ct) et dans le second segment transmembranaire (Bandell et al., 2006). Les mécanismes de modulation par le PIP2 semblent faire intervenir des acides aminés du domaine « TRP » présents dans la boucle cytosolique Ct (Rohacs et al., 2005).

D'après nos résultats, la modulation de l'activité de TRPM8 par l'isoforme sTRPM8-6 est réalisée par un changement de stabilité de la conformation ouverte du canal lors de son activation par le menthol ou par le froid. Aucune différence notable de l' EC_{50} du menthol ou de la $\frac{1}{2} T(^{\circ}C)$ d'activation n'ayant été notée, il paraît peu probable que les isoformes sTRPM8 antagonisent un site putatif de fixation du menthol ou interfèrent avec le senseur de $T(^{\circ}C)$. Cependant, l'activité de l'iciline n'étant affectée que par sTRPM8 α , plus spécifiquement par la protéine sTRPM8-18, nous imaginons que la conformation ouverte du canal soit différente lors de l'activation par l'iciline ou par le couple menthol/froid. Nous avons de surcroît démontré la proximité des boucles Ct du canal avec les petites isoformes (figures 35.A et B). Comme les boucles Ct du canal sont nécessaires à la tétramérisation de TRPM8 et agissent comme senseur à la température et au PIP2 (Brauchi et al., 2006; Rohacs et al., 2005; Tsuruda et al., 2006), il est possible que

l'interaction des petites isoformes avec les boucles Ct de TRPM8 modifie leur conformation ou leur mobilité conformationnelle et entraîne ainsi une diminution de l'activité du canal.

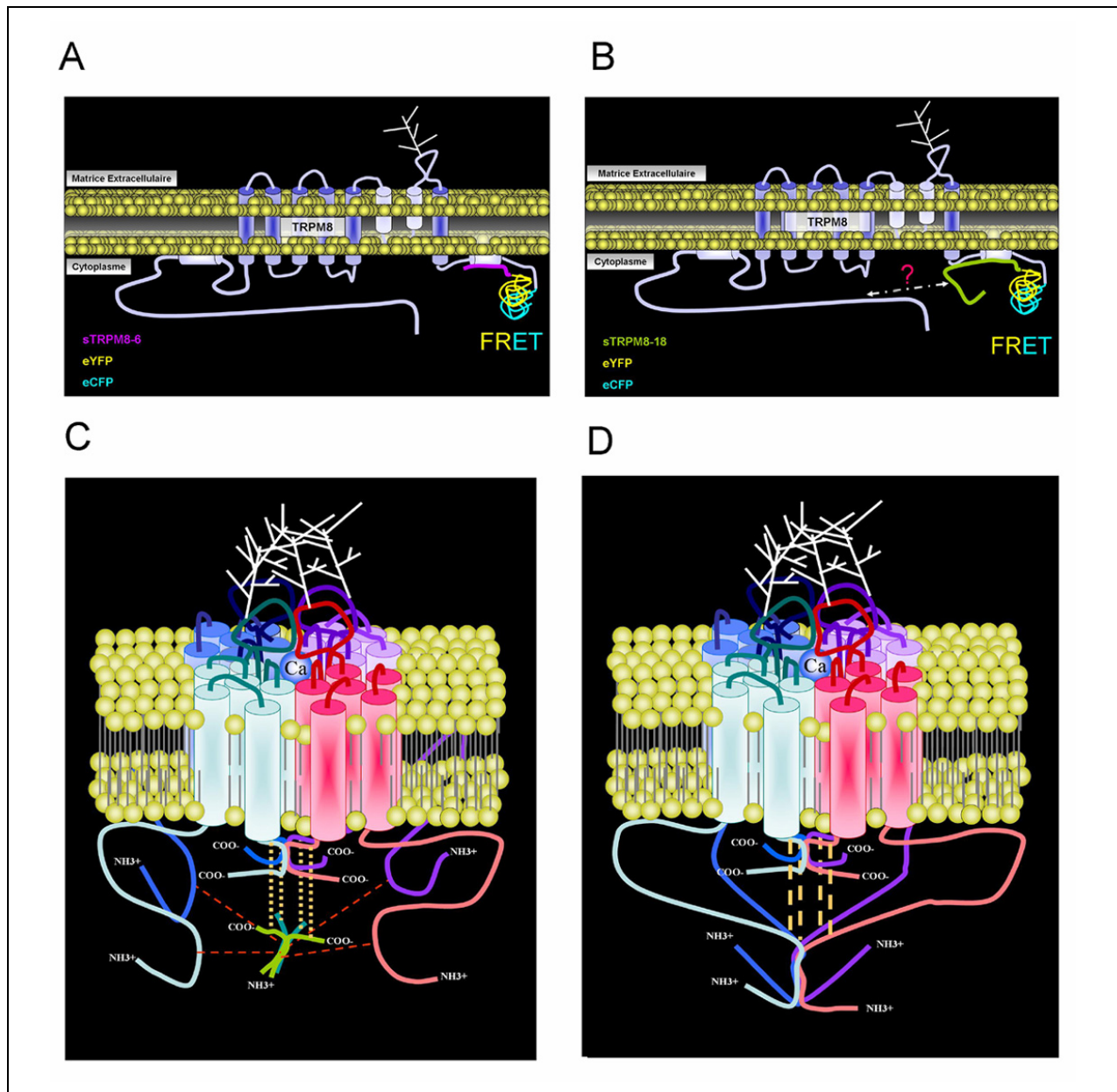


Figure 35 : Modèles d'interactions entre TRPM8 et les sTRPM8 et déduction de la relation conformation-activation de TRPM8. En se basant sur les résultats de FRET et sur les connaissances relatives au domaine TRP, **A** et **B** représentent un modèle d'interaction entre un monomère de TRPM8 et un monomère soit de sTRPM8-6 soit de sTRPM8-18. Les effets des isoformes étant dose-dépendant, leur modulation de l'activité de TRPM8 fait certainement intervenir un modèle de compétition. La figure **C** montre les interactions probables entre les boucles Ct et Nt du tétramère TRPM8 et un tétramère d'isoforme (probablement sTRPM8-18). La figure **D** présente une hypothèse sur le rôle des boucles Nt et Ct dans le phénomène de thermosensation en se basant sur l'antagonisme compétitif des sTRPM8.

L'action de l'isoforme sTRPM8-18 pourrait, en plus de l'effet porté par la forme sTRPM8-6, faire intervenir une interaction avec les boucles Nt de TRPM8 de manière à stabiliser le canal en position fermé même lors de l'activation par l'iciline (figure 35.C). En effet, il semblerait que l'isoforme sTRPM8-18 puisse former des multimères. Ce résultat implique que la séquence des boucles Nt de TRPM8, homologue à la séquence de l'isoforme sTRPM8-18, puisse interagir de la même manière (figure 35.D). Cette interaction des boucles Nt de TRPM8 entre elles pourrait être nécessaire à l'activité de TRPM8. Ainsi, la compétition de l'isoforme sTRPM8-18 sur ces sites pourrait expliquer l'inhibition de l'activité de TRPM8 quelque soit le stimulus. Selon ce modèle, une interaction entre les boucles Ct et les boucles Nt de TRPM8 par la séquence d'homologie avec sTRPM8-6 est envisageable.

L'une des questions les plus intéressantes est de savoir si le PIP2 et les lysophospholipides activent TRPM8 par le même changement conformationnel que le menthol. Il serait alors très probable que les sTRPM8 puissent moduler l'activation de TRPM8 par ces voies physiologiques. Comme dans le cas des neurones thermosensibles, les sTRPM8 joueraient alors le rôle de tampon du signal activateur, le canal TRPM8 nécessitant alors un signal plus intense (déplétion en PIP2 plus forte, synthèse de LPC ou PLI plus massive) pour atteindre un seuil d'activité suffisant pour déclencher le signal calcique voulu.

Il est de surcroît important de noter que cette modulation pourrait limiter l'une des voies d'activation de TRPM8 au profit d'une autre. Ainsi, l'application synergique de menthol et d'iciline déclenche un courant d'amplitude similaire à celui induit par l'application d'iciline et plus faible que le courant activé par le menthol. La conformation ouverte par l'iciline est donc prépondérante sur celle activée par le menthol. Au contraire, l'activation du courant global menthol est augmentée par la diminution de T (°C). Ces effets différentiels des modes d'activation du canal démontrent que TRPM8 se comporte comme un intégrateur moléculaire. Cette intégration est portée par la stabilité conformationnelle du canal en position « ouvert ». Il faut de surcroît prendre en considération le fait que le signal calcique subséquent à l'activation de TRPM8 pourra être différent en fonction du ou des stimuli affectant le canal ainsi qu'en fonction de l'intégration réalisée par le canal.

En conclusion, le rôle des isoformes sTRPM8 dans les cellules de la prostate pourrait être de moduler certaines voies physiologiques d'activation du canal TRPM8 (PIP2 ?, LPC/LPI ?) et modifier ainsi le signal calcique émergent. Ainsi, l'altération du ratio des expressions de TRPM8/sTRPM8 pourrait favoriser le « détournement » du rôle physiologique de TRPM8 vers un rôle pro-oncogénique.

III.B) Dans les neurones thermosensibles

Nous avons démontré que les petites isoformes sTRPM8 α et sTRPM8 β agissent comme sous-unités régulatrices du canal TRPM8 en diminuant la probabilité d'ouverture du canal. Nous avons démontré que le rapport d'expression entre TRPM8 et les sTRPM8 définissait l'amplitude de cette modulation. De manière globale, nos résultats portant sur l'augmentation de la stabilisation du canal dans son état fermé et nos résultats démontrant une désensibilisation au voltage prouvent que les petites isoformes sTRPM8 α et sTRPM8 β sont responsables d'un changement thermodynamique important sur la structure quaternaire du canal conduisant à sa stabilisation dans l'état fermé et augmentant ainsi l'énergie requise pour entraîner son activation par le menthol ou le froid (cf. introduction § V.A et figure 16).

Bien que nous n'ayons pu détecter l'expression des petites isoformes dans un lot d'ARN de DRG humains, nous ne pouvons exclure que certaines fibres afférentes expriment les sTRPM8. Nous proposons donc que suivant leur expression, hypothétique, dans les neurones thermosensibles, l'expression des sTRPM8 pourrait participer à la modulation du seuil de température d'activation de TRPM8. Cette diminution de la température seuil aurait alors pour conséquence de limiter l'amplitude de la dépolarisation induite par l'activation de TRPM8. Cette dépolarisation atteindrait donc plus difficilement le seuil de déclenchement des potentiels d'action.

Ainsi en fonction du rapport TRPM8/sTRPM8, la température capable de générer le déclenchement d'un message nerveux pourrait dépendre de l'expression des sTRPM8. Ce mode de régulation de la sensibilité de TRPM8 au froid pourrait potentiellement doter l'organisme d'un réseau très précis de senseurs capables de détecter des différences de température de l'ordre de quelques degrés Celsius.

Deux équipes ont démontré l'existence d'au moins deux sous-types de DRG sensibles au menthol et caractérisés par la mesure de la concentration de Ca²⁺ libre en imagerie calcique (Nealen et al., 2003; Thut et al., 2003). Une des populations répondait lentement mais possédait un seuil d'activation d'environ 29°C (fibres A δ) alors que la seconde population répondait massivement à une température moyenne de 20°C (fibres nociceptives C). En comparaison, le canal TRPM8 surexprimé dans des plusieurs modèles hétérologues (ovocytes, cellules HEK, ou neurones hippocampaux) présente un seuil d'activation à la température d'environ 29°C. Il existe donc bien une variabilité importante du seuil de la température d'activation du canal TRPM8.

Selon, notre hypothèse, il est très probable que la modulation de l'activité de TRPM8 par les isoformes sTRPM8 puisse expliquer ces différences de sensibilité à la diminution de température.

Perspectives

Les hypothèses découlant de ce travail sont nombreuses et diverses perspectives s'ouvrent sur l'étude du canal TRPM8 dans la prostate. Je finirai donc cette thèse par la description succincte des recherches en cours ou en projet.

I) Description du(es) rôle(s) physiologique(s) de TRPM8 dans la prostate.

Afin de mieux appréhender le rôle physiologique de TRPM8 dans la prostate, nous avons, grâce à l'obtention d'un financement par l'Agence Nationale de Recherche, initié le développement d'un modèle de souris Knock-out pour TRPM8. Ce modèle animal, en plus de nos études *in vitro*, devrait nous permettre d'appréhender un rôle de TRPM8 dans la fonction de reproduction. Nous réaliserons l'analyse fonctionnelle de la prostate pendant que notre laboratoire partenaire étudiera l'implication de TRPM8 dans les testicules et plus exactement dans la spermatogenèse.

Techniquement, nous avons opté pour une stratégie d'obtention d'un KO fonctionnel. C'est-à-dire que les ARN de TRPM8 et les protéines seront synthétisées. Cependant, la délétion de plusieurs segments transmembranaires ainsi que de la boucle-P rendra inexistant le pore ionique. Nous avons favorisé cette stratégie afin de s'assurer de l'inactivation de toutes les isoformes de TRPM8, où que soient situés leurs promoteurs sur la séquence génomique. Les animaux développés dans un premier temps seront des KO constitutifs et ubiquitaires. En fonction, de la viabilité des animaux et de leur capacité de reproduction, nous pourrons alors opter pour un des KO spécifiques de la prostate et conditionnels.

Ce travail sur un modèle animal sera complété et réalisé en parallèle à nos études *in vitro*.

Parmi les axes en développement, se trouve l'étude du rôle du PSA sur l'activité de TRPM8. Nos résultats préliminaires, non présentés dans cette thèse, suggèrent que l'application du PSA induit l'activation du courant TRPM8. Le but premier de cette étude pourrait être de déterminer le mécanisme moléculaire par lequel le PSA active le canal TRPM8.

Ce premier travail pourrait s'achever par l'étude du trio PSA, Zn^{2+} et TRPM8. En effet, je l'ai discuté précédemment, l'ion Zn^{2+} est reconnu pour avoir un effet inhibiteur sur l'activité protéasique du PSA. En outre, il n'est pas à exclure que le canal TRPM8 pourrait faire transiter le Zn^{2+} du lumen vers le cytosol des cellules épithéliales apicales. Néanmoins, ce type de sujet nécessite le développement d'une lignée cellulaire présentant un phénotype proche de celui des cellules épithéliales sécrétrices matures.

Le développement d'un modèle de cellules épithéliales apicales sécrétrices est, depuis l'initiation du projet TRPM8, le point le plus important mais aussi le plus problématique que j'ai pu rencontrer. Comme nous l'avons expliqué au cours cette thèse, la lignée LNCaP est la seule lignée cellulaire à exprimer la forme classique de TRPM8, mais n'est en aucun cas un modèle d'étude pour le rôle physiologique de TRPM8 puisqu'il n'est pas exprimé à la membrane de ces cellules. Les cultures primaires de cellules épithéliales ne produisent que peu de cellules, rapidement dédifférenciées et présentant une certaine variabilité en fonction des patients et des zones prélevées. C'est pourquoi, dans le but de décrypter le rôle hypothétique de TRPM8 dans la sécrétion de l'épithélium prostatique, il reste essentiel de développer une lignée de cellules épithéliales apicales présentant les fonctions PM TRPM8 et ER TRPM8 et sécrétant le PSA. Par exemple, l'utilisation d'une lignée surexprimant le récepteur des androgènes pourrait peut-être présenter les deux activités de TRPM8. Une alternative possible serait de développer la coculture primaire de cellules épithéliales et de cellules musculaires lisses. En effet, nos premiers résultats semblent montrer un maintien de l'expression du TRPM8 classique dans les cellules épithéliales dans ces conditions de coculture.

II) Implication de TRPM8 dans la métastase des cellules de la prostate

Bien que n'étant pas un modèle de choix pour l'étude de la fonction normale de TRPM8, la lignée LNCaP reste un modèle cohérent pour l'étude du rôle de TRPM8 dans la métastase de la prostate. Plusieurs problématiques font ou devraient faire l'objet de recherches :

- Comprendre les mécanismes moléculaires expliquant le rôle de l'activité ER TRPM8 dans la prolifération et la survie de ces cellules.
- Rechercher une éventuelle corrélation entre le taux d'expression des isoformes de TRPM8 et le grade du cancer.
- Etudier le rôle des petites isoformes s TRPM8 dans le pouvoir métastatique des LNCaP : favorise ou contrôle la prolifération, la survie de ces cellules ?
- Décrypter le mécanisme de rétention de TRPM8 dans le réticulum endoplasmique de ces cellules.
- Le développement de lignées cellulaires Knock-down pour TRPM8 ou réexprimant PM TRPM8, et leur utilisation dans des modèles de xénogreffes pourraient permettre d'analyser l'impact de l'expression de TRPM8 et de sa

rétention dans le réticulum endoplasmique sur le pouvoir métastatique de ces cellules.

III) Régulation de l'activité du canal TRPM8.

Certains de nos travaux préliminaires, non évoqués dans cette thèse, portent sur la régulation de l'activité du canal TRPM8 par le couple Protéine Kinase A (PKA) / PhosphoDiEstérase (PDE). Grâce à la génération, par mutagenèse dirigée, d'un canal TRPM8 dont l'unique site consensuel de phosphorylation par la PKA a été muté, nous avons mis en évidence que la phosphorylation de ce site est essentielle à l'activité du canal. D'autre part, l'inhibition de l'activité de la PKA provoque une diminution de l'activité du canal. La poursuite de ces travaux devrait permettre de confirmer ces résultats, d'essayer d'en comprendre le mécanisme et le rôle physiologique.

Le recoupement de nos travaux portant sur : 1) la régulation de $_{PM}TRPM8$ par la phospholipase A2 indépendante du calcium, groupe VIA (iPLA2 β), 2) la mise en évidence d'une isoforme de TRPM8 spécifique de la membrane du réticulum endoplasmique, et 3) l'existence d'une phospholipase A2 indépendante du calcium, groupe VIB (iPLA2 γ), spécifique du réticulum endoplasmique (Kinsey et al., 2005), nous conduisent à émettre l'hypothèse que l'activité de la iPLA2 γ dans le réticulum endoplasmique pourrait participer à la régulation physiologique de l'activité $_{ER}TRPM8$. En effet, la iPLA2 γ est encodée par un gène différent de celui encodant la iPLA2 β et possède une séquence protéique différente de cette dernière (Mancuso et al., 2000). Cependant, iPLA2 β et iPLA2 γ présentent une conservation remarquable de leurs sites catalytiques et produisent les mêmes catabolites (lysophospholipides). Nos premiers résultats indiquent que l'ARN de la iPLA2 γ est exprimé dans la lignée cellulaire LNCaP, ainsi que dans les cellules musculaires lisses de la prostate. Nous développerons donc une approche utilisant l'ARN interférence contre la iPLA2 γ dans le but d'étudier son impact sur l'activité de $_{ER}TRPM8$.

L'étude de la structure du pore ionique du canal TRPM8 est un axe de recherche capital dans l'optique de développer de nouveaux outils permettant de moduler sélectivement l'activité du canal TRPM8. Ainsi, la mutagenèse dirigée du pore ionique peut mener au développement de canaux mutants dont la sélectivité ionique serait modifiée ou encore de mutants inactivés du canal. Au-delà de l'analyse purement biophysique, ce type de mutant pourrait conférer la capacité d'altérer le fonctionnement du canal endogène de manière plus ciblée que l'extinction pure et simple du gène. Nous pourrions même envisager d'inhiber spécifiquement la fonction

ER TRPM8 sans modifier PM TRPM8 ou réciproquement dans le but d'analyser le rôle de chacune de ces fonctions.

La réalisation de tels mutants a déjà commencé au sein de notre laboratoire et devrait être poursuivie.

Enfin, nos travaux ont mis en évidence un système d'activations croisées de plusieurs canaux : ER TRPM8, PM TRPM8, SOC. En effet, nous avons démontré que l'activation de ER TRPM8 entraîne l'activation du SOC et que la vidange de Ca^{2+} réticulaire induite par l'application de la Tg provoque l'activation de PM TRPM8 *via* la $iPLA2\beta$.

La seule question restant en suspens dans ce schéma est de savoir si la vidange de Ca^{2+} réticulaire par ER TRPM8 peut entraîner l'activation de PM TRPM8 *via* la $iPLA2\beta$. La génération d'un canal PM TRPM8 insensible à l'iciline et la cotransfection avec une isoforme ER TRPM8 activable par l'iciline pourraient nous permettre de tester cette hypothèse.

IV) Etude des isoformes de TRPM8 dans la peau et le foie humain.

Dans l'exposé de notre travail sur les kératinocytes, je concluais que cette isoforme réticulaire de TRPM8 pourrait être impliquée dans la modulation de la prolifération de ces cellules. Alternativement, un criblage rapide de l'expression de TRPM8 sur du tissu sain et cancéreux de foie humain a révélé l'expression d'une isoforme de TRPM8 qui selon toute vraisemblance serait la même que celle exprimée dans les kératinocytes. Cependant, l'une des caractéristiques des hépatocytes est que ils ne sont quiescents dans le foie adulte. Toute leur activité est dédiée au métabolisme et au catabolisme. Ces cellules absorbent et sécrètent énormément, elles participent à la détoxification du sang et à la sécrétion des sels biliaires. L'étude du rôle de cette isoforme de TRPM8 dans les hépatocytes revêt donc un intérêt nouveau et nous pourrions utiliser toutes nos connaissances sur TRPM8 et nos outils (mutants, isoformes, siARN...) pour étudier le rôle de ER TRPM8 dans cet organe. En outre, le développement du modèle KO de TRPM8 augmenterait considérablement les possibilités techniques mises à disposition pour ce projet.

Notre travail sur les kératinocytes, bien qu'encore préliminaire, pourrait se prolonger par l'étude de TRPM8 dans les maladies dermatologiques hyperprolifératives comme le psoriasis ou le cancer baso-cellulaire. L'analyse de l'expression et de l'activité de TRPM8 pourrait, le cas échéant, permettre de valider son utilisation comme cible thérapeutique. Ce travail nécessitera dans un premier temps de cloner cette isoforme afin de développer les outils nécessaires à son étude (anticorps monoclonaux, lignée cellulaire hétérologue...). Le développement du modèle de

souris TRPM8^{-/-} améliorera considérablement les capacités techniques pour l'étude du rôle de TRPM8 dans la régénération et la cicatrisation de la peau.

Conclusion générale de la thèse

En définitive, l'ensemble de cette thèse a contribué à l'amélioration des connaissances portant sur l'expression, la régulation de l'expression, la fonctionnalité et la régulation de la fonctionnalité du canal ionique TRPM8 dans les cellules épithéliales de la prostate. La stratégie multidisciplinaire et le travail en équipe ont permis de constamment valider avec réciprocity l'expression et l'activité du canal.

Finalement, ce travail ouvre de nombreuses perspectives qu'elles portent sur l'émergence des isoformes ou sur les voies physiologiques de régulation de l'expression du gène *trpm8* ou de l'activité du canal TRPM8.

Publications

Le symbole : † signifie que les auteurs ont contribué également à ce travail.

- 1) Gabriel Bidaux, Morad Roudbaraki, Carole Merle, Alexandre Crépin, Philippe Delcourt, Christian Slomianny, Stéphanie Thebault, Jean-Louis Bonnal, Mohamed Benahmed, Florence Cabon, Brigitte Mauroy and Natalia Prevarskaya. **“Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement”**. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jun;12(2):367-82.
- 2) Stéphanie Thebault†, Loïc Lemonnier†, Gabriel Bidaux†, Matthieu Flourakis, Alexis Bavencoffe, Dimitri Gordienko, Morad Roudbaraki, Philippe Delcourt, Yuri Panchin, Yaroslav Shuba, Roman Skryma, and Natalia Prevarskaya. **“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*, Vol. 280, Issue 47, 39423-39435, November 25, 2005
- 3) Florian Gackière†, Gabriel Bidaux†, Philippe Lory, Natalia Prevarskaya and Pascal Mariot. **“A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating “capacitative” calcium entry?”** *Cell Calcium*. 2006 Apr;39(4):357-366.
- 4) Franck Vandermoere, Ikram El Yazidi-Belkoura, Christian Slomianny, Yohann Demont, Gabriel Bidaux, Éric Adriaenssens, Jérôme Lemoine, Hubert Hondermarck. **“The Valosin-containing protein (VCP) is a target of Akt signaling required for cell survival”**. *Journal of Biological Chemistry*, 2006 may 19 ;281(20) :14307-13.
- 5) Fabien Vanden Abeele†, Gabriel Bidaux†, Dimitri Gordienko†, Benjamin Beck, Yuri V. Panchin, Ancha V. Baranova, Dmitry V. Ivanov, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya. **“Functional implications of calcium permeability of the channel formed by Pannexin 1”**. *Journal of Cell Biology*. 2006 14 august; 174(4):535-546.
- 6) Benjamin Beck, Gabriel Bidaux, Alexis Bavencoffe, Loïc Lemmonier, Stéphanie Thebault, Yaroslav Shuba, Greg Barrit, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya. **“Prospects for prostate cancer imaging and therapy using high-affinity TRPM8 activators”**. *Cell Calcium*. 2006 Aug 31; [Epub ahead of print].
- 7) Alexandre Crépin, Gabriel Bidaux, Fabien Vanden-Abeele, Etienne Dewailly, Vincent Goffin, Natalia Prevarskaya and Christian Slomianny. **“Prolactin stimulates prostate cell**

proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression". *Biochem. J.* (2006) *Immediate Publication*, doi:10.1042/BJ20060870

- 8) Fabien Vanden Abeele^{1†}, Alexander Zholos[†], Gabriel Bidaux[†], Yaroslav Shuba, Stephanie Thebault, Benjamin Beck, Matthieu Flourakis, Yuri Panchin, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya. **"iPLA2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids"**. *Journal of Biological Chemistry*. (accepté septembre 2006)
- 9) Gabriel Bidaux[†], Matthieu Flourakis[†], Stéphanie Thebault, Alexander Zholos, Benjamin Beck, Morad Roudbaraki, Jean-Louis Bonnal, Brigitte Mauroy, Yaroslav Shuba, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya. **"Differentiation status of prostate cells determines TRPM8 channel subcellular localization and function: involvement in carcinogenesis"**. *Journal of Clinical Investigation*. (revision septembre 2006)
- 10) Gabriel Bidaux^{1†}, Benjamin Beck^{1†}, Oleksander Zholos, Matthieu Flourakis, Morad Roudbaraki, Philippe Delcourt, Gilbert Lepage, and Natalia Prevarskaya. **"Modulation of Cold/menthol sensitivity of the TRPM8 channel involves short TRPM8 isoforms as channel regulatory sub-units."** (*En preparation*).

Nouveau chapitre de la thèse

Nouveau chapitre de la thèse 2006

Thèse de science de la vie et de la santé :

**« Caractérisation du canal calcique TRPM8 et son rôle
dans la physiopathologie de la prostate »**

Gabriel BIDAUX

Ecole Doctorale : Biologie-Santé

Directeur de thèse : Pr Natalia PREVARSKAYA (USTL)

Mentor : Viviane REBOUD (Consultante)

Date probable de soutenance : Novembre 2006

Laboratoire INSERM U 800 « Physiologie cellulaire »

Université des Sciences et Technologies de Lille

Villeneuve d'Ascq, France

Avant-propos

Ce travail est organisé par l'Association Bernard Grégory et offre l'opportunité aux doctorants de réaliser un bilan socio-économique de la thèse. Le nouveau chapitre s'organise autour d'un bilan écrit suivi d'un petit oral qui fut rélalisé devant des membres de plusieurs écoles doctorales, mais aussi et surtout devant des professionnels du recrutement (DRH, représentante de la chambre du commerce et de l'industrie).

Sommaire

I) Cadre général et enjeux de la thèse.

I.A) Présentation succincte283

I.B) Les enjeux de ma thèse283

I.C) Résultats attendus284

II) Contexte de ma thèse :

II.A) Choix du laboratoire et du projet de recherche.....284

II.B) Le laboratoire INSERM U800 dans le contexte
national et régional.....284

II.C) Ma thèse dans le programme de recherche
du laboratoire285

II.D) Concurrence internationale285

III) Déroulement, gestion et coût de mon projet

III.A) Préparation et cadrage.....286

III.B) Moyens mis à disposition pour la réalisation de ma thèse 286

III.C) Conduite du projet.....287

III.D) Evaluation et prise en charge du coût.....288

IV) Compétences et savoir-faire

IV.A) Vie en entreprise.....289

IV.B) Introspection290

IV.C) Communication.....290

IV.D) Gestion.....291

IV.E) Analyse et Stratégie291

V) Résultats et impacts de la thèse292

I) Cadre général et enjeux de la thèse

I.A) Présentation succincte

« Caractérisation du canal calcique TRPM8 et son rôle dans la physiopathologie de la prostate ».

Le gène *trpm8* code pour une protéine de type transporteur aussi appelé « canal ». Cette famille de protéine a pour fonction de « transporter » les ions tels que le calcium, le sodium et le potassium de part et d'autre de la membrane cellulaire.

La protéine TRPM8 a, dans un premier temps, été caractérisée comme étant le récepteur au froid des neurones thermosensibles. Notre démarche tire son originalité du fait que nous étudions le rôle du récepteur au froid TRPM8 dans la physiologie et la cancérogenèse de la prostate.

Nous avons démontré dans un premier temps que le canal TRPM8 fonctionne dans la membrane extérieure des cellules sécrétrices de la prostate mais aussi de manière totalement atypique dans leurs membranes internes. Nous avons d'autre part démontré que, lors de la cancérisation de la prostate, des dérégulations de l'activité du canal TRPM8 apparaissent. Nos travaux proposent plusieurs explications à ces dérégulations. J'ai de surcroît caractérisé plusieurs petites protéines apparentées au canal TRPM8 dont nous avons démontré qu'elles participent à la régulation de l'activité du récepteur au froid. Il semblerait que la synthèse de ces petites protéines apparentées fluctue lors de l'oncogenèse de la prostate, pouvant ainsi révéler un rôle de ces petites protéines dans le phénomène de cancérisation.

I.B) Les enjeux de ma thèse

- Enjeux scientifiques : Notre laboratoire était depuis sa création spécialisé dans l'étude des protéines-canal. Cependant, ma thèse a spécifiquement initié l'étude du canal TRPM8. Ce sujet de recherche est, depuis, devenu l'un des plus importants du laboratoire.
- Enjeux techniques : maîtrise des techniques de biochimie, de biologie moléculaire et cellulaire et d'imagerie cellulaire.
- Enjeux économiques : mon travail s'inscrit dans le domaine de la recherche fondamentale en cancérologie. De ce fait, il s'intègre dans la politique économique de la France initiée avec les premiers plans Cancer. Les retombées économiques attendues resteront indirectes puisque mon travail s'inscrit dans le cadre de la recherche fondamentale. Cependant, des demandes de brevets pourraient être déposées en cas de découvertes commercialisables.
- Enjeux sociétaux : à mon arrivée au sein du laboratoire de physiologie cellulaire, la composante Biologie Moléculaire était représentée par le seul Dr M. Roudbaraki. Le

matériel alors acquis était très limité, si bien que les besoins de développement de cette branche au sein du laboratoire étaient évidents. Les enjeux étaient donc d'accroître nos moyens humains et matériels en biologie moléculaire tout en instaurant des règles de fonctionnement adaptées au nombre de personnes.

I.C) Résultats attendus

Les objectifs fixés lors de l'obtention de ma bourse de thèse étaient :

- Etude de la détermination de voies d'activation du canal TRPM8.
- Etude de la composition moléculaire du canal TRPM8 fonctionnel.
- Etude de la relation entre les androgènes, l'expression et le fonctionnement du canal TRPM8 au cours de l'oncogenèse de la prostate.

Tous ces objectifs ont été atteints ou sont en voie de l'être.

II) Contexte de ma thèse

II.A) Choix du laboratoire et du projet de recherche

Après une dizaine d'entretiens (à Lille et à Paris), mon choix s'est porté sur cette équipe, non pour le projet de recherche qui restait une idée très floue à la fin de la maîtrise de Biologie, mais pour la dynamique du laboratoire et la meilleure probabilité d'en retirer une allocation de recherche qui me permettrait d'effectuer ma thèse.

Le projet général a été défini par ma directrice de thèse : le Pr N. Prevarskaya. Pour les axes spécifiques et les stratégies précises, le Pr Prevarskaya et moi avons collaboré de manière dynamique et synergique. En définitive, j'ai pu définir la plupart de mes stratégies de recherche, ma directrice de thèse recadrant le sujet en cas de besoin. Ce mode de gestion m'a *de facto* appris à être autonome et indépendant tout en me faisant comprendre que l'organisation, la rigueur, la collaboration, et la créativité assortie de pragmatisme étaient des qualités capitales.

II.B) Le laboratoire INSERM U800 dans le contexte national et régional

Le laboratoire de physiologie cellulaire est une équipe mixte appartenant à l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) et à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL). Notre équipe est labellisée par la Ligue contre le Cancer et la région Nord-Pas-de-Calais et nous avons obtenu des financements de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). D'autre part, notre laboratoire est pleinement impliqué dans la

généopôle lilloise ainsi que dans la cancéropôle Nord (regroupant les régions Normandie, Picardie, Nord-Pas-de-Calais et la ville de Bruxelles). Nous participons également au programme de coopération européenne INTAS avec un laboratoire autrichien et un laboratoire ukrainien. Enfin, notre équipe collabore avec les Laboratoires Pierre Fabre dans le cadre de la recherche sur le cancer de la prostate ainsi que sur l'étude de l'épiderme.

Nous travaillons en lien étroit avec le service Urologie du Dr Mauroy de l'hôpital Saint Philibert à Lomme. Cette collaboration nous donne accès à des prélèvements de tissus prostatiques issus d'exérèses. Nous pouvons ainsi établir des stratégies de recherche avec des modèles biologiques plus proches des conditions physio-pathologiques de l'organisme.

Le financement de ma thèse provient d'un apport paritaire de l'INSERM et du Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais. Ce financement m'est versé sous forme d'allocation de recherche par l'INSERM, dont je suis le salarié.

II.C) Ma thèse dans le programme de recherche du laboratoire

Ma thèse a initié un nouvel axe de recherche et finalement permis de le faire émerger comme l'un des axes les plus dynamiques et les plus prometteurs du laboratoire. Depuis 2003, l'équipe travaillant à plein temps sur TRPM8 est passée de 3 à 7 personnes. Le nombre de sujets portant sur TRPM8 est passé d'un axe de prospection à environ 8 axes propres. Toutes les demandes de financements du laboratoire ont inclus cette dernière année une partie portant sur le projet TRPM8. La collaboration avec les laboratoires Pierre Fabre et les demandes de projets exceptionnels comme celui de l'Agence Nationale de Recherche (ANR) comportent toutes en partie le projet TRPM8. En conclusion, ce projet a fini par devenir le projet du laboratoire qui requiert le plus de ressources humaines et financières. Il a en outre nécessité l'acquisition de technologies émergentes qui sont dorénavant utilisées de manière courante au sein de notre unité.

II.D) Concurrence internationale

Nous avons démarré ce projet en 2003 alors que le gène *trpm8* avait été découvert en 2001 et déjà caractérisé partiellement en 2002. Nous étions donc et sommes toujours en concurrence avec plusieurs équipes américaines, australiennes, allemandes, autrichiennes, belges... Cependant, notre démarche s'inscrit dans le cadre particulier de la prostate, alors que la majorité de nos concurrents s'est focalisée sur le rôle de la protéine TRPM8 dans les neurones thermosensitifs.

D'autre part, l'étude de TRPM8 étant étroitement liée à celle du cancer de la prostate, certaines sociétés privées se sont intéressées à des problématiques similaires aux nôtres.

Au cours de ma thèse, j'ai réalisé une veille concurrentielle, afin de constamment déterminer les sujets sur lesquels nous étions et sommes toujours parmi les plus compétitifs.

III) Déroulement, gestion et coût de mon projet

III.A) Préparation et cadrage

J'ai vécu le déroulement de ma thèse comme un projet dynamique dépourvu d'objectifs réellement quantifiables, mais avec des impératifs de temps et une *exigence* de résultats. En d'autres termes, à la différence d'un projet dont on peut maîtriser les risques et prévoir les résultats, une thèse de biologie reste un projet risqué (pour le laboratoire d'accueil comme pour le doctorant) souvent caractérisé par un rendement faible. Nous avons donc, avec le Pr Prevarskaya, commencé par définir quatre conditions dites « de succès » de ma thèse:

- Obtention de résultats publiables et publiés dans des revues scientifiques de bon niveau : ce qui permet de juger de la réalité et de la qualité du travail accompli.
- Maîtrise des techniques de biologie moléculaire et cellulaire et connaissances poussées des autres techniques utilisées au laboratoire : ce qui permet d'envisager une plus grande diversité de stratégies et/ou de réponses aux problèmes posés.
- Recherche de collaboration sur mon sujet : interagir et fédérer les autres autour d'un projet commun.
- Collaboration sur d'autres sujets : ce qui permet d'utiliser ses compétences pour augmenter son rendement au sein du laboratoire, et de créer des conditions de collaboration pouvant ensuite servir à mon projet ; souci de travailler pour les autres et pour le laboratoire.
- Participation aux congrès, réunions, formations (scientifiques et non-scientifiques) : étendre ses connaissances, son réseau, ses compétences hors du domaine scientifique *stricto sensu* (ex : maîtrise de l'anglais).

III.B) Moyens mis à disposition pour la réalisation de ma thèse :

Le développement de ma thèse s'étant déroulé en parallèle avec l'évolution de l'équipe Biologie Moléculaire, j'ai rapidement pris en main le système de commandes/gestion des stocks pour cette équipe. La directrice du laboratoire m'a accordé sa confiance dans la gestion économique de ma thèse. Tous les moyens nécessaires ont été libérés. Dans les situations de besoins financiers plus lourds, le Dr Roudbaraki et moi-même avons préparé les demandes de financement nécessaires, lesquelles ont toutes été acceptées.

Les moyens scientifiques ont toujours été présents sous forme de discussions informelles ou de réunions avec les membres du laboratoire. J'ai de surcroît pu collaborer avec de nombreux scientifiques français grâce au réseau de ma directrice de thèse. Enfin, j'ai participé à sept congrès, bénéficié ainsi de nombreux conseils et réalisé une veille scientifique et technique.

Pendant ces trois ans, j'ai eu le plaisir et la responsabilité de former deux stagiaires et deux techniciens aux techniques de biologie moléculaire. Une fois ces techniques acquises, ces personnes ont pu aider à réaliser de nombreuses expériences destinées ou non à ma thèse. Par ailleurs, les chercheurs compétents dans d'autres domaines ont toujours pris le temps de m'aider. En retour, j'ai mis en place au laboratoire l'utilisation de technologies telle que l'ARN interférence, la nucléofection, la purification de protéine recombinante ; j'ai participé à l'acquisition d'autres technologies comme la technique de FRET en microscopie confocale et amélioré des techniques déjà présentes, par exemple la culture de cellules primaires de prostate issues de prélèvements chirurgicaux.

III.C) Conduite du projet

Beaucoup de jeunes doctorants se représentent la thèse comme une course d'endurance. Pour ma part, je pense que la thèse est un sprint de trois ans avec trois phases : le départ, l'accélération et la concrétisation.

Ainsi, mon calendrier s'est-il naturellement imposé au fil des expériences et compétences acquises :

Année 1 : élaboration des bases scientifiques de notre projet et acquisition des techniques élémentaires. Stratégie de recherche la plus vaste possible et de type arborescente : à partir d'une idée floue faire émerger plusieurs axes après l'obtention des premiers résultats.

Année 2 : synthèse de l'année 1 et définition des axes à conserver. Amélioration de protocoles, mise en place de nouvelles techniques nécessitées par le projet.

Année 3 : la plus intéressante, car elle permet de profiter de toutes mes précédentes expériences afin de finaliser mes projets et de finir ma thèse en trois ans, temps imparti par le calendrier.

Les réunions formelles et informelles avec ma directrice de thèse, le Pr Prevarskaya, m'ont permis de mettre en place des stratégies dynamiques focalisées sur l'objectif final : la publication des résultats. Cette idée pourrait paraître incongrue dans le monde de la recherche académique, mais le Pr Prevarskaya a eu le bon sens de me faire comprendre que, bien qu'étant non lucrative, notre recherche devait tendre à être la plus utile et la plus rentable possible. Cette manière de travailler nécessite certes des garde-fous pour garantir la qualité de la recherche mais permet d'être compétitif sur le plan international.

Le seul paramètre que j'ai parfois vécu comme une contrainte fut le fait de travailler sur des axes nombreux et variés, en collaboration ou non. J'ai dû très souvent faire avancer de front plusieurs sujets tout en collaborant avec d'autres personnes sur leurs propres axes de recherche. Cette façon de travailler m'a appris à hiérarchiser mes tâches quotidiennes, à travailler avec les autres et à gérer le travail des techniciens et des stagiaires. Cela m'a aussi fait réaliser que le statut peut être un frein à la productivité de notre recherche, alors qu'elle devrait avant tout être régie par la motivation et le travail. En définitive, je constate à regret que mon statut d'étudiant ne m'a pas toujours facilité la tâche, notamment pour la gestion du temps de travail des techniciens et des stagiaires.

Je pense cependant avoir rempli les quatre conditions de succès précédemment définies. J'ai publié mes travaux dans des revues scientifiques de qualité (trois sur ma thématique et trois en collaboration). J'ai acquis un grand nombre de techniques de biochimie, biologie moléculaire, biologie cellulaire et imagerie cellulaire. J'ai collaboré avec les Dr F.Cabon (Paris), M.Benhammed (Lyon), J.Lesage (Lille), Y.Panchin (Moscou), O.Zholos (Londres), D.Gordienko (Londres), Y.Shuba (Kiev), A.Pourtier (Lille) ; avec le laboratoire INSERM du Pr H.Hondermark, Lille ; avec la société Astra-Zeneca (Grande Bretagne) et avec presque tous les membres de mon laboratoire. Enfin, j'ai participé à sept congrès et trois formations (cf. bilan financier).

III.D) Evaluation et prise en charge du coût

Mon projet de thèse s'est déroulé sur trois ans. Le coût total du projet correspond à la somme des frais de fonctionnement comprenant les **salaires bruts** (pour moi-même, les techniciens et ma directrice de thèse au prorata de leurs implications), les frais d'environnement (1,8 selon l'INSERM), les coûts des produits consommables (**TTC**), les prestations de service (**TTC**), les achats d'équipements (au prorata du temps d'utilisation et de la période d'amortissement, **TTC**).

Les recettes sont composées de la somme des financements exceptionnels (hors budget récurrent du laboratoire) récupérés pour le groupe Biologie Moléculaire avec un taux de 80% représentant l'utilisation des ces sommes pour mes projets (hors Ligue contre le Cancer, 20%).

Le détail des dépenses et recettes est reporté dans le tableau ci-dessous :

Dépenses					
<i>Fonctionnement</i>	<i>Coût (€)</i>	<i>Prestations de service</i>	<i>Coût (€)</i>	<i>Congrès+formations</i>	<i>Coût (€)</i>
enzymes	5369	anticorps 2003	1 957,95	Louvain 2005	600,00
oligonucléotides	2 000,00	anticorps 2005	4 580,52	Gien 2005	300,00
anticorps	3 000,00	séquençage	7 000,00	Homburg 2004	250,00
plasmides	1 500,00	clonage TRPMB	500,00	Journée Andrée Verbert 2005	0,00
matériel culture cellulaire	6 000,00			Journée de cancérologie Lilloise 2004	0,00
pipettes+cônes	3 000,00			Carrefour européen des biotechnologies 2005	0,00
petit matériel de paillasse	1 500,00			Saint Valérie s/ Somme	500,00
Purification de molécules biologiques	2 851,00			Formations INSERM	400,00
Produits divers	500,00				
Total	25 720,00	Total	14 038,47	Total	2 050,00
<i>Moyens Humains sur 36 mois</i>	<i>Coût brut (€), hors charges patronnales</i>	<i>Equipements</i>	<i>Taux d'utilisation sur 3 ans</i>	<i>Temps d'amortissement</i>	<i>Coût (€)</i>
Allocation de recherche	52 200,00	Thermocycleur	30%	10	2 000,00
Techniciens 30%	20 400,00	incubateur	70%	5	1 000,00
Prof Prevorskay 10%	15 000,00	centrifugeuses	30%	5	800,00
		Congélateur -80°C	20%	10	600,00
		Bain-marie	30%	2	200,00
		Hottes	30%	3	500,00
Total	87 600,00				
*Taux d'environnement (1,8)	157 680,00	Total			5 100,00

Recettes	<i>Coût (€)</i>
Projet Génopôle	4 000,00
Projet séquençage, société Génoscreen	8 000,00
Projet anticorps, Laboratoires Pierre Fabre	7 000,00
Labellisation par la Ligue contre le Cancer (20% sur trois ans)	18 000,00

Total des dépenses	-204 588,47 €
Total des recettes	37 000,00 €
Coût consolidé de la thèse	-167 588,47 €

Le **coût total de ma thèse** s'élève donc à une dépense nette d'environ **167 588 € TTC**.

IV) Compétences et savoir-faire

Ma thèse s'inscrit à la fin d'un long cursus étudiant, lui-même composante de ma propre expérience issue d'un apprentissage constant. J'ai donc rassemblé les compétences acquises au cours de mon cursus en cinq grandes familles : « vie en entreprise », « introspection », « communication », « gestion » et « stratégie ».

IV.A) Vie en entreprise

Un laboratoire de recherche publique est une entreprise avec un budget à gérer et des comptes à rendre à l'employeur (ici l'Etat) sous forme de contrat quadriennal. Cette sensibilisation à la vie de l'entreprise m'a permis d'assimiler les notions de **respect de la hiérarchie**, **respect de la qualité du travail** (ex : des expériences onéreuses mais correctement réalisées s'avèrent souvent plus rentables que des expériences peu coûteuses mais mal exécutées) ; **respect des délais** (ex : 3 ans pour la thèse), **respect des procédures** (ex : les règles

d'hygiènes et de sécurité existent pour protéger l'expérimentateur et non pour le gêner). La recherche est avant tout un travail d'équipe qui nécessite de savoir reconnaître les qualités et les savoir-faire des autres ; j'ai donc appris à estimer les qualités de mes collaborateurs, à les respecter et à **travailler en synergie** avec eux. La fréquentation de congrès internationaux m'a sensibilisé aux **notions de compétitivité internationale, de compétition et de veille concurrentielle** qui permettent de juger de l'importance et de l'intérêt de notre travail dans le contexte international.

Je pense ainsi avoir acquis les bases élémentaires nécessaires au bon fonctionnement de l'entreprise.

IV.B) Introspection

La présentation de mes résultats devant les membres du Laboratoire ou dans les congrès, comme mon expérience de l'enseignement, m'ont appris à me remettre en question.

Grâce à la **capacité d'introspection (auto-analyse et auto-critique)**, je suis parvenu à modifier mes stratégies de recherche en fonction des critiques et à augmenter les expériences pour confirmer mes analyses. Sur le plan relationnel, cette introspection m'a aidé à rester humble vis-à-vis des stagiaires et des techniciens. Je suis devenu plus diplomate en cas de mésententes et plus pédagogue face à la non compréhension des techniques.

La démarche scientifique a consolidé mon **ouverture d'esprit**, car en science rien n'est jamais acquis avec certitude. En effet, toute situation étant relative à son contexte, j'ai appris à garder cette capacité de **réaction** et d'**adaptation** nécessaire pour faire évoluer un projet.

Enfin, j'ai appris que la plus simple des qualités nécessaires dans tous les domaines et *a fortiori* dans la recherche, est le **pragmatisme**. Comme la recherche en biologie est longue, souvent peu rentable, j'ai appris à formuler les hypothèses (ou stratégies) les plus simples et surtout les plus réalistes possibles.

IV.C) Communication

Mon expérience de l'enseignement (Travaux Dirigés des deux premières années de licence) m'a appris à être **patient**, et à faire preuve de **pédagogie**. En effet, j'ai dû adapter mon discours aux étudiants de première année afin qu'ils puissent comprendre les notions enseignées. Ma participation en tant qu'orateur aux réunions de laboratoires et dans les congrès m'a entraîné à la **prise de parole** devant des comités restreints (5 à 20 personnes) et importants (150 participants à Gien en 2005).

La formation de deux techniciens à la biologie moléculaire et la gestion partielle de leur travail a renforcé mon sens de l'écoute et de la **diplomatie**. En effet, il convient d'écouter les

problèmes techniques, administratifs et parfois extraprofessionnels pour créer une relation de confiance et de respect nécessaire au travail en équipe. Il m'a aussi fallu apprendre à présenter les problèmes de manière à ne pas bloquer le dialogue. Par exemple, en expliquant au technicien que les problèmes techniques sont parfois humains et que mon but consiste à résoudre les problèmes sans porter de jugement sur les compétences. Cette gestion quotidienne des techniciens ainsi que les débats stratégiques avec ma directrice de thèse m'ont permis de développer une certaine **force de persuasion** en améliorant la pertinence et la formulation de mes arguments. J'ai aussi pu tester **mon leadership** en travaillant en équipe avec les techniciens. En effet, même si je n'étais pas leur « supérieur hiérarchique », les deux techniciens m'ont assez vite reconnu comme étant le responsable des projets dans lesquels ils étaient impliqués.

Finalement, ayant participé à la mise en place du groupe Biologie Moléculaire du Laboratoire, j'ai pris la responsabilité des commandes de petits matériels et produits. J'ai ainsi pu développer mes compétences en matière de **prospection** (recherche des produits et/ou prestations de service) et de **négociation** (discussions commerciales avec les représentants pour obtenir des remises sur les commandes en fonction des volumes annuels).

IV.D) Gestion

La **gestion administrative, financière, humaine et technique** d'un projet furent autant de compétences acquises au cours de cette thèse et de mes expériences précédentes dans le milieu associatif. En effet, j'ai établi des **budgets prévisionnels**, des **bilans financiers**, et élaboré des **échanciers** nécessaires à la préparation de tout projet scientifique. En gérant partiellement l'emploi du temps des techniciens, j'ai appris à planifier leur travail, à gérer leurs résultats quotidiennement et à adapter le calendrier. Cependant, j'ai constamment fixé des **impératifs de temps et de qualité**, et dans la mesure de mes moyens, essayé de les faire respecter.

IV.E) Analyse et Stratégie

Le travail d'un doctorant comprend d'une part la recherche de connaissances conduisant à la formulation des hypothèses de travail et d'autre part l'analyse des résultats et la synthèse permettant d'aboutir à l'explication rationnelle des données acquises. Cette recherche de masse suivie de la synthèse nous permet de définir les hypothèses de travail. Je pense pour ma part avoir développé ces compétences **de veille scientifique et technique, d'analyse et de synthèse d'informations** permettant de valider un projet scientifique ou technique.

Mon travail de thèse n'a cessé d'évoluer au fur et à mesure de l'acquisition de nouveaux résultats. Ainsi, je revenais en arrière sur mes premières idées lorsque les résultats infirmaient

nos hypothèses ou continuais plus avant lorsque les données confirmaient nos suppositions. Ces changements et adaptations constants de mes stratégies m'ont permis d'affirmer ma **capacité d'élaboration de stratégies dynamiques**, mais aussi de développer ma **capacité décisionnelle** en décidant de la voie à suivre.

V) **-Résultats et impacts de la thèse**

D'un point de vue scientifique, ma thèse participe à l'augmentation de la connaissance sur les protéines-canal, qu'il s'agisse de TRPM8, Pannexin, Alpha1H ou d'autres. Cette création de connaissances s'inscrit bien dans la recherche réalisée au sein d'un laboratoire académique. Mon travail a d'autre part permis de mieux spécifier le rôle de TRPM8 au sein des cellules de la prostate, et aussi de commencer à en comprendre les dérégulations lors de l'oncogénèse. Ce travail pourrait à plus long terme participer à l'établissement d'une nouvelle cible thérapeutique.

Du point de vue professionnel et humain, cette thèse fut une grande expérience. J'y ai appris beaucoup, rencontré des gens de tous horizons et gagné nombre de compétences. Bien qu'ayant été « encadré », l'autonomie qui m'a été laissée m'a permis d'effectuer ma recherche comme un chercheur à part entière. Cette condition m'a ainsi permis d'élaborer moi-même mes stratégies et en partie les orientations de mes sujets. Je retire de cette opportunité que la confiance, le respect, l'autonomie et le sérieux professionnel sont des qualités essentielles au travail en équipe, *a fortiori* avec plusieurs « têtes pensantes ».

J'ai aussi eu la possibilité d'encadrer des personnels volontaires qui ont toujours travaillé dans mon sens. Je dois reconnaître que cette gestion du personnel au cœur d'un projet technique m'a parfois pesé du fait de la faiblesse de mon statut administratif, mais elle m'a aussi passionné. Je garde le sentiment que, de par mon caractère, mon respect pour le travail des autres, ma force de persuasion et mon implication professionnelle, j'ai la capacité et la volonté de diriger une petite équipe de recherche.

Pour finir, mon expérience du secteur public me laisse perplexe. Paradoxalement, les notions d'excellence, compétences et compétitivités sont réclamées par l'Etat et l'INSERM, mais malheureusement peu ou mal reconnues. Après ces trois ans de recherche passionnante, j'entrevois que la rigueur financière et l'exigence de résultats qui, dans le secteur privé, stimulent la R&D pourraient mieux répondre à mes attentes, mon caractère et mes ambitions. Je suis plus exactement intéressé par la R&D effectuée dans les sociétés de biotechnologies touchant la santé humaine.

Annexes

I) Tables des oligonucléotides et siRNA

Oligonucléotides pour la PCR :

Nom	Séquence sens 5'-3'	Séquence anti-sens 5'-3'	Taille (pb)	Numéro d'accès Genebank du gène cible
TRPM8 F1/B1	GATTTTCACCAATGACCGCCG	CCCCAGCAGCATTGATGTCG	503	AY328400
TRPM8 F2/B2	TGCTGCAGAGGATGCTGATCG	GGTGCCACCGTGTAGCCAA	380	AY328400
TRPM8 F/B pour SCRT-PCR	GATTTTCACCAATGACCGCCG	GAGGAGGGCATCATTATAGGAA	228	AY328400
sTRPM8 F3/B4	CCT GCT TGA CAA AAA CCG TC	CCA TCA CAG AGC CCC AG	820	aucun
sTRPM8 F4/B3	CTC AGG GAG GAC TTG GTG	TCC GTG TCG CAG GAC AGA CGT A	312 (β) 266 (α)	AY532376 AY532375
sTRPM8 F5/B4	CAT GCG CAA GAT CTT CAG C	CCA TCA CAG AGC CCC AG	311	AY532376 AY532375
AR F1/B1	TGTCCATCTGTGCTCTTCG	CTGGAGTTGACATTGGTGAAGG	448	NM_000044
AR F2/B2	TTGAGCCAGGTGTAGTGTGTG	CTGGAGTTGACATTGGTGAAGG	241	NM_000044
PSA F/B	CTCACCTGTCCGTGACGTGGATT	AAGCTGTGGCTGACCTGAAATA	266	NM_001648
K5 F/B	AGGAGTTGACCAGTCAACA	ACTGCTTGCACTGAAGCCAGA	219	NM_000424
K8 F/B	ACGGCTCGAAGCAACATGGA	ACTCCAGCTCTACCTTGTTC	243	BC063513
K14 F/B	TGCGAGATGGAGCAGCAGAA	TGCCATCGTGACATCCATGA	210	NM_000526
K18 F/B	TGAGTCAGAGCTGGCACAGA	TGGTGTTCATTGGTCTCAGACA	241	NM_199187
β-actine F/B	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	210	NM_001101
GAPDH F/B	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA	237	NM_002046.3

Oligonucléotides antisens et ARN interférents :

Les ARN interférents sont définis par si« dénomination », les oligonucléotides anti-sens comme AS « dénomination » et les oligonucléotides sens S « dénomination » dans la première colonne du tableau.

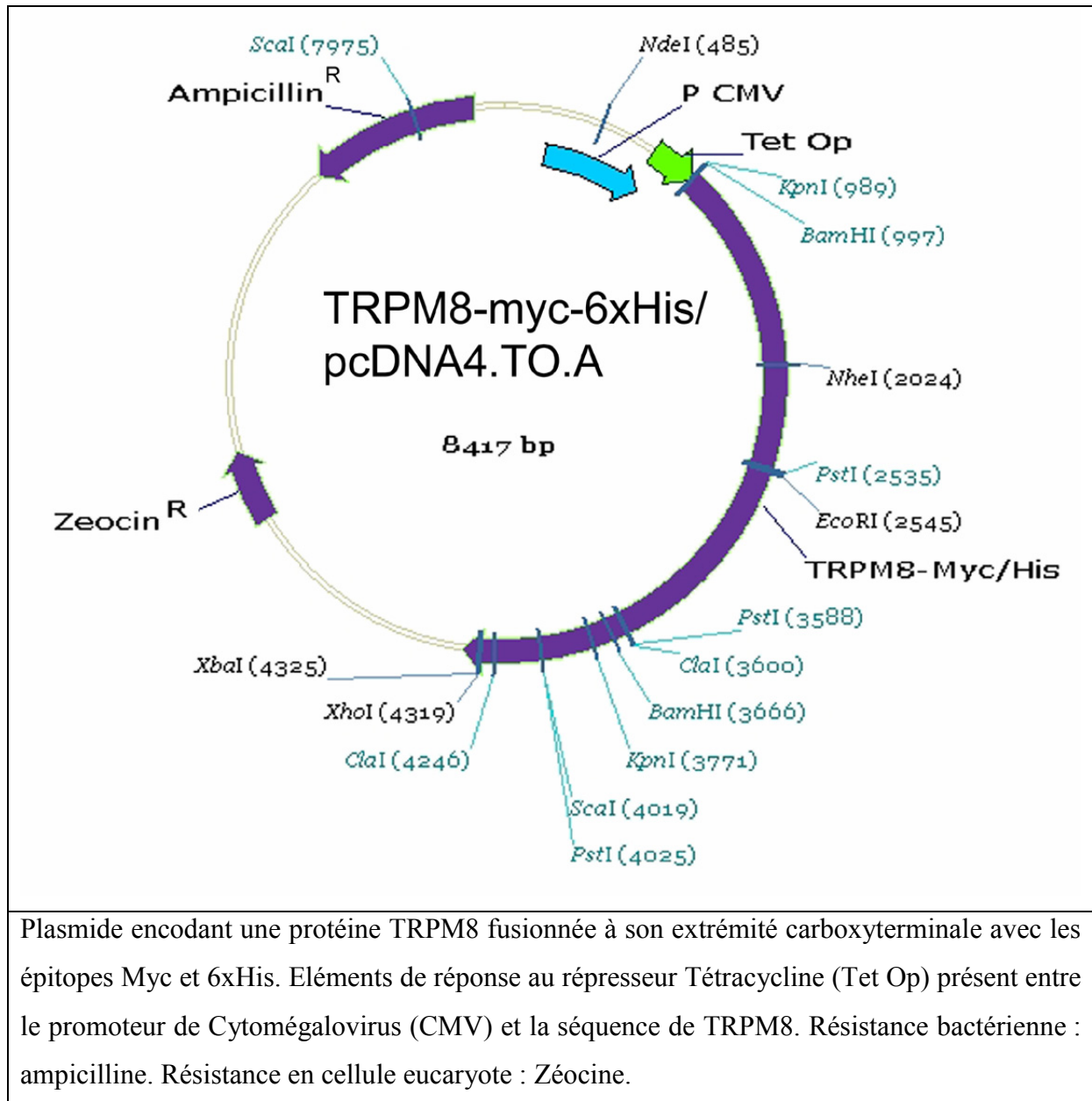
Nom	Séquence 5'-3' (sens pour ARNi)	position	Numéro d'accès Genebank du gène cible
siAR	GACUCAGCUGCCCAUCCA(dTdT)	469-487	NM_000044
siTRPM8-1	UCUCUGAGCGCACUAUUCA(dTdT)	894-912	NM_024080
siTRPM8-2	UAUUCGGUUCGGUCAUCUA(dTdT)	2736- 2754	NM_024080
AS TRPM8, mix	GGCTGCCCGAAAGGACATCT TCCCAAAGGCGTCGGTAGG CTTCCCTTTCTTCCCCAGTG	39-58 335-354 369-388	NM_024080
S TRPM8	AGATGTCCTTTCGGGCAGCC	39-58	NM_024080
AS iPLA2β	CTCCTTCACCCGGAATGGGT		NM_003560.2
S iPLA2β	ACCCATTCCGGGTGAAGGAG		NM_003560.2

II) Séquences clonées et déposées dans Genbank.

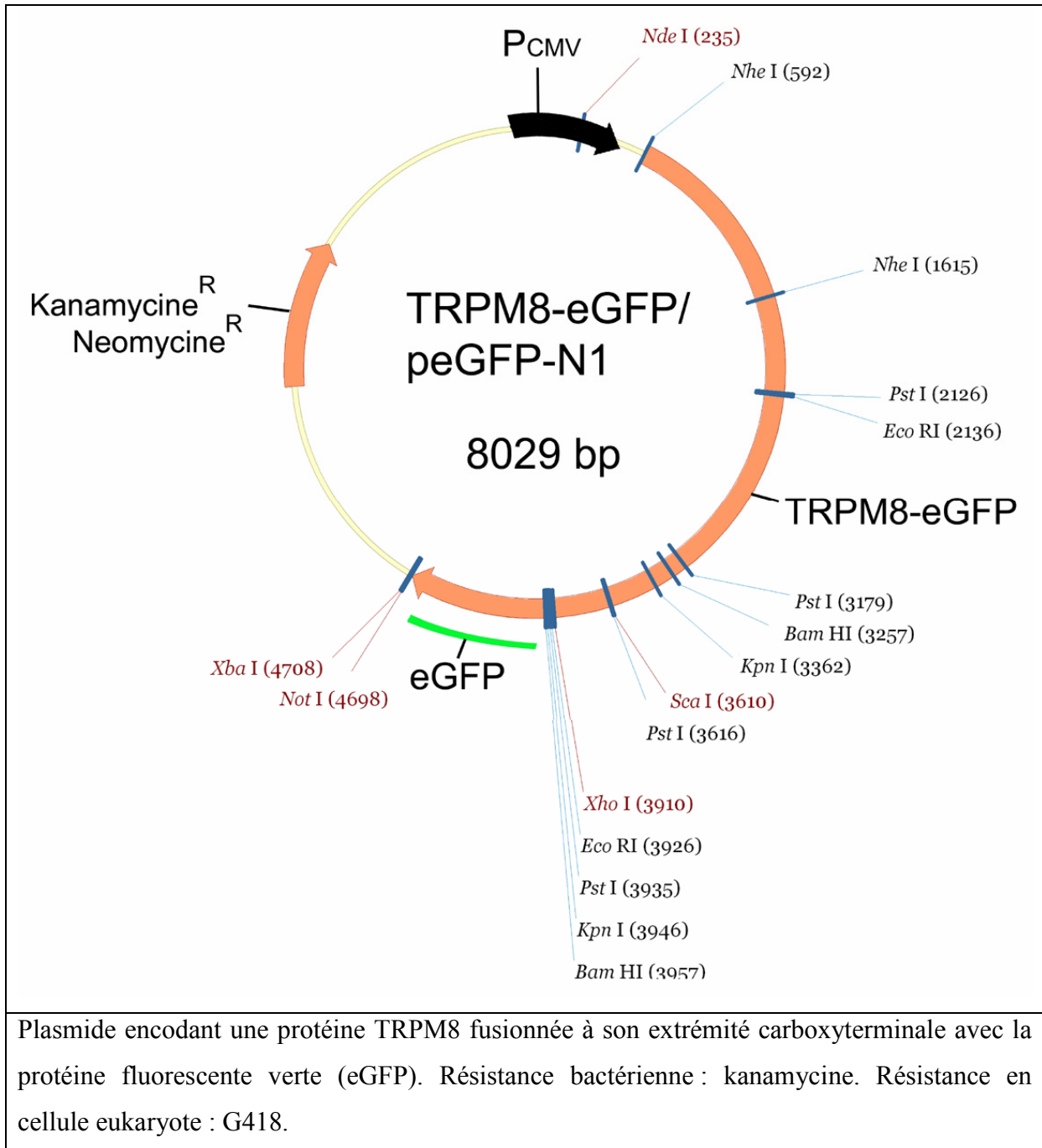
référence	ARN
AY328400 (Prostate tissue)	TRPM8
DQ139309 (LNCaP)	TRPM8
AY532375	sTRPM8α
AY532376	sTRPM8β

III) Carte des vecteurs

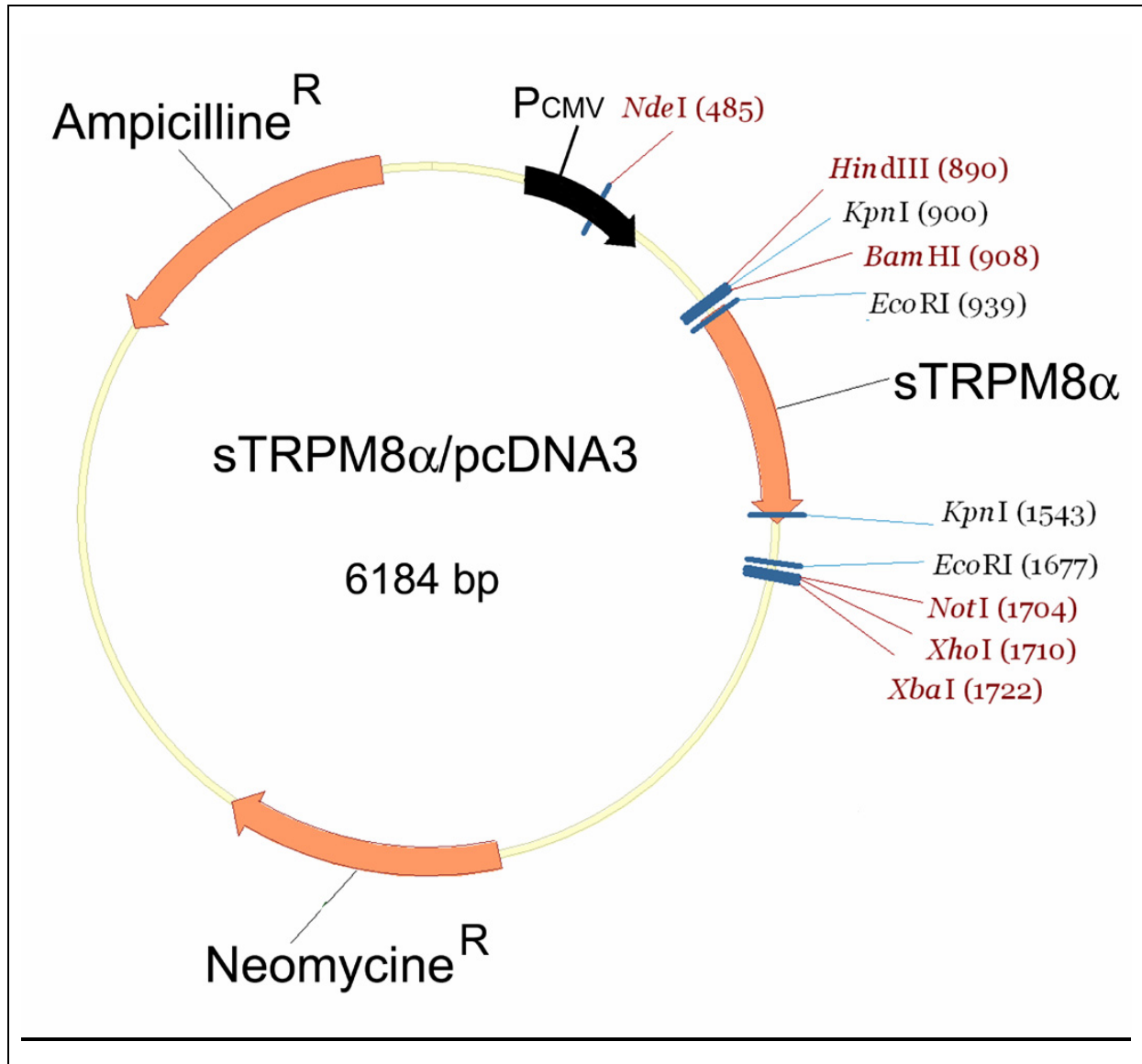
TRPM8-myc-6xHis/pcDNA4.TO.A



TRPM8-eGFP/peGFP-N1

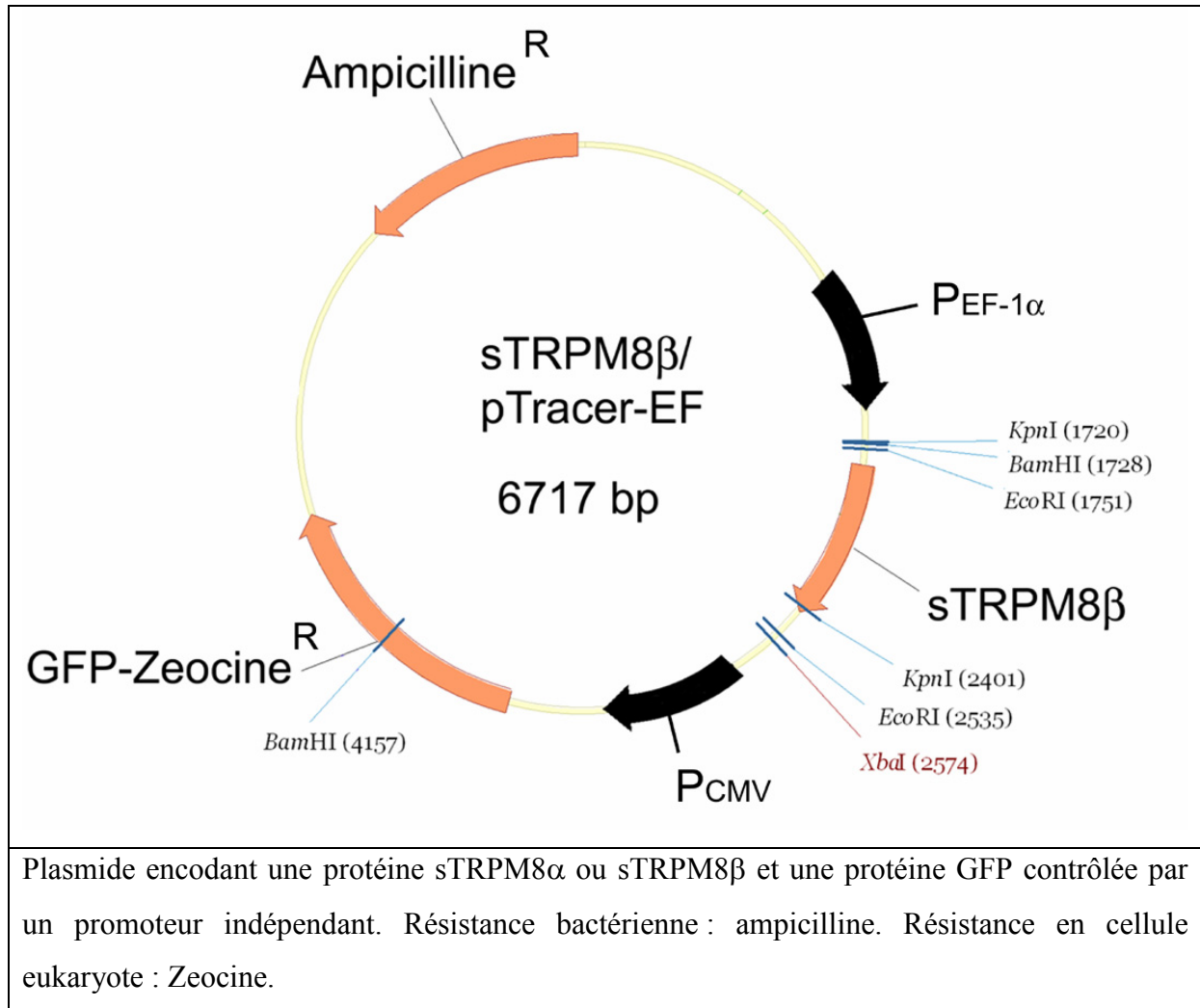


sTRPM8 α /pcDNA3 et sTRPM8 β /pcDNA3

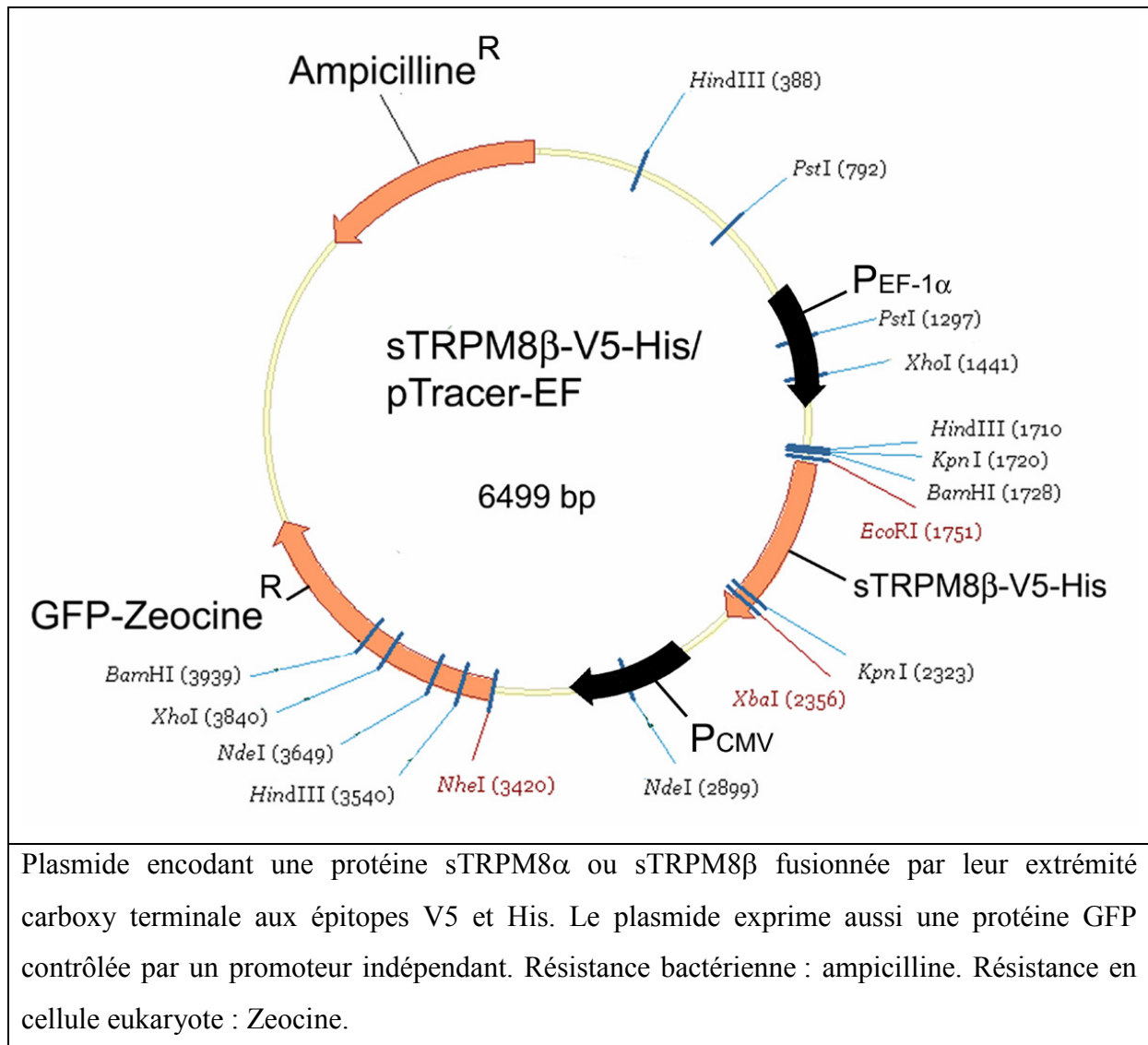


Plasmide encodant une protéine sTRPM8 α ou sTRPM8 β . Résistance bactérienne : ampicilline. Résistance en cellule eukaryote : G418.

sTRPM8 β /pTracer-EF et sTRPM8 α /pTracer-EF

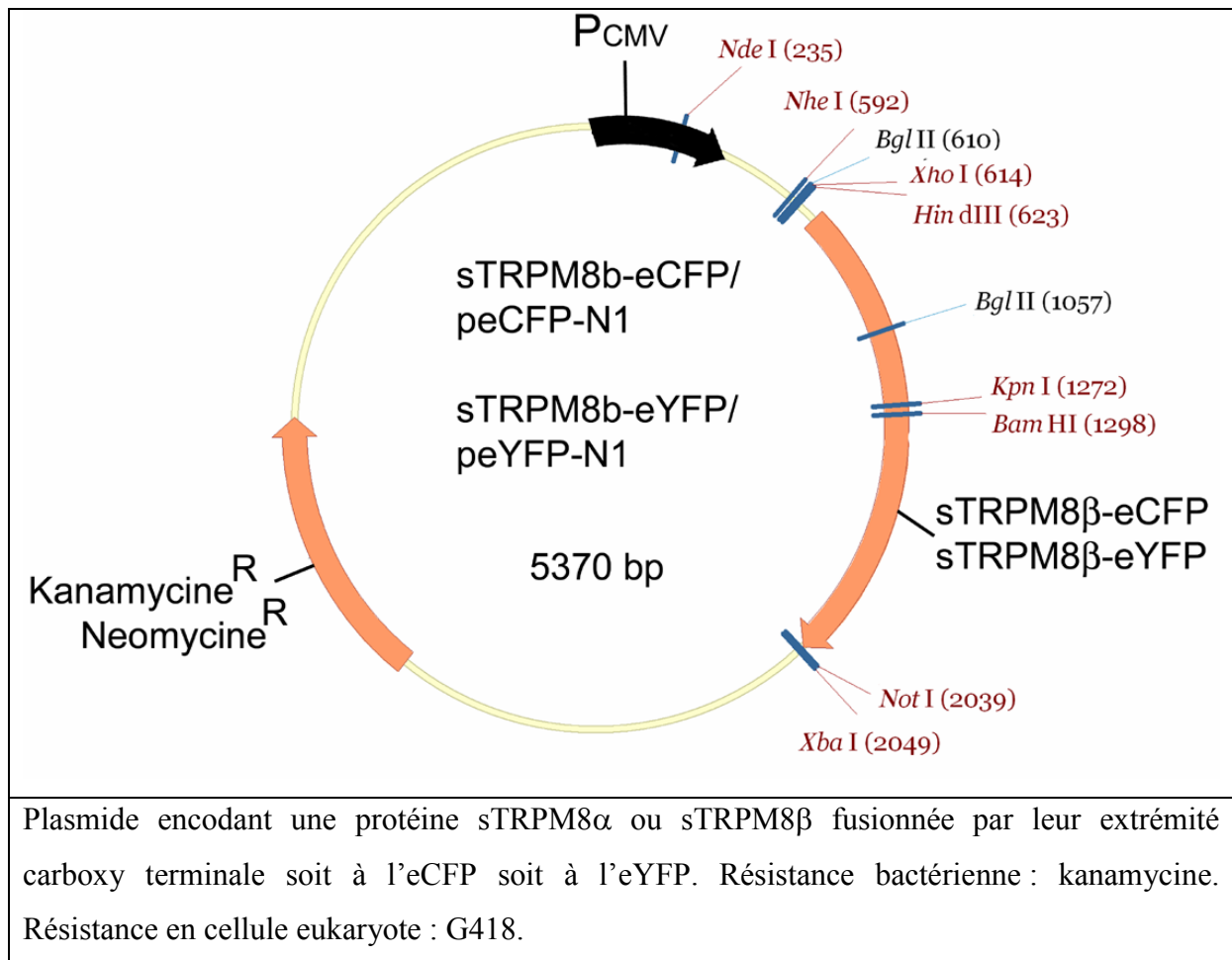


sTRPM8 β -V5-His/pTracer-EF et sTRPM8 α -V5-His /pTracer-EF

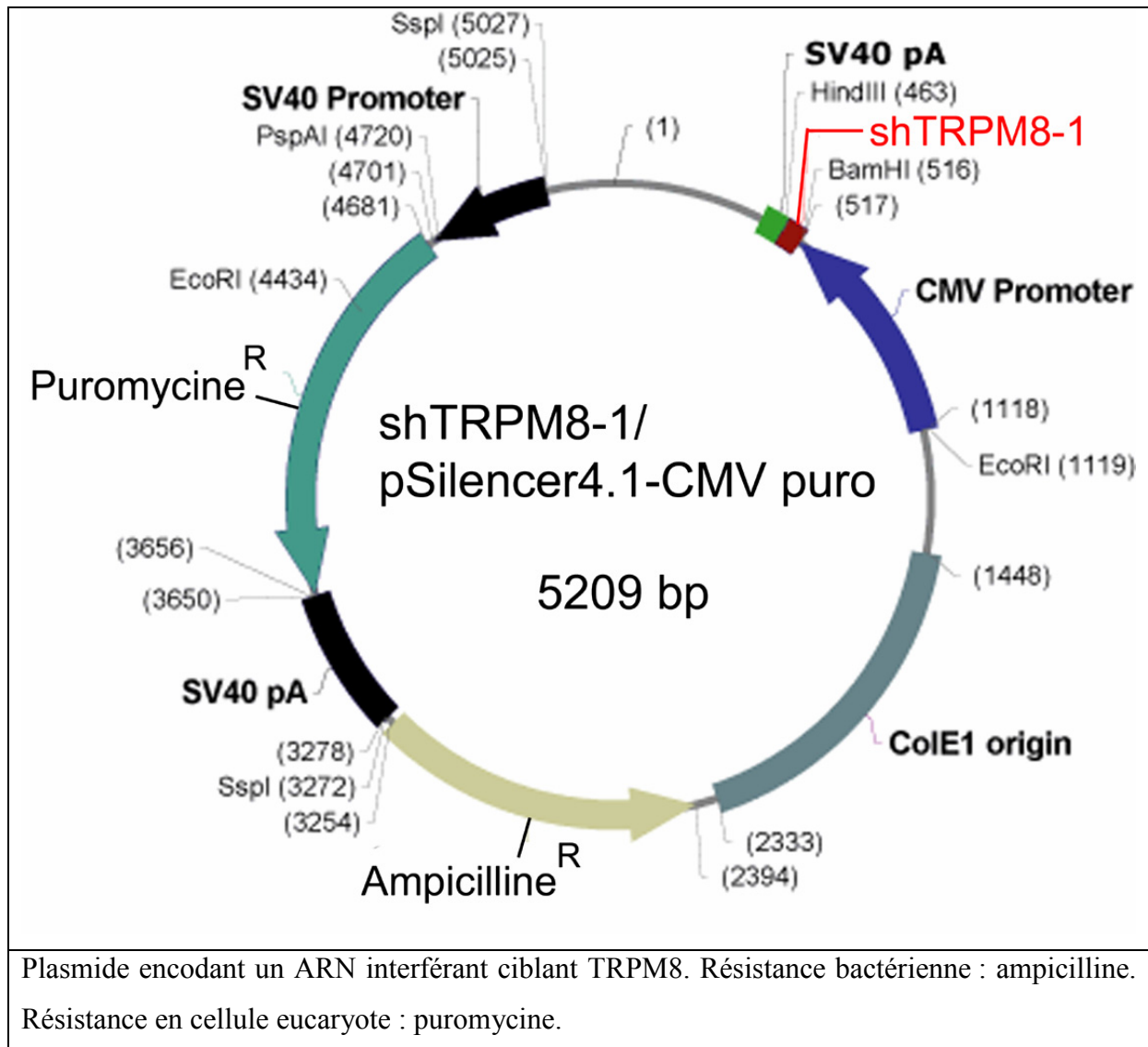


Plasmide encodant une protéine sTRPM8 α ou sTRPM8 β fusionnée par leur extrémité carboxy terminale aux épitopes V5 et His. Le plasmide exprime aussi une protéine GFP contrôlée par un promoteur indépendant. Résistance bactérienne : ampicilline. Résistance en cellule eukaryote : Zeocine.

sTRPM8 β -eCFP/peCFP-N1, sTRPM8 α -eCFP/peCFP-N1, sTRPM8 β -eYFP/peYFP-N1 et sTRPM8 α -eYFP/peYFP-N1



shTRPM8-1/pSilencer4.1-CMV puro et shTRPM8-2/pSilencer4.1-CMV puro



Plasmide encodant un ARN interférant ciblant TRPM8. Résistance bactérienne : ampicilline.
Résistance en cellule eucaryote : puromycine.

IV) Composition des solutions

Milieu de culture pour les bactéries.

Milieu « TB » :

- Tryptone (pancreatic digest of casein): 12 g/L
- Yeast extract: 24 g/L
- Glycérol: 0,4 %
- K_2HPO_4 : 12,54 g/L
- KH_2PO_4 : 2.31 g/L

Milieu « LB »:

- Tryptone: 10 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 10 g/L

Agar:

- Tryptone: 10 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 5 g/L
- Agar: 15 g/L

S.O.C. medium

- Tryptone: 20 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 0,5 g/L
- KCl: 0,18 g/L
- $MgCl_2$: 0,95 g/L
- Glucose: 20 mM

Solutions pour bactéries compétentes.

Solution 1:

- 30 mM Acétate de Potassium (CH_3COOK)
- 100 mM Chlorure de Rubidium ($RbCl_2$)
- 10 mM de Chlorure de Calcium ($CaCl_2$)
- 50 mM de Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$)
- 15% Glycérol

- Régler le pH à 5,8 avec de l'acide acétique avant l'ajout de glycérol.
- Filtrer la solution finale sous PSM avec des filtres de 0,22 µm.

Solution 2:

- 10 mM MOPS
- 75 mM de Chlorure de Calcium (CaCl₂)
- 10 mM de Chlorure de Rubidium (RbCl₂)
- 15% Glycérol
- Régler le pH à 6,5 avant l'ajout de glycérol.
- Filtrer la solution finale sous PSM avec des filtres de 0,22 µm.

Solutions pour extraction d'ARN

Solution D

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

Acétate de sodium (3M) :

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

Solution de Phénol/Chloroform/AIA :

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

Solutions pour extraction de protéines

Tampon RIPA:

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

Tampon pour extraction de microsomes:

- HEPES, pH 7,0: 10 mM
- KCl: 10 mM
- EGTA: 0,05 mM
- DTT : 0,05 mM

Solution de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) :

- SDS : 1 %
- NaOH : 0,2 M

Solutions pour immunofluorescence

Solution de PBS:

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

Para Formaldéhyde (PFA) :

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

Solution de saturation pour immunofluorescence:

- PBS
- Gélatine de poisson : 1,2 %
- Glycine : 0,2 M
- Tween 20 : 0,05 %

Solutions pour électrophorèse

Tampon TBE:

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

Tampon TAE:

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

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

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

Solution de transfert :

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

Tampons de charge et marqueurs de poids moléculaire

Tampon de charge pour protéine (Tampon de Laemelli) :

- Tris pH 6,8 : 62,5 mM
- SDS : 2 %
- Saccharose : 10 %
- Bleu de Bromophénol : 0,001 %
- DTT : 100 mM

Marqueur de poids moléculaire pour ADN/ARN :

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

Autres solutions

Tampon TE (Tris-EDTA):

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

Bleu de Coomassie:

- Bleu de Coomassie R250 : 0,02%
- Isopropanol : 25%
- Acide acétique : 10%

HBSS

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

Bibliographie

Publications scientifiques:

- Abe, J., Hosokawa, H., Okazawa, M., Kandachi, M., Sawada, Y., Yamanaka, K., Matsumura, K. and Kobayashi, S. (2005) TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Brain Res Mol Brain Res*, **136**, 91-98.
- Aggarwal, S.K. and MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, **16**, 1169-1177.
- Altzauer, F., Conus, S., Cavalli, A., Folkers, G. and Simon, H.U. (2004) Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 5947-5957.
- Amirghofran, Z., Monabati, A. and Gholijani, N. (2004) Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer. *Pathol Oncol Res*, **10**, 37-41.
- Amiri, H., Schultz, G. and Schaefer, M. (2003) FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium*, **33**, 463-470.
- Ammon, J., Karstens, J.H. and Rathert, P. (1977) [TNM-system orientated radiological therapy in prostatic carcinoma (author's transl)]. *Urologe A*, **16**, 73-82.
- Arniges, M., Fernandez-Fernandez, J.M., Albrecht, N., Schaefer, M. and Valverde, M.A. (2006) Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem*, **281**, 1580-1586.
- Balsinde, J., Balboa, M.A. and Dennis, E.A. (1997) Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem*, **272**, 29317-29321.
- Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K. and Dennis, E.A. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8527-8531.
- Bandell, M., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Orth, A., Mathur, J., Hwang, S.W. and Patapoutian, A. (2006) High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci*, **9**, 493-500.
- Bang, Y.J., Pirnia, F., Fang, W.G., Kang, W.K., Sartor, O., Whitesell, L., Ha, M.J., Tsokos, M., Sheahan, M.D., Nguyen, P. and et al. (1994) Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5330-5334.
- Benham, C.D., Gunthorpe, M.J. and Davis, J.B. (2003) TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium*, **33**, 479-487.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., Mossmann, H. and Wunderlich, F. (1999a) Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *Faseb J*, **13**, 123-133.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z. and Wunderlich, F. (1999b) Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell*, **10**, 3113-3123.
- Berger, R., Febbo, P.G., Majumder, P.K., Zhao, J.J., Mukherjee, S., Signoretti, S., Campbell, K.T., Sellers, W.R., Roberts, T.M., Loda, M., Golub, T.R. and Hahn, W.C. (2004) Androgen-induced differentiation and tumorigenicity of human prostate epithelial cells. *Cancer Res*, **64**, 8867-8875.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Lipp, P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature*, Vol. 395, pp. 645-648.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.

- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000a) Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science*, **287**, 1604-1605.
- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000b) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.
- Berry, N. and Nishizuka, Y. (1990) Protein kinase C and T cell activation. *Eur J Biochem*, **189**, 205-214.
- Bertani, G. (2004) Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol*, **186**, 595-600.
- Bezzerrides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A. and Clapham, D.E. (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol*, **6**, 709-720.
- Bidaux, G., Roudbaraki, M., Merle, C., Crepin, A., Delcourt, P., Slomianny, C., Thebault, S., Bonnal, J.L., Benahmed, M., Cabon, F., Mauroy, B. and Prevarskaya, N. (2005) Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer*, **12**, 367-382.
- Birnbaumer, L., Yildirim, E., Abramowitz, J. and Yidirim, E. (2003) A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium*, **33**, 419-432.
- Blomme, E.A., Sugimoto, Y., McCauley, L.K., Lin, Y.C., Capen, C.C. and Rosol, T.J. (1998) Stromal and epithelial cells of the canine prostate express parathyroid hormone-related protein, but not the PTH/PTHrP receptor. *Prostate*, **36**, 110-120.
- Bonaccorsi, L., Carloni, V., Muratori, M., Formigli, L., Zecchi, S., Forti, G. and Baldi, E. (2004) EGF receptor (EGFR) signaling promoting invasion is disrupted in androgen-sensitive prostate cancer cells by an interaction between EGFR and androgen receptor (AR). *Int J Cancer*, **112**, 78-86.
- Bonaccorsi, L., Marchiani, S., Ferruzzi, P., Muratori, M., Crescioli, C., Forti, G., Maggi, M. and Baldi, E. (2006) Non-genomic effects of the androgen receptor and Vitamin D agonist are involved in suppressing invasive phenotype of prostate cancer cells. *Steroids*, **71**, 304-309.
- Brauchi, S., Orio, P. and Latorre, R. (2004) Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15494-15499.
- Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E. and Latorre, R. (2006) A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci*, **26**, 4835-4840.
- Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C. and Shore, G.C. (2003) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol*, **160**, 1115-1127.
- Cai, Y., Maeda, Y., Cedzich, A., Torres, V.E., Wu, G., Hayashi, T., Mochizuki, T., Park, J.H., Witzgall, R. and Somlo, S. (1999) Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem*, **274**, 28557-28565.
- 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 J*, **21**, 909-919.
- Carpentier, M., Guillemette, C., Bailey, J.L., Boileau, G., Jeannotte, L., DesGroseillers, L. and Charron, J. (2004) Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. *Mol Cell Biol*, **24**, 4428-4437.
- Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J. and Julius, D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**, 436-441.
- Chaudhary, K.S., Abel, P.D. and Lalani, E.N. (1999) Role of the Bcl-2 gene family in prostate cancer progression and its implications for therapeutic intervention. *Environ Health Perspect*, **107 Suppl 1**, 49-57.

- Chia, S.E., Ong, C.N., Chua, L.H., Ho, L.M. and Tay, S.K. (2000) Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl*, **21**, 53-57.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Chu, X., Tong, Q., Wozney, J., Zhang, W., Cheung, J.Y., Conrad, K., Mazack, V., Stahl, R., Barber, D.L. and Miller, B.A. (2005) Identification of an N-terminal TRPC2 splice variant which inhibits calcium influx. *Cell Calcium*, **37**, 173-182.
- Chuang, H.H., Neuhauser, W.M. and Julius, D. (2004) The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron*, **43**, 859-869.
- Chubanov, V., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M.C., Seyberth, H.W., Konrad, M. and Gudermann, T. (2004) Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2894-2899.
- Cifuentes, E., Mataraza, J.M., Yoshida, B.A., Menon, M., Sacks, D.B., Barrack, E.R. and Reddy, G.P. (2004) Physical and functional interaction of androgen receptor with calmodulin in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 464-469.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W. and Strubing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 387-396.
- Clapham, D.E. and Sneyd, J. (1995) Intracellular calcium waves. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **30**, 1-24.
- Cochran, B.H. (1993) Regulation of immediate early gene expression. *NIDA Res Monogr*, **125**, 3-24.
- Colbert, H.A., Smith, T.L. and Bargmann, C.I. (1997) OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, **17**, 8259-8269.
- Colombel, M., Gil Diez, S., Radvanyi, F., Buttyan, R., Thiery, J.P. and Chopin, D. (1996) Apoptosis in prostate cancer. Molecular basis to study hormone refractory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, **784**, 63-69.
- Cortright, D.N., Crandall, M., Sanchez, J.F., Zou, T., Krause, J.E. and White, G. (2001) The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 1183-1189.
- Costello, L.C. and Franklin, R.B. (1998) Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer. *Prostate*, **35**, 285-296.
- Crabtree, G.R. (2001) Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem*, **276**, 2313-2316.
- Culig, Z. (2003) Role of the androgen receptor axis in prostate cancer. *Urology*, **62**, 21-26.
- de la Pena, E., Malkia, A., Cabedo, H., Belmonte, C. and Viana, F. (2005) The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *J Physiol*, **567**, 415-426.
- Delany, N.S., Hurlle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, I., See, C.G., Costigan, M., Anand, P., Woolf, C.J., Crowther, D., Sanseau, P. and Tate, S.N. (2001) Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics*, **4**, 165-174.
- Deltas, C.C. (2001) Mutations of the human polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Hum Mutat*, **18**, 13-24.
- den Dekker, E., Hoenderop, J.G., Nilius, B. and Bindels, R.J. (2003) The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, **33**, 497-507.
- Dhaka, A., Viswanath, V. and Patapoutian, A. (2006) Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 135-161.

- Dolmetsch, R.E., Xu, K. and Lewis, R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, **392**, 933-936.
- Dorovkov, M.V. and Ryazanov, A.G. (2004) Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J Biol Chem*, **279**, 50643-50646.
- Dragoni, I., Guida, E. and McIntyre, P. (2006) The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functionally important double cysteine motif. *J Biol Chem*.
- Duncan, L.M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L.M., Woolf, E.A., Tepper, R.I. and Shyjan, A.W. (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*, **58**, 1515-1520.
- Echevarria, W., Leite, M.F., Guerra, M.T., Zipfel, W.R. and Nathanson, M.H. (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*, **5**, 440-446.
- Elzanaty, S., Richthoff, J., Malm, J. and Giwercman, A. (2002) The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod*, **17**, 2904-2911.
- Estrada, M., Uhlen, P. and Ehrlich, B.E. (2006) Ca²⁺ oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. *J Cell Sci*, **119**, 733-743.
- Evenson, D.P., Emerick, R.J., Jost, L.K., Kayongo-Male, H. and Stewart, S.R. (1993) Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. *J Anim Sci*, **71**, 955-962.
- Fall, M., Lindstrom, S. and Mazieres, L. (1990) A bladder-to-bladder cooling reflex in the cat. *J Physiol*, **427**, 281-300.
- Fang, D. and Setaluri, V. (2000) Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 53-61.
- Faustino, N.A. and Cooper, T.A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, **17**, 419-437.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M. and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, **441**, 179-185.
- Finger, T.E., Bottger, B., Hansen, A., Anderson, K.T., Alimohammadi, H. and Silver, W.L. (2003) Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8981-8986.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V. and Bonkhoff, H. (2003) Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*, **22**, 7858-7861.
- Foley, R., Hollywood, D. and Lawler, M. (2004) Molecular pathology of prostate cancer: the key to identifying new biomarkers of disease. *Endocr Relat Cancer*, **11**, 477-488.
- Fong, C.J., Sherwood, E.R., Braun, E.J., Berg, L.A., Lee, C. and Kozlowski, J.M. (1992) Regulation of prostatic carcinoma cell proliferation and secretory activity by extracellular matrix and stromal secretions. *Prostate*, **21**, 121-131.
- Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V. and Nilius, B. (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol*, **3**, 121-127.
- Freschi, M., Colombo, R., Naspro, R. and Rigatti, P. (2004) Primary and pure neuroendocrine tumor of the prostate. *Eur Urol*, **45**, 166-169; discussion 169-170.
- Fuessel, S., Sickert, D., Meye, A., Klenk, U., Schmidt, U., Schmitz, M., Rost, A.K., Weigle, B., Kiessling, A. and Wirth, M.P. (2003) Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int J Oncol*, **23**, 221-228.

- Gackiere, F., Bidaux, G., Lory, P., Prevarskaya, N. and Mariot, P. (2006) A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium*, **39**, 357-366.
- Garabedian, E.M., Humphrey, P.A. and Gordon, J.I. (1998) A transgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15382-15387.
- Giancippoli, A., Novara, M., de Luca, A., Baldelli, P., Marcantoni, A., Carbone, E. and Carabelli, V. (2006) Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J*, **90**, 1830-1841.
- Gleason, D.F. and Mellinger, G.T. (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*, **111**, 58-64.
- Gonzalez-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A.E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P.C., Reisin, I.L., Arnaout, M.A. and Cantiello, H.F. (2001) Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1182-1187.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- Gu, Z., Thomas, G., Yamashiro, J., Shintaku, I.P., Dorey, F., Raitano, A., Witte, O.N., Said, J.W., Loda, M. and Reiter, R.E. (2000) Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*, **19**, 1288-1296.
- Habel, L.A., Shak, S., Jacobs, M.K., Capra, A., Alexander, C., Pho, M., Baker, J., Walker, M., Watson, D., Hackett, J., Blick, N.T., Greenberg, D., Fehrenbacher, L., Langholz, B. and Quesenberry, C.P. (2006) A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*, **8**, R25.
- Hajnoczky, G., Csordas, G., Madesh, M. and Pacher, P. (2000) Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium*, **28**, 349-363.
- Hall, J., Jones, R.D., Jones, T.H., Channer, K.S. and Peers, C. (2006) Selective inhibition of L-type Ca²⁺ channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology*, **147**, 2675-2680.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K. and Mori, Y. (2002) LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, **9**, 163-173.
- Harteneck, C., Plant, T.D. and Schultz, G. (2000) From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci*, **23**, 159-166. 154_00001532_00001534_00001532.
- Heer, R., Collins, A.T., Robson, C.N., Shenton, B.K. and Leung, H.Y. (2006) KGF suppresses alpha2beta1 integrin function and promotes differentiation of the transient amplifying population in human prostatic epithelium. *J Cell Sci*, **119**, 1416-1424.
- Hendriksen, P.J., Dits, N.F., Kokame, K., Veldhoven, A., van Weerden, W.M., Bangma, C.H., Trapman, J. and Jenster, G. (2006) Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res*, **66**, 5012-5020.
- Henshall, S.M., Afar, D.E., Hiller, J., Horvath, L.G., Quinn, D.I., Rasiah, K.K., Gish, K., Willhite, D., Kench, J.G., Gardiner-Garden, M., Stricker, P.D., Scher, H.I., Grygiel, J.J., Agus, D.B., Mack, D.H. and Sutherland, R.L. (2003) Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res*, **63**, 4196-4203.
- Hoenderop, J.G. and Bindels, R.J. (2005) Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol*, **16**, 15-26.

- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G. and Gudermann, T. (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med*, **78**, 14-25.
- Hoth, M., Button, D.C. and Lewis, R.S. (2000) Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10607-10612.
- Hu, J., Milenkovic, N. and Lewin, G.R. (2006) The high threshold mechanotransducer: a status report. *Pain*, **120**, 3-7.
- Humez, S., Legrand, G., Vanden-Abeelee, F., Monet, M., Marchetti, P., Lepage, G., Crepin, A., Dewailly, E., Wuytack, F. and Prevarskaya, N. (2004) Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNFalpha. *J Cell Physiol*, **201**, 201-213.
- Inoue, R., Jensen, L.J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A. and Ito, Y. (2006) Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ Res*, **99**, 119-131.
- Isaacs, J.T. (1999) The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol Clin North Am*, **26**, 263-273.
- Jones, R.D., English, K.M., Jones, T.H. and Channer, K.S. (2004) Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clin Sci (Lond)*, **107**, 149-158.
- Karayi, M.K. and Markham, A.F. (2004) Molecular biology of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, **7**, 6-20.
- Karli, U.O., Schafer, T. and Burger, M.M. (1990) Fusion of neurotransmitter vesicles with target membrane is calcium independent in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5912-5915.
- Karlsson, E. (2001) The role of pancreatic chromogranins in islet physiology. *Curr Mol Med*, **1**, 727-732.
- Kaushal, V., Kohli, M., Dennis, R.A., Siegel, E.R., Chiles, W.W. and Mukunyadzi, P. (2006) Thrombin receptor expression is upregulated in prostate cancer. *Prostate*, **66**, 273-282.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J. and Blumberg, P.M. (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*, **276**, 28613-28619.
- Kiessling, A., Fussel, S., Schmitz, M., Stevanovic, S., Meye, A., Weigle, B., Klenk, U., Wirth, M.P. and Rieber, E.P. (2003) Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8. *Prostate*, **56**, 270-279.
- Kimura, K., Wakamatsu, A., Suzuki, Y., Ota, T., Nishikawa, T., Yamashita, R., Yamamoto, J., Sekine, M., Tsuritani, K., Wakaguri, H., Ishii, S., Sugiyama, T., Saito, K., Isono, Y., Irie, R., Kushida, N., Yoneyama, T., Otsuka, R., Kanda, K., Yokoi, T., Kondo, H., Wagatsuma, M., Murakawa, K., Ishida, S., Ishibashi, T., Takahashi-Fujii, A., Tanase, T., Nagai, K., Kikuchi, H., Nakai, K., Isogai, T. and Sugano, S. (2006) Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res*, **16**, 55-65.
- Kinsey, G.R., Cummings, B.S., Beckett, C.S., Saavedra, G., Zhang, W., McHowat, J. and Schnellmann, R.G. (2005) Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**, 287-293.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A. and Noguchi, K. (2005) Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol*, **493**, 596-606.
- Korge, P. and Weiss, J.N. (1999) Thapsigargin directly induces the mitochondrial permeability transition. *Eur J Biochem*, **265**, 273-280.
- Kraft, R. and Harteneck, C. (2005) The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch*, **451**, 204-211.

- Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Bubendorf, L., Kallioniemi, O.P., Shabaik, A., Vitiello, A., Peehl, D., Gao, G.J. and Reed, J.C. (2003) Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 4914-4925.
- Krawczak, M., Reiss, J. and Cooper, D.N. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, **90**, 41-54.
- Kriz, W. (2005) TRPC6 - a new podocyte gene involved in focal segmental glomerulosclerosis. *Trends Mol Med*, **11**, 527-530.
- Kudo, I. and Murakami, M. (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 3-58.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.S., Woolf, C.J. and Corey, D.P. (2006) TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, **50**, 277-289.
- Lambers, T.T., Mahieu, F., Oancea, E., Hoofd, L., de Lange, F., Mensenkamp, A.R., Voets, T., Nilius, B., Clapham, D.E., Hoenderop, J.G. and Bindels, R.J. (2006) Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca²⁺ transport. *Embo J*, **25**, 2978-2988.
- Legrand, G., Humez, S., Slomianny, C., Dewailly, E., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Wuytack, F. and Prevarskaya, N. (2001) Ca²⁺ pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca²⁺-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem*, **276**, 47608-47614.
- Leite, M.F., Thrower, E.C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A.M., Ehrlich, B.E. and Nathanson, M.H. (2003) Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2975-2980.
- Lesage, F., Maingret, F. and Lazdunski, M. (2000a) Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett*, **471**, 137-140.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G. and Lazdunski, M. (2000b) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **275**, 28398-28405.
- Lewis, R.S. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **19**, 497-521.
- Lewis, R.S. (2003) Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans*, **31**, 925-929.
- Li, S., Westwick, J. and Poll, C. (2003) Transient receptor potential (TRP) channels as potential drug targets in respiratory disease. *Cell Calcium*, **33**, 551-558.
- Liang, H., DeMaria, C.D., Erickson, M.G., Mori, M.X., Alseikhan, B.A. and Yue, D.T. (2003) Unified mechanisms of Ca²⁺ regulation across the Ca²⁺ channel family. *Neuron*, **39**, 951-960.
- Liao, Y., Abel, U., Grobholz, R., Hermani, A., Trojan, L., Angel, P. and Mayer, D. (2005) Up-regulation of insulin-like growth factor axis components in human primary prostate cancer correlates with tumor grade. *Hum Pathol*, **36**, 1186-1196.
- Lieberherr, M. and Grosse, B. (1994) Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem*, **269**, 7217-7223.
- Liedtke, W. (2005) TRPV4 plays an evolutionary conserved role in the transduction of osmotic and mechanical stimuli in live animals. *J Physiol*, **567**, 53-58.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., Sali, A., Hudspeth, A.J., Friedman, J.M. and Heller, S. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, **103**, 525-535.

- Liedtke, W. and Friedman, J.M. (2003) Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13698-13703.
- Liedtke, W., Tobin, D.M., Bargmann, C.I. and Friedman, J.M. (2003) Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100 Suppl 2**, 14531-14536.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr. and Meyer, T. (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, **15**, 1235-1241.
- Liu, B. and Qin, F. (2005) Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci*, **25**, 1674-1681.
- Liu, D. and Liman, E.R. (2003) Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15160-15165.
- Liu, H.X., Cartegni, L., Zhang, M.Q. and Krainer, A.R. (2001) A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet*, **27**, 55-58.
- Liu, W., Qian, C. and Francke, U. (1997) Silent mutation induces exon skipping of fibrillin-1 gene in Marfan syndrome. *Nat Genet*, **16**, 328-329.
- Long, S.B., Campbell, E.B. and Mackinnon, R. (2005a) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*, **309**, 897-903.
- Long, S.B., Campbell, E.B. and Mackinnon, R. (2005b) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*, **309**, 903-908.
- Luo, Y., Vassilev, P.M., Li, X., Kawanabe, Y. and Zhou, J. (2003) Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol*, **23**, 2600-2607.
- Ma, Z., Ramanadham, S., Wohltmann, M., Bohrer, A., Hsu, F.F. and Turk, J. (2001) Studies of insulin secretory responses and of arachidonic acid incorporation into phospholipids of stably transfected insulinoma cells that overexpress group VIA phospholipase A₂ (iPLA₂β) indicate a signaling rather than a housekeeping role for iPLA₂β. *J Biol Chem*, **276**, 13198-13208.
- Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M. and Honore, E. (1999a) TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem*, **274**, 1381-1387.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M. and Honore, E. (1999b) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem*, **274**, 26691-26696.
- Malm, J., Hellman, J., Hogg, P. and Lilja, H. (2000) Enzymatic action of prostate-specific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn²⁺, a tight-binding inhibitor. *Prostate*, **45**, 132-139.
- Mancuso, D.J., Jenkins, C.M. and Gross, R.W. (2000) The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *J Biol Chem*, **275**, 9937-9945.
- Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., Sims, H.F., Cohen, J.M., Yang, J. and Gross, R.W. (2004) Complex transcriptional and translational regulation of iPLA₂γ resulting in multiple gene products containing dual competing sites for mitochondrial or peroxisomal localization. *Eur J Biochem*, **271**, 4709-4724.
- Mansvelder, H.D. and Kits, K.S. (2000) All classes of calcium channel couple with equal efficiency to exocytosis in rat melanotropes, inducing linear stimulus-secretion coupling. *J Physiol*, **526 Pt 2**, 327-339.
- Marcelli, M., Haidacher, S.J., Plymate, S.R. and Birnbaum, R.S. (1995) Altered growth and insulin-like growth factor-binding protein-3 production in PC3 prostate carcinoma cells stably transfected with a constitutively active androgen receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*, **136**, 1040-1048.

- Marengo, S.R. and Chung, L.W. (1994) An orthotopic model for the study of growth factors in the ventral prostate of the rat: effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor. *J Androl*, **15**, 277-286.
- Mariot, P., Prevarskaya, N., Roudbaraki, M.M., Le Bourhis, X., Van Coppenolle, F., Vanoverberghe, K. and Skryma, R. (2000) Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate*, **43**, 205-214.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M.F. and Prevarskaya, N. (2002) Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **277**, 10824-10833.
- Matsuura, T., Hoshida, R., Komaki, S., Kiwaki, K., Endo, F., Nakamura, S., Jitoshio, T. and Matsuda, I. (1995) Identification of two new aberrant splicings in the ornithine carbamoyltransferase (OCT) gene in two patients with early and late onset OCT deficiency. *J Inherit Metab Dis*, **18**, 273-282.
- McConkey, D.J. and Orrenius, S. (1997) The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **239**, 357-366.
- McKemy, D.D., Neuhausser, W.M. and Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **416**, 52-58.
- Mestayer, C., Blanchere, M., Jaubert, F., Dufour, B. and Mowszowicz, I. (2003) Expression of androgen receptor coactivators in normal and cancer prostate tissues and cultured cell lines. *Prostate*, **56**, 192-200.
- Michels, G., Er, F., Eicks, M., Herzig, S. and Hoppe, U.C. (2006) Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*.
- Minke, B. (1977) Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech*, **3**, 59-64.
- Montano, X. and Djamgoz, M.B. (2004) Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. *FEBS Lett*, **571**, 1-8.
- Monteilh-Zoller, M.K., Hermosura, M.C., Nadler, M.J., Scharenberg, A.M., Penner, R. and Fleig, A. (2003) TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol*, **121**, 49-60.
- Montell, C. (1997) New light on TRP and TRPL. *Mol Pharmacol*, **52**, 755-763.
- Montell, C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, **2001**, RE1.
- Montell, C. (2003) Thermosensation: hot findings make TRPNs very cool. *Curr Biol*, **13**, R476-478.
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M. and Patapoutian, A. (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, **307**, 1468-1472.
- Moreno-Sanchez, R. (1985) Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem*, **260**, 4028-4034.
- Mori, M.X., Erickson, M.G. and Yue, D.T. (2004) Functional stoichiometry and local enrichment of calmodulin interacting with Ca²⁺ channels. *Science*, **304**, 432-435.
- Mukerji, G., Yiangou, Y., Corcoran, S.L., Selmer, I.S., Smith, G.D., Benham, C.D., Bountra, C., Agarwal, S.K. and Anand, P. (2006) Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC Urol*, **6**, 6.
- Murphy, B.C., Pienta, K.J. and Coffey, D.S. (1992) Effects of extracellular matrix components and dihydrotestosterone on the structure and function of human prostate cancer cells. *Prostate*, **20**, 29-41.
- Nadler, M.J., Hermosura, M.C., Inabe, K., Perraud, A.L., Zhu, Q., Stokes, A.J., Kurosaki, T., Kinet, J.P., Penner, R., Scharenberg, A.M. and Fleig, A. (2001) LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, **411**, 590-595.
- Nantermet, P.V., Xu, J., Yu, Y., Hodor, P., Holder, D., Adamski, S., Gentile, M.A., Kimmel, D.B., Harada, S., Gerhold, D., Freedman, L.P. and Ray, W.J. (2004) Identification of

- genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *J Biol Chem*, **279**, 1310-1322.
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., Ingber, D.E. and Zhou, J. (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*, **33**, 129-137.
- Nealen, M.L., Gold, M.S., Thut, P.D. and Caterina, M.J. (2003) TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol*.
- Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G. and Voets, T. (2005a) Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol*, **567**, 35-44.
- Nilius, B., Voets, T. and Peters, J. (2005b) TRP channels in disease. *Sci STKE*, **2005**, re8.
- Nissim-Rafinia, M. and Kerem, B. (2002) Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet*, **18**, 123-127.
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M. and Noguchi, K. (2005) TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*, **115**, 2393-2401.
- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K.M., Flockerzi, V. and Philipp, S.E. (2005) Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem*, **280**, 22540-22548.
- Orsini, J.C. (1982) Androgen influence on lateral hypothalamus in the male rat: possible behavioral significance. *Physiol Behav*, **29**, 979-987.
- Owsianik, G., D'Hoedt, D., Voets, T. and Nilius, B. (2006) Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **156**, 61-90.
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F.L., Walker, M.G., Watson, D., Park, T., Hiller, W., Fisher, E.R., Wickerham, D.L., Bryant, J. and Wolmark, N. (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, **351**, 2817-2826.
- Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Roberts, C.T., Jr., Marcelli, M., Vigneri, R. and Belfiore, A. (2005) Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res*, **65**, 1849-1857.
- Park, C.K., Kim, M.S., Fang, Z., Li, H.Y., Jung, S.J., Choi, S.Y., Lee, S.J., Park, K., Kim, J.S. and Oh, S.B. (2006) Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons: implication for tooth pain. *J Biol Chem*, **281**, 17304-17311.
- Partiseti, M., Le Deist, F., Hivroz, C., Fischer, A., Korn, H. and Choquet, D. (1994) The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem*, **269**, 32327-32335.
- Peehl, D.M. (2005) Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer*, **12**, 19-47.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. and Patapoutian, A. (2002a) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **108**, 705-715.
- Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., Bevan, S. and Patapoutian, A. (2002b) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*, **296**, 2046-2049.
- Pelzer, A.E., Volgger, H., Bektic, J., Berger, A.P., Rehder, P., Bartsch, G. and Horninger, W. (2005) The effect of percentage free prostate-specific antigen (PSA) level on the prostate cancer detection rate in a screening population with low PSA levels. *BJU Int*, **96**, 995-998.
- Peng, J.B., Zhuang, L., Berger, U.V., Adam, R.M., Williams, B.J., Brown, E.M., Hediger, M.A. and Freeman, M.R. (2001) CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 729-734.

- Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.P. and Scharenberg, A.M. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, **411**, 595-599.
- Philips, A.V. and Cooper, T.A. (2000) RNA processing and human disease. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 235-249.
- Pillai, S., Bikle, D.D., Mancianti, M.L., Cline, P. and Hincenbergs, M. (1990) Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol*, **143**, 294-302.
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Rizzuto, R. (2001) The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J*, **20**, 2690-2701.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A. and Hogan, P.G. (2006) Orail is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, **443**, 230-233.
- Premkumar, L.S., Raisinghani, M., Pingle, S.C., Long, C. and Pimentel, F. (2005) Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J Neurosci*, **25**, 11322-11329.
- Prewett, M., Rockwell, P., Rockwell, R.F., Giorgio, N.A., Mendelsohn, J., Scher, H.I. and Goldstein, N.I. (1996) The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, **19**, 419-427.
- Proudfoot, C.J., Garry, E.M., Cottrell, D.F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D.C., Fleetwood-Walker, S.M. and Mitchell, R. (2006) Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr Biol*, **16**, 1591-1605.
- Rak, D.J., Hardy, K.M., Jaffe, G.J. and McKay, B.S. (2006) Ca⁺⁺-switch induction of RPE differentiation. *Exp Eye Res*, **82**, 648-656.
- Ramsey, I.S., Delling, M. and Clapham, D.E. (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, **68**, 619-647.
- Reddy, G.P., Barrack, E.R., Dou, Q.P., Menon, M., Pelley, R., Sarkar, F.H. and Sheng, S. (2006) Regulatory processes affecting androgen receptor expression, stability, and function: potential targets to treat hormone-refractory prostate cancer. *J Cell Biochem*, **98**, 1408-1423.
- Reiser, J., Polu, K.R., Moller, C.C., Kenlan, P., Altintas, M.M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P.L., Clapham, D.E. and Pollak, M.R. (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*, **37**, 739-744.
- Remontet, L., Esteve, J., Bouvier, A.M., Grosclaude, P., Launoy, G., Menegoz, F., Exbrayat, C., Tretare, B., Carli, P.M., Guizard, A.V., Troussard, X., Bercelli, P., Colonna, M., Halna, J.M., Hedelin, G., Mace-Lesec'h, J., Peng, J., Buemi, A., Velten, M., Jouglu, E., Arveux, P., Le Bodic, L., Michel, E., Sauvage, M., Schwartz, C. and Faivre, J. (2003) Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique*, **51**, 3-30.
- Roche, P.J., Hoare, S.A. and Parker, M.G. (1992) A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **6**, 2229-2235.
- Rohacs, T., Lopes, C.M., Michailidis, I. and Logothetis, D.E. (2005) PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci*, **8**, 626-634.

- Roldan, E.R. and Fragio, C. (1993) Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Biol Chem*, **268**, 13962-13970.
- Sakura, H. and Ashcroft, F.M. (1997) Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia*, **40**, 528-532.
- Sawami, H., Terada, N., Franklin, R.A., Okawa, H., Uchiyama, T., Lucas, J.J. and Gelfand, E.W. (1992) Signal transduction by interleukin 2 in human T cells: activation of tyrosine and ribosomal S6 kinases and cell-cycle regulatory genes. *J Cell Physiol*, **151**, 367-377.
- Schalken, J.A. and van Leenders, G. (2003) Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology*, **62**, 11-20.
- Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W. and Konrad, M. (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*, **31**, 166-170.
- Schmechel, D., Marangos, P.J. and Brightman, M. (1978) Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature*, **276**, 834-836.
- Schmidt, U., Fuessel, S., Koch, R., Baretton, G.B., Lohse, A., Tomasetti, S., Unversucht, S., Froehner, M., Wirth, M.P. and Meye, A. (2006) Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate*, **66**, 1521-1534.
- Schmitz, C., Dorovkov, M.V., Zhao, X., Davenport, B.J., Ryazanov, A.G. and Perraud, A.L. (2005) The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *J Biol Chem*, **280**, 37763-37771.
- Schmitz, C., Perraud, A.L., Johnson, C.O., Inabe, K., Smith, M.K., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A. and Scharenberg, A.M. (2003) Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*, **114**, 191-200.
- Schoenmakers, E., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W. and Claessens, F. (2000) Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem*, **275**, 12290-12297.
- Schwarz, E.C., Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Strauss, B., Philipp, S.E., Flockerzi, V. and Hoth, M. (2006) TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium*, **39**, 163-173.
- See, V., Rajala, N.K., Spiller, D.G. and White, M.R. (2004) Calcium-dependent regulation of the cell cycle via a novel MAPK--NF-kappaB pathway in Swiss 3T3 cells. *J Cell Biol*, **166**, 661-672.
- Shou, Y., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L. and Isom, G.E. (2004) Calcineurin-mediated Bad translocation regulates cyanide-induced neuronal apoptosis. *Biochem J*, **379**, 805-813.
- Shuttleworth, T.J., Thompson, J.L. and Mignen, O. (2004) ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology (Bethesda)*, **19**, 355-361.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X.L., Coppenolle, F.V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B. and Prevarskaya, N. (2000) Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol*, **527 Pt 1**, 71-83.
- Smani, T., Zakharov, S.I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E.S. and Bolotina, V.M. (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol*, **6**, 113-120.
- Smith, P., Rhodes, N.P., Ke, Y. and Foster, C.S. (2000) Modulating effect of estrogen and testosterone on prostatic stromal cell phenotype differentiation induced by noradrenaline and doxazosin. *Prostate*, **44**, 111-117.

- Stanbrough, M., Leav, I., Kwan, P.W., Bubley, G.J. and Balk, S.P. (2001) Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10823-10828.
- Stattin, P., Rinaldi, S., Biessy, C., Stenman, U.H., Hallmans, G. and Kaaks, R. (2004) High levels of circulating insulin-like growth factor-I increase prostate cancer risk: a prospective study in a population-based nonscreened cohort. *J Clin Oncol*, **22**, 3104-3112.
- Stein, R.J., Santos, S., Nagatomi, J., Hayashi, Y., Minnery, B.S., Xavier, M., Patel, A.S., Nelson, J.B., Futrell, W.J., Yoshimura, N., Chancellor, M.B. and De Miguel, F. (2004) Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol*, **172**, 1175-1178.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. and Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, **112**, 819-829.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. and Clapham, D.E. (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*, **29**, 645-655.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F. and Nilius, B. (2005) Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*, **438**, 1022-1025.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J.L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2006) Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res*, **66**, 2038-2047.
- Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (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. *J Biol Chem*, **280**, 39423-39435.
- Thebault, S., Roudbaraki, M., Sydorenko, V., Shuba, Y., Lemonnier, L., Slomianny, C., Dewailly, E., Bonnal, J.L., Mauroy, B., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2003) alpha₁-adrenergic receptors activate Ca²⁺-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest*, **111**, 1691-1701.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
- Thut, P.D., Wrigley, D. and Gold, M.S. (2003) Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience*, **119**, 1071-1083.
- Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, **395**, 854.
- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y. and Tominaga, M. (2006) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *Embo J*, **25**, 1804-1815.
- Tombal, B., Weeraratna, A.T., Denmeade, S.R. and Isaacs, J.T. (2000) Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells. *Prostate*, **43**, 303-317.
- Tran, C.P., Lin, C., Yamashiro, J. and Reiter, R.E. (2002) Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. *Mol Cancer Res*, **1**, 113-121.
- Tsavalier, L., Shapero, M.H., Morkowski, S. and Laus, R. (2001) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*, **61**, 3760-3769.

- Tsukimi, Y., Mizuyachi, K., Yamasaki, T., Niki, T. and Hayashi, F. (2005) Cold response of the bladder in guinea pig: involvement of transient receptor potential channel, TRPM8. *Urology*, **65**, 406-410.
- Tsuruda, P.R., Julius, D. and Minor, D.L., Jr. (2006) Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron*, **51**, 201-212.
- Untergasser, G., Rumpold, H., Plas, E., Witkowski, M. and Berger, P. (2001) Seminal plasma factors induce in vitro PRL secretion in smooth muscle cells of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5577-5584.
- van der Eerden, B.C., Hoenderop, J.G., de Vries, T.J., Schoenmaker, T., Buurman, C.J., Uitterlinden, A.G., Pols, H.A., Bindels, R.J. and van Leeuwen, J.P. (2005) The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17507-17512.
- van Haasteren, G., Li, S., Muda, M., Susini, S. and Schlegel, W. (1999) Calcium signalling and gene expression. *J Recept Signal Transduct Res*, **19**, 481-492.
- van Leenders, G., van Balken, B., Aalders, T., Hulsbergen-van de Kaa, C., Ruiter, D. and Schalken, J. (2002) Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion. *Prostate*, **51**, 98-107.
- van Leenders, G.J., Aalders, T.W., Hulsbergen-van de Kaa, C.A., Ruiter, D.J. and Schalken, J.A. (2001) Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines. *J Pathol*, **195**, 563-570.
- van Leenders, G.J. and Schalken, J.A. (2003) Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, **46 Suppl**, S3-10.
- Vanden Abeele, F., 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. *J Cell Biol*, **174**, 535-546.
- Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J.B., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2004) Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem*, **279**, 30326-30337.
- Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F. and Prevarskaya, N. (2002) Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell*, **1**, 169-179.
- Vanden Abeele, F.V., Shuba, Y., Roudbaraki, M., Lemonnier, L., Vanoverberghe, K., Mariot, P., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2003) Store-operated Ca(2+) channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium*, **33**, 357-373.
- Vanoverberghe, K., Mariot, P., Vanden Abeele, F., Delcourt, P., Parys, J.B. and Prevarskaya, N. (2003) Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium*, **34**, 75-85.
- Vanoverberghe, K., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Lepage, G., Roudbaraki, M., Bonnal, J.L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2004) Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ*, **11**, 321-330.
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J.M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D.L., Soboloff, J., Gill, D.L., Fleig, A., Kinet, J.P. and Penner, R. (2006a) CRACM1 Multimers Form the Ion-Selective Pore of the CRAC Channel. *Curr Biol*.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. and Kinet, J.P. (2006b) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*, **312**, 1220-1223.

- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V. and Nilius, B. (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, **430**, 748-754.
- Walder, R.Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsohia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M.B., Beck, G.E., Englehardt, R.K., Carmi, R. and Sheffield, V.C. (2002) Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet*, **31**, 171-174.
- Wang, D.H. (2005) The vanilloid receptor and hypertension. *Acta Pharmacol Sin*, **26**, 286-294.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F. and Reed, J.C. (1999) Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, **284**, 339-343.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., Liu, X. and Wu, H. (2003) Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell*, **4**, 209-221.
- Wang, S., Garcia, A.J., Wu, M., Lawson, D.A., Witte, O.N. and Wu, H. (2006) Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1480-1485.
- Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G. and Montell, C. (1995) TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9652-9656.
- Whitacre, D.C., Chauhan, S., Davis, T., Gordon, D., Cress, A.E. and Miesfeld, R.L. (2002) Androgen induction of in vitro prostate cell differentiation. *Cell Growth Differ*, **13**, 1-11.
- Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Ebersviller, S., Burchette, J.L., Pericak-Vance, M.A., Howell, D.N., Vance, J.M. and Rosenberg, P.B. (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, **308**, 1801-1804.
- Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Fixemer, T., Schneidewind, A., Trost, C., Cavalie, A., Reus, K., Meese, E., Bonkhoff, H. and Flockerzi, V. (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem*, **276**, 19461-19468.
- Wong, W.Y., Flik, G., Groenen, P.M., Swinkels, D.W., Thomas, C.M., Copius-Peereboom, J.H., Merkus, H.M. and Steegers-Theunissen, R.P. (2001) The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol*, **15**, 131-136.
- Wright, M.E., Tsai, M.J. and Aebersold, R. (2003) Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol*, **17**, 1726-1737.
- Xing, H., Ling, J., Chen, M. and Gu, J.G. (2006) Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *J Neurophysiol*, **95**, 1221-1230.
- Xu, X.Z., Li, H.S., Guggino, W.B. and Montell, C. (1997) Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell*, **89**, 1155-1164.
- Yang, X.R., Lin, M.J., McIntosh, L.S. and Sham, J.S. (2006) Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **290**, L1267-1276.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O. and Cahalan, M.D. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, **443**, 226-229.
- Yuan, J.P., Kiselyov, K., Shin, D.M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S.H., Dehoff, M.H., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., Muallem, S. and Worley, P.F. (2003) Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP₃ receptors. *Cell*, **114**, 777-789.

- Yuspa, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M. and Roop, D.R. (1989) Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*, **109**, 1207-1217.
- Zamore, P.D. (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol*, **8**, 746-750.
- Zegarra-Moro, O.L., Schmidt, L.J., Huang, H. and Tindall, D.J. (2002) Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells. *Cancer Res*, **62**, 1008-1013.
- Zelivianski, S., Verni, M., Moore, C., Kondrikov, D., Taylor, R. and Lin, M.F. (2001) Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype. *Biochim Biophys Acta*, **1539**, 28-43.
- Zhang, L. and Barritt, G.J. (2004) Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 8365-8373.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A. and Cahalan, M.D. (2005) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, **437**, 902-905.
- Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S. and Ryba, N.J. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, **112**, 293-301.
- Zhu, N. and Wang, Z. (1999) Calreticulin expression is associated with androgen regulation of the sensitivity to calcium ionophore-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, **59**, 1896-1902.

Livres:

« pourquoi ce lourd tribut payé au cancer
Le cas exemplaire du Nord-Pas-de-Calais »
Pierre AÏACH, Marie MARSEILLE et Ivan THEIS
Editions ENSP (éditions de l'école nationale de la santé publique)
2004