

Université des Sciences et Technologies de Lille
Ecole Doctorale Biologie et Santé de Lille

Année 2007

N°d'ordre : 4113

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

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



Discipline : Biologie-Santé

Présentée par

Michaël MONET

**Mécanismes d'homéostasie calcique impliqués dans
l'évolution du cancer de la prostate humaine :
Rôle des facteurs de croissance et du canal TRPV2**

Thèse dirigée par le Professeur Natalia PREVARSKAYA

Soutenue le 10 décembre 2007 en la présence du jury composé de :

Mr. H. Hondermarck, Professeur à l'Université de Lille 1, INSERM ERI-8	Président
Me. H. Ouadid-Ahidouch, Professeur à la Faculté des Sciences d'Amiens	Rapporteur
Mr. M. Benahmed, Directeur de Recherche, INSERM U895, Université de Nice	Rapporteur
Me. N. Prevarskaya, Professeur à l'Université de Lille 1, INSERM U800	Examineur
Me. S. Humez-Eydoux, Maître de Conférence à l'Université d'Artois, Lens	Examineur
Mr. F. Rassendren, Chargé de Recherche CNRS UMR5203, Université de Montpellier I et II	Examineur

Mécanismes d'homéostasie calcique impliqués dans l'évolution du cancer de la prostate humaine: Rôle des facteurs de croissance et du canal TRPV2.

Le cancer de la prostate, seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme, est une maladie fréquente dont le développement est sous contrôle androgénique. Les traitements actuels visant à réduire l'activité des androgènes ont une efficacité temporaire car, chez la majorité des patients, une résistance aux traitements émerge. Elle est le résultat (i) de l'évolution des cellules cancéreuses prostatiques vers l'androgéno-indépendance et (ii) de l'augmentation de la différenciation neuroendocrine, ce qui requière l'intervention de facteurs non androgéniques tels que les facteurs de croissance. 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.

Pour la première fois, nos résultats montrent que des variations du taux de calcium du réticulum modifient la croissance des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes LNCaP et décrivent que les facteurs de croissance EGF, IGF, TNFalpha modulent la croissance cellulaire *via* des modifications de l'homéostasie calcique. D'autre part, nous démontrons que l'EGF, en plus d'induire la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes DU145, permet de réduire la quantité de calcium libérable par le réticulum endoplasmique. Cette modification du calcium réticulaire permet de protéger les DU145 de l'apoptose induite par une élévation du taux de calcium cytoplasmique.

Parmi les différents responsables de cette dérégulation, nous avons remarqué que le canal TRPV2 (TRP Vanilloid 2) était plus exprimé et impliqué dans les dérégulations de l'homéostasie calcique du cancer prostatique. Nous avons prouvé que PI3-kinase favorisait l'activité du canal TRPV2 de souris surexprimé indépendamment de la translocation du canal à la membrane plasmique. Nos travaux ont mis en évidence pour la première fois que les lysophospholipides étaient des agonistes physiologiques de TRPV2 en induisant la translocation et l'activation des canaux humains et de souris. Enfin nous avons démontré que l'expression du canal TRPV2 était détectée dans les cellules androgéno-indépendantes y compris les cellules neuroendocrines du cancer de la prostate ce qui est corrélé aux modifications de l'homéostasie calcique de ces cellules. Le canal TRPV2 pourrait donc représenté un nouveau marqueur des cellules cancéreuses prostatiques évoluant vers les phénotypes les plus agressifs.

Mechanisms of calcium homeostasis involved in evolution of human prostate cancer: Role of growth factors and TRPV2 channel.

Prostate cancer, second cause of mortality by cancer in men, is a frequent disease with development under control androgens. The current treatments aiming at reducing the activity of androgens have a temporary effectiveness because, for majority of patients, a resistance to treatments emerges. It is the result (i) of evolution of prostate cancer cells towards androgen-independence and (ii) of increase in neuroendocrine differentiation, which requires intervention of non androgenic factors such as growth factors. Calcium being one of factors which regulate differentiation, proliferation and apoptosis, modifications of calcium homeostasis could take part in evolution of prostate cancer. The super family calcium channels TRP ("Transient Receptor Potential") are promising candidates for regulation of intracellular calcium in not excitable cells.

For the first time, our results show that calcium rate variations in reticulum modify the growth of androgen-dependent cancerous LNCaP cells and describe that growth factors EGF, IGF, TNF α modulate cell multiplication by modifications of calcium homeostasis. In addition, we show that EGF, in addition to inducing neuroendocrine differentiation of cancerous androgen-independent DU145 cells, is able to reduce the quantity of calcium releasing by endoplasmic reticulum. This modification of reticular calcium induces apoptosis protection by abolition of calcium cytoplasmic rate increase in DU145 cells.

Among the different responsible for this deregulation, we noticed that TRPV2 channel (TRP Vanilloid 2) seemed more to be expressed and involved in the deregulation of calcium homeostasis of prostate cancer. We proved that PI3-kinase promotes activity of mouse TRPV2 overexpressed independently of channel translocation to the plasma membrane. For the first time, our work demonstrated that the lysophospholipides were physiological agonists of TRPV2 by inducing translocation and activation of human and mouse channels. To finish we showed that the expression of channel TRPV2 was detected in the cells androgen-independent cells including neuroendocrine cells of prostate cancer, what is correlated with modifications of calcium homeostasis of these cells. Thus TRPV2 channel could represent a new marker of prostate cancer cells evolving to the most aggressive phenotypes.

A ma femme Emilie,

A mes parents,

A ma famille,

A vous tous,

« Les scientifiques sont arrêtés par l'idée de l'absurde, de l'hérésie scientifique, l'artiste rien ne l'arrête, il n'est pas embarrassé par la science..., C'est ainsi qu'il pénètre derrière les portes fermées à la science. »

Elsa Triolet, Extrait de Luna-Park

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

Monsieur le Président :

Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck, vous participiez déjà aux jurys m'ayant accordé le D.E.A et mon financement de thèse et vous avez contribué auparavant par vos cours sur l'oncologie à attirer mon attention sur les cancers. C'est donc pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de juger ma thèse et de présider ce jury. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

Madame et Monsieur les rapporteurs :

Madame le Professeur Halima Ouadid-Ahidouch, après avoir participé à mon éveil à l'Anatomophysiologie il y a quelques années déjà..., vous avez accepté d'être rapporteur de cette thèse, la boucle est donc bouclée. Merci d'avoir consacré une partie de votre temps à lire et à juger ce travail qui, je l'espère, sera meilleur que ma copie d'examen de l'époque.... Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Mohamed Benahmed, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et d'avoir consacré une partie de votre temps à lire et à juger ce travail. Soyez assuré de mes profonds remerciements.

Mesdames et Monsieur les examinateurs :

Madame le Professeur Natalia Prevarskaya, Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir fait continuellement confiance tout au long de ces cinq années. Pour ces raisons et bien d'autres encore, je tiens à vous exprimer mon plus sincère respect.

Madame le Docteur Sandrine Humez-Eydoux, votre aide et vos précieux conseils ainsi que toutes les discussions que nous avons eues ces quatre années ont été déterminantes pour l'évolution de ce travail, soyez assuré de ma sincère reconnaissance. Recevez à cet égard et bien d'autres encore, mon plus sincère respect et toute ma gratitude.

Monsieur le Docteur François Rassendren, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Recevez toute ma gratitude pour nos collaborations passées et pour celles à venir.

Merci à tous d'avoir accepté de donner de votre temps pour juger ce manuscrit.

Je tiens à remercier l'ARC pour m'avoir financé pendant une partie de ma quatrième année de thèse et de m'avoir permis de finaliser cette thèse.

Je tiens à remercier vivement l'ensemble des membres du laboratoire pour leur professionnalisme, pour la gentillesse dont ils ont su faire preuve à mon égard, leurs sourires, ainsi que pour l'aide et les conseils dont ils ne furent jamais avares. Je vous remercie aussi pour la bonne ambiance générale qui règne au laboratoire grâce à vous. Merci donc aux membres actuels et futurs docteurs ainsi qu'aux anciens : Pascal (et le marathon), Grand Fabien (et les noix), Morad (et le tennis), Dimitra, Phil (et les DivX), Etienne (et la carboglace), Agathe, Lolo (et Naruto), Steph (et la morue), Ben, Olivier (et le vrai rock), Matthieu, Evelyne (et ma tante), Michelle, Little Fab, Christian (et l'informatique), Thierry, Petit Matthieu, Hélène, Alexis, Roman, Nicolas, Mehdi, Elisabeth, Gilbert, Karine, Isabelle, Antoine, Guillaume, Karine,...

Sandrine,

Encore une fois, mille mercis ne suffiraient pas et pourtant, je n'ai pas trouvé mieux, donc merci pour cette belle aventure qui a commencé un beau jour de mars 2002, merci pour ta confiance, ton soutien, tes critiques, les discussions (scientifiques ou non) que nous avons pu avoir, bref, tout ce qui m'a permis d'être autonome, d'avancer et d'évoluer depuis cinq ans. Au final, ça aura plutôt bien « marché » je crois!!! Je te souhaite beaucoup de réussites pour ta carrière avec mes « remplaçantes » Agathe et Elisabeth mais aussi et surtout tout le bonheur du monde dans ta vie de maman.

Natacha,

Un simple merci ne suffisait pas à lui seul et pourtant c'est le mot le plus juste qui me vient à l'esprit : merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, merci de votre confiance, j'ai conscience de tout ce que vous m'avez apporté et encore merci pour votre soutien et pour l'intérêt que vous avez porté à l'évolution de ce travail. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir (avec Ivan et Maxime).

Maria, Flo, Charbel : les futurs docteurs, Gab et Alex : les déjà vieux docteurs !!

Bien que vous soyez (ou avez été) des membres du laboratoire, vous êtes hors catégorie car vous êtes devenus de vrais amis. Pour votre amitié, vos bons conseils, pour les parties de loup, les fous rires, les Who, les Gilles de la Tourette, les parties de jungle speed, les poulets frites,

les restos grecs ou libanais... bref, pour les quelques moments qui rendent la vie plus agréable et qui permettent de tenir bon, MERCI !!!!!

Mes amis Lillois, Maingeois, Trithois, Valenciennois,...

Amélie, Richard, Bérengère, Sophie, Anthony, Laetitia, Antoine, Krystelle, Ced, Laure, Amandine, Yaya, Seb, Caro,... La thèse m'a un peu éloignée de vous et le Canada risque d'augmenter encore un peu plus cette distance. Pourtant, par vos messages, vos coups de fil, vos sms, vous avez toujours été présents dans mon cœur et vous m'avez permis d'arriver au terme de ce travail.

Mes parents,

Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix, pour m'avoir fait confiance depuis plus de 27 ans, vos encouragements, votre présence, votre bienveillance et pour l'amour dont vous m'avez toujours entouré dans les mauvais mais aussi dans les bons moments: cette thèse en est le résultat. Merci également à toute ma famille et ma belle famille pour leurs multiples et divers encouragements.

Emilie,

Comme on dit, le meilleur pour la fin. Je n'aurai pas assez de l'intégralité de ce manuscrit pour te dire tout ce que je veux, tout ce que je te dois et dans le même temps, les mots me manquent. Aussi j'essayerai de faire simple : tu es présente à mes cotés depuis le début de mes années fac et je crois que si j'en suis là aujourd'hui, c'est principalement grâce à toi. Tu n'as eu de cesse de m'aider, me soutenir, m'encourager, me supporter (moi et mon sale caractère), m'aimer aussi et surtout. Grâce à tout cela, cette thèse n'est pas la mienne, c'est la notre, notre «bébé de papier» en attendant notre vrai premier bébé... Je t'aime infiniment.

Sommaire

Sommaire	10
Glossaire	15
Introduction	20
I. PHYSIOLOGIE DE LA PROSTATE	21
A. ANATOMIE.....	21
B. HISTOLOGIE	23
1. Le stroma.....	23
2. Le tissu glandulaire	23
<i>a. Les cellules épithéliales basales</i>	24
<i>b. Les cellules épithéliales intermédiaires</i>	25
<i>c. Les cellules épithéliales apicales</i>	26
<i>d. Les cellules neuroendocrines</i>	26
C. ROLE PHYSIOLOGIQUE.....	28
1. Rôle sécrétoire de la prostate	29
2. Rôle mécanique de la prostate.....	30
D. ROLE DES ANDROGENES.....	30
1. Métabolisme des androgènes	30
2. Mode d'action des androgènes.....	31
<i>a. Effets génomiques</i>	31
<i>b. Effets non génomiques</i>	32
II. CANCERS PROSTATIQUES ET TRAITEMENTS	34
A. LE CANCER DE LA PROSTATE.....	34
1. Epidémiologie du cancer de la prostate.....	34
2. Facteurs de risque.....	35
<i>a. Les facteurs familiaux héréditaires</i>	35
<i>b. Les facteurs environnementaux</i>	35
3. Origine cellulaire et développement du cancer prostatique	36
<i>a. Origine cellulaire du cancer prostatique</i>	36
<i>b. Développement du cancer prostatique</i>	37
4. Rôle des androgènes dans le développement du cancer prostatique.....	37
5. Différenciation neuroendocrine dans le cancer prostatique	38
6. Le cancer neuroendocrine pur	38
B. CLASSIFICATION ONCOLOGIQUE.....	39
1. Le système TNM.....	39
2. Le score de Gleason	40
C. LES THERAPEUTIQUES DU CANCER.....	40
1. Traitements curatifs.....	41
2. Traitements palliatifs.....	41
F. EVOLUTION DU CANCER PROSTATIQUE VERS L'ANDROGENO- INDEPENDANCE.....	42
1. Le récepteur aux androgènes.....	42
2. Les autres facteurs.....	42
3. La différenciation neuroendocrine	43
III. IMPLICATION DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE PROSTATIQUE	46
A. FACTEURS DE CROISSANCE	46

B. LES RECEPTEURS AUX FACTEURS DE CROISSANCE.....	47
C. TRANSMISSION DES SIGNAUX DES FACTEURS DE CROISSANCE.....	48
1. La voie des protéines G.....	49
2. La voie des phospholipases.....	49
D. FACTEURS DE CROISSANCE ET PATHOLOGIES PROSTATIQUES.....	50
1. Caractéristiques générales de l'Epidermal Growth Factor (EGF).....	50
2. Implication de l'EGF dans les pathologies prostatiques.....	52
3. Inhibiteurs de l'EGF et thérapeutiques.....	54
a. <i>Les anticorps monoclonaux anti EGFR</i>	55
b. <i>Les inhibiteurs de tyrosine-kinase</i>	55
c. <i>Autres stratégies</i>	56
IV. IMPLICATION DES LYSOPHOSPHOLIPIDES DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE PROSTATIQUE.....	58
A. ORIGINE ET STRUCTURE DES LYSOPHOSPHOLIPIDES.....	58
1. Les Phospholipases A et leurs produits.....	58
2. Ou se trouve les lysophospholipides?.....	61
B. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES LYSOPHOSPHOLIPIDES.....	63
1. Récepteurs aux lysophospholipides.....	63
2. Mode d'action et rôle des lysophospholipides.....	64
a. <i>Rôle du LPA</i>	64
b. <i>Rôle du LPC</i>	65
c. <i>Rôle de la SIP</i>	65
C. LYSOPHOSPHOLIPIDES ET CANCERS.....	66
1. Les LPLs et la survie des cellules cancéreuses.....	66
2. Présence des LPLs dans les effusions malignes.....	67
3. Des « oncoenzymes » produisant des oncolipides.....	67
V. ROLE DU CALCIUM.....	68
A. SOURCES DE CALCIUM ET SA REGULATION CELLULAIRE.....	68
1. Régulation des échanges calciques au travers du réticulum endoplasmique.....	68
a. <i>Les pompes calciques réticulaires SERCA</i>	69
b. <i>Les canaux réticulaires R-IP3 et RYRs</i>	70
c. <i>La fuite passive réticulaire</i>	70
2. Régulation des échanges calciques au travers de la membrane plasmique.....	70
a. <i>Les canaux VOC, ROC et SMOG</i>	70
b. <i>Les canaux SOC</i>	71
c. <i>Les pompes et transporteurs</i>	73
B. CARACTERISTIQUES DE LA SIGNATURE CALCIQUE.....	73
1. Localisation.....	73
2. Cinétique.....	74
3. Amplitude.....	75
C. FONCTIONS DU SIGNAL CALCIQUE.....	76
1. Régulation moléculaire de l'expression génique et protéique.....	76
2. Régulation de la prolifération.....	77
3. Calcium et apoptose.....	78
4. Calcium et différenciation.....	79
VI LA SUPER FAMILLE DES CANAUX CALCIQUES TRP.....	81
A. HISTORIQUE : LES TRP DE LA DROSOPHILE A L'HOMME.....	81
B. CLASSIFICATION ET STRUCTURES COMMUNES.....	82
C. FONCTIONS DES CANAUX TRP THERMOSENSEURS DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE CELLULAIRE.....	84

1. Le canal TRPM8	85
2. Les canaux TRPA1.....	85
3. Les canaux TRPV.....	86
VII LE CANAL TRPV2, UN CANDIDAT INSOLITE.....	88
A. TRPV2 : THERMORECEPTEUR DES NEURONES SENSORIELS	88
B. REGULATION DE L'ACTIVITE DE TRPV2	90
C. TRPV2 ET PATHOLOGIES.....	91
Problématique et objectifs	93
I ETUDE DU ROLE DU CA ²⁺ DANS LA CROISSANCE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES	94
II ETUDE DU ROLE DU CA ²⁺ DANS LE MODE D'ACTION DES FACTEURS DE CROISSANCE IMPLIQUES DANS L'EVOLUTION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES	95
III ETUDE DU ROLE DU CANAL CALCIQUE TRPV2 DANS L'EVOLUTION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES.....	96
Matériels et Méthodes	98
I. CULTURE CELLULAIRE	99
A. LES LIGNEES CELLULAIRES	99
1. Lignée cellulaire cancéreuse prostatique androgéno-dépendante LNCaP	99
2. Lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante LNCaP C4-2	99
3. Lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante DU145	100
4. Lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante PC3	100
5. Lignée de surexpression HEK 293.....	100
6. Lignées de surexpression CHO et CHOmTRPV2	100
B. CONDITIONS DE CULTURE	101
C. CONGELATION/ DECONGELATION	102
D. INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION NEUROENDOCRINE PAR SERUM « DESTEROÏDE »	102
II. MESURE MICROFLUORIMETRIQUE DU CA ²⁺ LIBRE INTRACELLULAIRE SUR CELLULE UNIQUE	103
1. Propriétés physicochimiques des sondes.....	103
a. Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2	103
b. Caractéristiques de la sonde calcique Mag-Fura-2	104
2. Equipement optique.....	104
3. Calibration des signaux de fluorescence	105
4. Milieu d'enregistrement	105
5. Charge des cellules en Fura-2/AM et Mag-Fura-2.....	105
6. Estimation du calcium libre réticulaire avec la sonde calcique Mag-Fura-2	106
III. MESURE DE VIABILITE CELLULAIRE.....	106
IV. MESURE DE L'APOPTOSE PAR LA TECHNIQUE D'HOESCHT	106
V. TRANSFECTION TRANSITOIRE.....	107
1. Lipofection	107
2. Nucléofection	107
VI. MESURE DE L'EXPRESSION D'ARN MESSAGERS (ARNM)	108
1. Récupération des cellules et extraction des ARNm	108
2. Le traitement à la Deoxyribonucléase 1 (DNase I).....	109
3. Transcription inverse.....	109
4. La PCR (Polymerase Chain Reaction).....	110
5. Conditions de PCR.....	110
VII. IMMUNODETECTION	110

A. EXTRACTION DES PROTEINES	110
B. WESTERN BLOT	111
C. IMMUNOFLUORESCENCE	111
D. IMMUNOHISTOCHEMIE	112
E. MICROSCOPIE CONFOCALE.....	112
VIII. ANALYSE DES DONNEES	113
Résultats	114
CHAPITRE 1	116
ARTICLE 1	116
LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES LNCAP EST UN POINT DE CONTROLE DE LA VIE.....	116
ET DE LA MORT CELLULAIRE	116
ARTICLE 2	130
L'EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR) INDUIT LA DIFFERENCIATION NEUROENDOCRINE ET LA RESISTANCE A L'APOPTOSE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES ANDROGENO-INDEPENDANTES HUMAINES DU145.	130
CHAPITRE 2	146
ARTICLE 3	146
PI3-KINASE FAVORISE L'ACTIVITE TRPV2 INDEPENDAMMENT DE LA TRANSLOCATION DU CANAL A LA MEMBRANE PLASMIQUE.....	146
ARTICLE 4	160
LPC ET LPI SONT INDUISENT L'ACTIVATION ET LA TRANSLOCATIOPN DES DIFFERENTES FORMES DU CANAL TRPV2.....	160
CHAPITRE 3	194
ARTICLE 5	194
TRPV2 EST IMPLIQUE DANS LA DIFFERENCIATION NEUROENDOCRINE ET L'ANDROGENO-INDEPENDANCE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES HUMAINES.	194
Discussion et Perspectives	222
I. DISCUSSION	223
A. IMPLICATION DES RESERVES CALCIQUES INTRACELLULAIRES DANS LA CROISSANCE DES CELLULES PROSTATIQUES ANDROGENO-DEPENDANTES.	224
B. REGULATION ET ROLE DES RESERVES CALCIQUES INTRACELLULAIRES DANS LES CELLULES ANDROGENO-INDEPENDANTES (DU145).	227
C. REGULATION ET ROLE DU CANAL TRPV2 DANS LES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES.	229
II. EVOLUTION DU PROJET ENVISAGE	232
A. FACTEURS DE CROISSANCE ET PROTEINES REGULANT L'HOMEOSTASIE CALCIQUE DES CELLULES PROSTATIQUES.....	232
1. Effet des facteurs de croissance sur les TRP	232
2. Effet des facteurs de croissance sur les PMCA.....	233
3. Effet des facteurs de croissance sur les protéines chélatrices	233
B. TRPV2 ET PATHOLOGIES.....	234
1. Lysophospholipides et TRPV2 dans la prostate.....	234
2. TRPV2 dans l'urothélium et le foie	235
Publications personnelles et Références bibliographiques	237
I. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES	238
A. PUBLICATIONS	238

B. COMMUNICATIONS	238
II REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	240

Glossaire

2APB	: 2 AminoethoxydiPhenyl Borate
5α-DHT	: 5 α -DiHydroTestostérone
17-AAG	: 17-N-AllylAmino-17-demethoxyGeldanamycin
ACDBD3	: Acyl CoA Binding Domain protein 3
Ach	: Acéthylcholine
ADN / DNA	: Acide DéoxyriboNucléique
ADP	: Adénosine DiPhosphate
AMP	: Adénosine MonoPhosphate
APUD	: Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
AR/RA	: Androgen Receptor
ARD	: Ankyrin Repeat Domain
ARE	: Androgen Response Element
ARN / RNA	: Acide RiboNucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adénosine TriPhosphate
ATX	: Autaxine
BAPTA	: 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N'-tetraacetic acid
BCA	: Acide Bicinchoninique
Bcl-2	: B-Cell Lymphoma-2
Bet	: Bromure d'éthidium
Ca²⁺	: Calcium
CamKII	: Calmoduline Kinase II
cAMP / APMc ...	: Cyclic Adenosine 5'-MonoPhosphate
CCD	: Charged Coupled Device
Cg A, B, C	: Chromogranine A,B,C
CHO	: Chinese Hamster Ovarian
CIF	: Calcium Influx Factor
cPLA2	: Phospholipase A2 dépendante du calcium
CRAC	: Calcium Release Activated Channel
CRE	: cAMP Respons Element

CREB: CRE Binding Protein
Da.....: Dalton
DAG.....: DiAcylGlycerol
DMEM..... : Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP: Deoxy Nucleotide TriPhosphate
DO/OD : Densité Optique/ Optical Density
DRG.....: Dorsal Root Ganglion
DTT.....: DiThioThreitol;
ECACC.....: European Collection of Cell Culture
ECC.....: Entrée Capacitive de Calcium
EDG.....: Endothelial Differentiation Gene
EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGF.....: Epidermal Growth Factor
EGF-R.....: Récepteur à l'EGF
EGTA.....: Ethylène Glycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic acid
ERG.....: Electrorétinogramme
FGF.....: Fibroblast Growth Factor
fMLP.....: formyl Met-Leu-Phe
G418: Généticine
GDP.....: Guanine Di Phosphate
GFP: Green Fluorescent Protein
GPCR.....: G Protein Coupled Receptor/ Récepteur membranaire couplé aux petites protéines G.
GnRH..... : Gonadolibérine
Grb2.....: Growth factor-Receptor- Bound protein 2
GPR4.....: G-Protein coupled Receptor 4
GRP.....: Gastrin Releasing Peptide
GTP.....: Guanine Tri Phosphate
HB-EGF..... : Heparin Binding EGF
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])
HSP/hsp.....: Heat Shock Protein

IBMX.....: Isobutylmethylxanthine
IGF.....: Insuline-like Growth Factor
IL-6..... : Interleukine-6
IP3: Inositol triPhosphate
IP3R.....: IP3 Receptor
iPLA2: Phospholipase A2 indépendante du calcium
Kd: constante de dissociation
kDa: kilo Dalton
kpb..... : kilo paire de bases
K-SFM.....: Keratinocyte Serum-Free Medium
LCAT.....: Lecithine Cholesterol AcylTransferase
LH(-RH): Luteinizing Hormone (Releasing Hormone)
LNCaP.....: Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LPA: LysoPhosphatidic Acid
LPC: LysoPhosphatidylCholine
LPG: LysoPhosphatidylGlycerol
LPI.....: LysoPhosphatidylInositol
LPS: LysoPhosphatidylSerine
LPLs: LysoPhospholipides
LSLs: LysoSphingolipids
MAPK.....: Mitogenic Activated Proteins Kinase
MCP: Mort Cellulaire Programmée
MTS.....: Sel de tetrazolium
NA: NorAdrénaline
NFAT.....: Nuclear Factor of Activated T-cell
NGF.....: Nerve Growth Factor
NRG..... : Neureguline
NSE.....: Neuron-specific Enolase
OGR1.....: Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1
ORAI1.....: Transmembrane protein 142A, CRACM1
p21: p21 *Waf1/Cip1* protein
PA-PLA1.....: Phosphatidic acid Preferentiel-PLA1
PACAP.....: Pituitary Adenylate Cyclase- Activating Polypeptide
pb..... : paire de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline
PC.....: Phosphatidylcholine
PC-3.....: Human, Caucasian, prostate, adenocarcinoma, grade IV
PCa: Prostate cancer
PDGF.....: Platelet Derived Growth Factor
PFA.....: ParaFormaldéhyde
PI3K.....: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIP₂.....: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou PtdIns(4,5)P₂
PKA.....: Protéine Kinase AMPc-dépendante
PKC.....: Protéine Kinase C
PLA.....: PhosphoLipase A
PLC: PhosphoLipase C
PM.....: Plasma Membrane / Plasmalemma
PMA: Phorbol 12-myristate 13 acétate
PMCA: Plasma Membrane Calcium ATPase
PMS.....: Phenozone Methosulfate
PNT1A.....: Prostate Normal Transformed cell line, clone 1A
Pro-EGF.....: Précurseur de l'EGF humain
PS-PLA1.....: Phosphatidylsérine Specific-PLA1
PSA.....: Prostate Specific Antigen
PSCA.....: Prostate Stem Cell Antigen
PTHrP.....: ParaThyroid Hormone related-Protein
PVDF.....: PolyVinyl Dene Fluoride
RE / ER.....: Réticulum Endoplasmique
RGA.....: Recombnase Gene Activator protein
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
S1P.....: Sphingosine 1 Phosphate
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE.....: SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SERCA.....: Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase

SHP-2.....: Src homology-2
shRNA.....: Short hairpined RNA
siARN:Small interfering RNA
SIRP α: Signal Regulatory Protein α
s-lyso-PLD.....: lysophospholipase D soluble
SMOC: Second Messenger-Operated Channel
SOC.....: Store-Operated channel
SOC_{CC}.....: SOC activé par couplage conformationnel
SOC_{CIF}.....: SOC activé par le CIF
SOS.....: Son Of Sevenless protein
SPC.....: SphingosylPhosphorylCholine
sPLA2.....: PLA2 sécrétée
SRE.....: Serum Reponsive Element
STIM: Stromal Interacting Molecule
T.....: Testostérone
TeBG.....: Testosteron-Binding Protein
TG.....: ThapsiGargine
TGF- α , β: Transforming Growth Factor α , β
TNM.....: Tumor, Node, Metastasis
TNT: Tris/NaCl/Tween-20
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
UV.....: Ultra Violet
VIP.....: Vasoactive Intestinal Peptide
VEGF.....: Vascular Endothelial Growth Factor
VOC.....: Voltage-Operated Channel
VRL1.....: Vanilloid Receptor Like 1

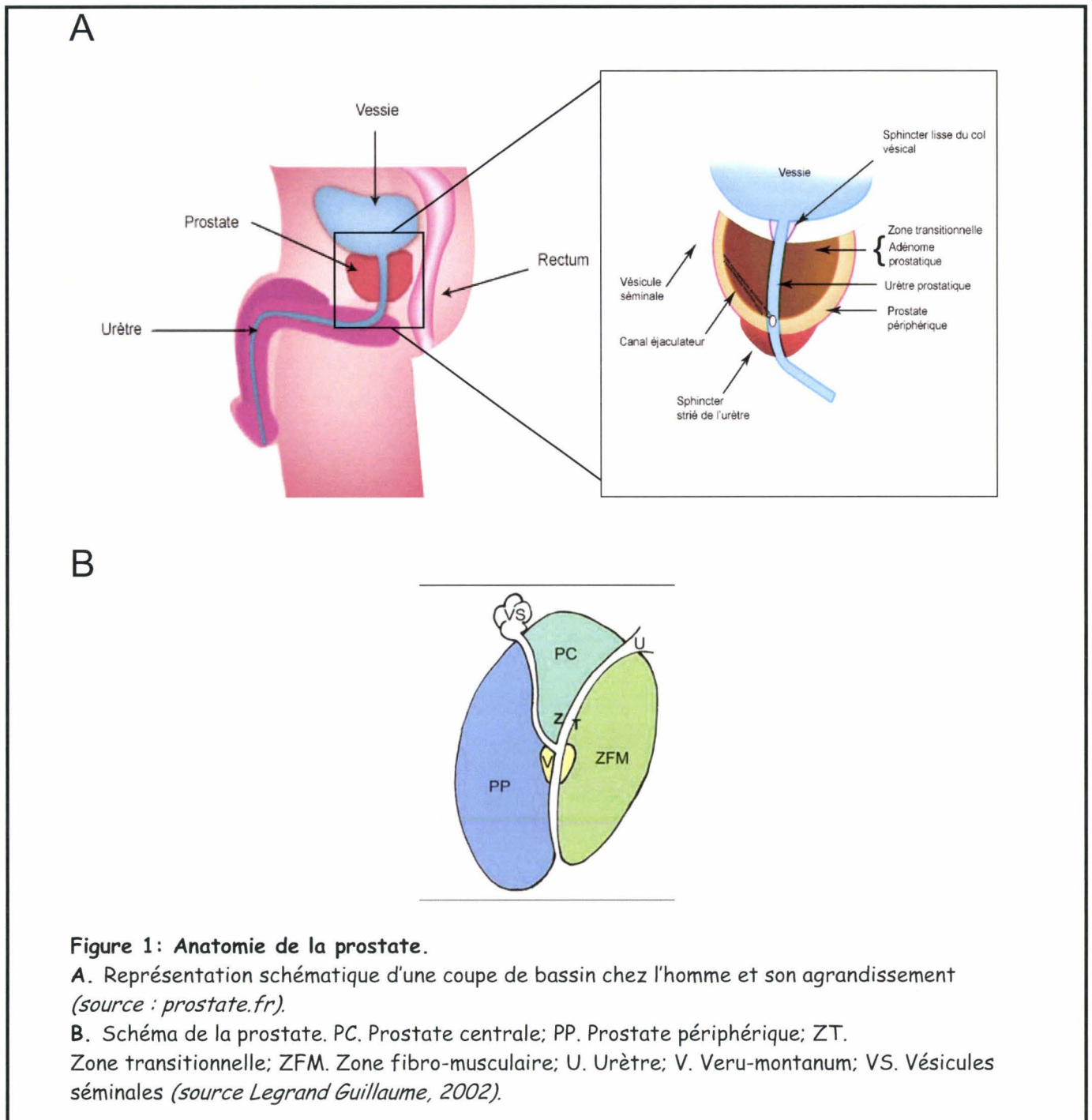
Introduction

I. PHYSIOLOGIE DE LA PROSTATE

La prostate, qui appartient au système reproducteur masculin, est un organe secondaire glandulaire et fibromusculaire multilobé entourant la partie haute de l'urètre. Du grec *prostatês*, « qui se tient en avant », elle est située en avant du rectum, entre la vessie et le diaphragme urogénital. Elle est recouverte d'une capsule fibreuse et, pour un homme de 25 ans, elle pèse environ 20 grammes, mesure environ 3 à 4 cm de long et 3 à 5 cm de large et a la forme d'une châtaigne. Cet organe qui exerce une double fonction physiologique, à la fois glandulaire exocrine (en sécrétant une partie du liquide spermatique) et mécanique (en participant aux fonctions urinaires et éjaculatoires), est le siège de développement de 3 pathologies qui représentent un problème majeur de santé publique : les hyperplasies bénignes, les cancers prostatiques et à moindre mesure les prostatites ou infection de la prostate.

A. ANATOMIE

A la naissance, le tissu prostatique est formé d'un simple système de canaux dispersés dans un abondant stroma fibromusculaire. Durant l'enfance, le nombre de structures glandulaires augmente très peu et c'est à partir de la puberté et jusqu'à 25-30 ans que la croissance conjuguée du stroma fibromusculaire et des glandes aboutit à l'aspect de la prostate adulte. La prostate, organe endocrine appartenant à l'appareil génital masculin, entoure l'urètre et les canaux éjaculateurs (Figure 1A). L'urètre, canal principal permet l'évacuation de l'urine depuis la vessie vers l'extérieur. La prostate participe au processus mictionnel via les sphincters intraprostatiques, situés autour de l'urètre. La prostate n'intervient pas dans l'élaboration de l'urine mais elle peut générer des symptômes urinaires par compression de l'urètre lorsqu'elle augmente de volume. La prostate intervient dans le processus éjaculatoire, en sécrétant environ 30% du sperme, ainsi que dans l'activation et la protection des spermatozoïdes. A la partie basse de la prostate se situe le carrefour entre les voies urinaires et séminales, ces dernières étant les voies d'écoulement du liquide spermatique produit par les testicules. La glande prostatique a donc une double mission : celle d'être traversée par l'urètre et celle de sécréter le liquide spermatique. La glande prostatique est très solidement attachée à des structures fibreuses qui vont délimiter la loge prostatique. Bien que la prostate soit macroscopiquement homogène, une



conception simplifiée de l'organe en différents lobes est essentielle pour la compréhension des pathologies prostatiques.

McNeal a proposé un modèle précis de l'anatomie zonale de la prostate dont la terminologie est adoptée depuis 1981 (McNeal, 1981). On considère qu'il existe trois grandes zones prostatiques glandulaires fonctionnelles (Figure 1B): (1) **la zone centrale**, en forme de cône retourné, qui entoure l'urètre et occupe 25 % du volume prostatique; (2) **la zone périphérique** plus grosse et facilement palpable au toucher rectal, qui englobe 70 % de la

glande et qui est le siège privilégié de développement des cancers prostatiques (Chisolm and Chai, 2000; McNeal, 1969) (*Chisolm and Chai*) **la zone pré-prostatique**, également appelée zone de transition, qui ne représente que 5 % de la glande. Elle est formée d'une fine couche de tissu glandulaire situé de part et d'autre de l'urètre dans la partie centrale de la prostate. Cette zone est le siège privilégié de développement des hyperplasies bénignes prostatiques, et plus rarement des adénocarcinomes (Lalani et al., 1997). La prostate possède également une quatrième zone : *la zone fibromusculaire antérieure*, en continuité avec le col vésical, et ne possédant pas de structures glandulaires. Elle correspond à environ 1/3 du volume de l'organe.

B. HISTOLOGIE

La prostate est composée principalement du stroma fibromusculaire et du tissu glandulaire consistant en un épithélium pseudo-stratifié. Ces deux tissus sont séparés l'un de l'autre par une lame basale (Figure 2). De plus, il existe dans les deux compartiments précédemment définis un phénotype cellulaire particulier: les cellules neuroendocrines.

1. Le stroma

Il correspond à un mélange complexe de fibroblastes et de cellules musculaires lisses qui constituent une matrice maintenant en place les différentes cellules de la prostate, et de cellules musculaires lisses. Ces dernières permettent, grâce à leur contraction, l'évacuation du liquide prostatique, l'un des constituants du liquide spermatique. Les cellules stromales jouent également un rôle physiologique important dans le contrôle de la prolifération et le maintien de l'état de différenciation des cellules épithéliales adjacentes, grâce à la sécrétion de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF β (Transforming Growth Factor), le NGF (Nerve Growth Factor) (Marengo and Chung, 1994) et d'hormones agissant sur les cellules épithéliales comme la prolactine (Untergasser et al., 2001), la PTHrP (ParaThyroid Hormone related-Protein) (Blomme et al., 1998) et l'adrénaline (Smith et al., 2000).

2. 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. Ce tissu est constitué d'un système de canaux ramifiés, terminés par des

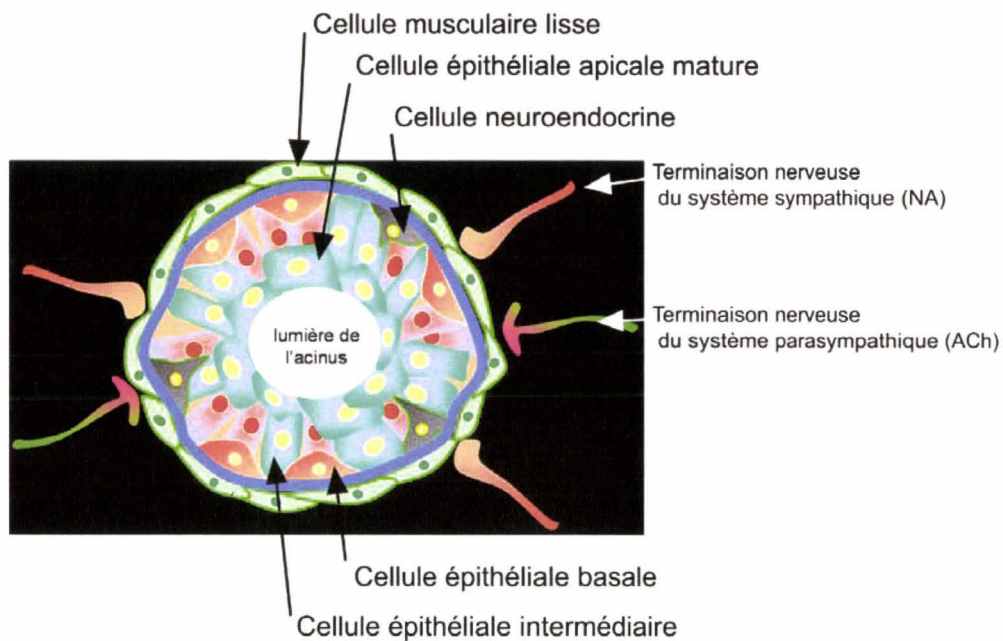


Figure 2: Différents types de cellules prostatiques et innervation de la prostate. Représentation schématique de la structure cellulaire d'un acinus prostatique composé des cellules épithéliales présentées ci-dessus, bordé par une membrane basale, elle-même entourée de cellules stromales musculaires lisses innervées par les systèmes nerveux sympathique agissant principalement *via* les récepteurs α_1 adrénergiques et parasympathique, agissant principalement *via* les récepteurs cholinergiques. NA: noradrénaline. Ach: Acétylcholine. A noter : le stroma (zone noire) est formé d'un mélange de fibroblastes, de cellules musculaires lisses et de fibres protéiques de type collagène. (source : Bidaux Gabriel, 2006).

acini. Canaux et acini sont séparés du stroma essentiellement musculaire par une membrane basale fine et continue sur laquelle repose l'épithélium prostatique.

a. Les cellules épithéliales basales

Elles sont considérées comme le compartiment de réserve de l'épithélium prostatique. Ces cellules souches sont peu différenciées et permettent le renouvellement par différenciation des cellules luminales sécrétrices (Bonkhoff et al., 1994). Les techniques immunohistochimiques (utilisant les anticorps anticytokératines spécifiques) montrent que ces cellules forment une couche régulière et continue entre les cellules sécrétrices et la membrane basale et qu'elles expriment des marqueurs spécifiques comme les cytokératines 5 et 14 (van Leenders et al., 2001; van Leenders and Schalken, 2003). Les cellules basales sont androgéno-indépendantes (elles ne nécessitent pas d'androgènes pour leur prolifération et leur survie) et peuvent se différencier en cellules sécrétrices qui sont androgéno-dépendantes (elles nécessitent des androgènes pour leur prolifération et leur survie) (Isaacs and Coffey, 1989).

b. Les cellules épithéliales intermédiaires

Elles ne sont pas distinguables des autres cellules épithéliales d'un point de vue histologique car elles n'ont pas de critère de reconnaissance histologique ou clinique. Le concept de cellule intermédiaire est concevable pour une différenciation décrite comme un processus séquentiel et dynamique (Figure 3). Ainsi lors de leur différenciation en cellules épithéliales apicales, les cellules épithéliales basales acquièrent progressivement le récepteur aux androgènes (AR) ainsi que 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 ont le taux de prolifération le plus élevé du compartiment épithélial et sont définies sous le terme «transit amplifying cells» (Heer et al., 2006; Peehl, 2005), contrairement aux cellules intermédiaires plus tardives qui ne prolifèrent plus et qui expriment un fort taux de récepteurs aux androgènes fonctionnel induisant 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, le PSCA (Prostate Stem Cell Antigen) initialement caractérisé dans les cellules souches épithéliales, est exprimé dans les cellules intermédiaires et les cellules cancéreuses (Gu et al., 2000; Tran et al., 2002). Autre exemple, le modèle de souris KO pour PTEN (suppression courante dans les métastases de la prostate) développe des tumeurs qui expriment 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 permis d'éclaircir le concept du phénotype cancéreux longtemps décrit comme homologue à celui des cellules apicales matures.

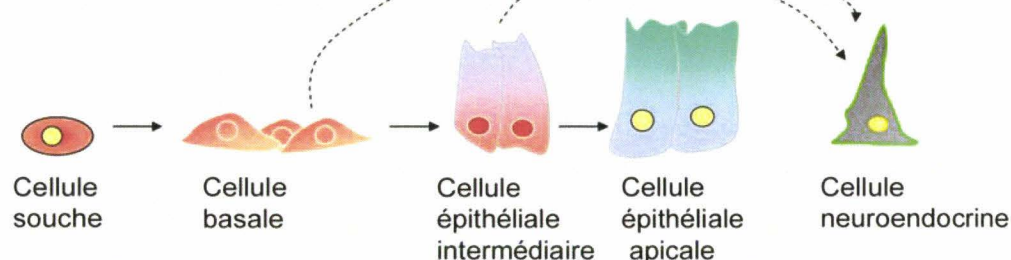


Figure 3: Représentation schématique de la différenciation cellulaire de l'épithélium prostatique. L'origine des cellules neuroendocrines dans les cas de cancers neuroendocrines purs reste mal définie (source : Bidaux Gabriel, 2006).

c. Les cellules épithéliales apicales

Encore appelées cellules luminales ou sécrétrices de la prostate (Figure 3), elles bordent la lumière des acini. Elles synthétisent et sécrètent les produits constitutifs du plasma séminal incluant l'antigène glycoprotéique spécifique de la prostate ou PSA (Prostate Specific Antigen) des phosphatases spécifiques de la prostate ainsi que des polyamines (Murphy et al., 1992). Ces cellules expriment le AR (Allsbrook and Simms, 1992; Ruizeveld de Winter et al., 1994) et sont dépendantes de son activation pour leur viabilité, le maintien de leur état différencié et leur capacité sécrétoire (Cunha et al., 1987; Isaacs, 1999).

d. Les cellules neuroendocrines

Elles représentent le dernier phénotype présent dans la prostate (Figure 3). Elles ont été mises en évidence pour la première fois en 1944 par Pretl (Herrero et al., 2002) grâce à une méthode de coloration argentique appelée coloration de Grimelius, qui révèle les granules neuroendocrines en brun foncé.

Elles sont dites neuroendocrines car elles possèdent certaines caractéristiques structurales, fonctionnelles et métaboliques similaires au neurone et aussi car elles produisent des substances semblables aux neurohormones et neurotransmetteurs tels que la calcitonine, la sérotonine ou le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide). D'autre part, elles expriment des marqueurs de type neuroendocrinien tels que la NSE (Neuron Specific Enolase), ainsi que la chromogranine A (Karlsson, 2001). Ces cellules renferment également des grains neurosécrétoires (par analogie avec les neurosécrétats hypothalamiques) et possèdent les caractéristiques APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) spécifiques aux cellules neuroendocrines. Cependant, leur rôle physiologique demeure encore mal connu.

- Localisation et morphologie : Leur présence au sein du tissu prostatique a été confirmée par Feyrter en 1951. Ces cellules sont dispersées dans tous les compartiments glandulaires de la prostate et représentent entre 0,5 et 2% du tissu prostatique (Aumuller et al., 2001). Après la naissance ou les cellules neuroendocrines sont présentes dans toutes les régions de la prostate, elles disparaissent de la région périphérique pour y réapparaître lors de la puberté (Cohen et al., 1993). Après la puberté, le nombre de cellules neuroendocrines atteint son maximum et le conserve entre 25 et 54 ans (Battaglia et al., 1994). Elles sont de deux types morphologiquement distincts : **le type « ouvert »** : Les cellules ont de longs prolongements dendritiques rejoignant la lumière des acini, **le type « fermé »** : sans extensions luminales. Elles ne possèdent pas de récepteurs aux androgènes et sont donc androgéno-indépendantes.

Aumüller et al, ont montré que les cellules neuroendocrines prostatiques suivent un processus migratoire commençant très tôt durant l'embryogenèse (Aumüller et al., 1999).

- **Les marqueurs neuroendocrines prostatiques** sont de deux types (Tableau 1):

* Hormonaux: Les plus couramment détectés sont la somostatine, la calcitonine et la GRP (Gastrin-Releasing peptide) homologue de la bombésine chez les mammifères.

* Non hormonaux: Avec la synaptophysine, le cytochrome b561, l'antigène lymphoréticulaire, les plus couramment utilisés pour l'identification des cellules neuroendocrines prostatiques sont la chromogranine et la NSE (Neuron-Specific Enolase).

La chromogranine est l'un des constituants majeurs des vésicules de sécrétion des cellules neuroendocrines (Blaschko et al., 1967). Elles appartiennent à la famille des granines mais leur fonction biologique demeure inconnue. Les chromogranines A et B peuvent lier de grande quantité de calcium suggérant un rôle dans l'homéostasie calcique et pourraient également agir de manière autocrine ou paracrine comme régulateur de la sécrétion ou encore servir de précurseur hormonal. Bien qu'elle ne soit pas toujours présente dans les cellules neuroendocrines prostatiques, la chromogranine A demeure la plus utilisée pour l'identification de ces dernières (Abrahamsson, 1999).

La NSE est détecté dans les neurones mais aussi dans les cellules neuroendocrines de nombreux organes (Schmechel et al., 1978). On distingue les énolases α , β et γ qui s'associent pour former des homo ou des hétérodimères. Pour exemple, la présence de la NSE hétérodimérique $\gamma - \gamma$ dans le neurone annonce la formation des synapses et l'acquisition des propriétés électriques. C'est également cette forme qui est détectée dans les cellules neuroendocrines.

- **Leur rôle physiologique** est encore méconnu mais certains travaux suggèrent que les cellules neuroendocrine participeraient au maintien des autres phénotypes. Ces cellules semblent intervenir aussi bien dans les activités physiologiques que pathologiques de la prostate et il a été suggéré qu'elles sont impliquées dans la régulation de la croissance et la différenciation prostatique en développement, mais aussi dans la régulation de la sécrétion de la glande mature, par analogie avec ce qui est connu dans d'autres organes à cellules neuroendocrines tels que les systèmes respiratoire, gastrointestinal et le pancréas (Cutz, 1982; Grube, 1986; Larsson, 1980; Speirs et al., 1993).

NEUROHORMONES

CT (calcitonine)
CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide)
Katacalcine
GRP (Gastrin-Releasing peptide)
Somatosatine
 α -HCG (Human Chorionic Gonadotropin)
TSH-like (Thyroid-stimulating hormone-like peptide)
PTHrP (ParaThyroid Hormone-related Protein)
CCK (CholeCystoKinin)
Sérotinine
Leu-enképhaline
B-endorphine
VIP (Vasoactive Intestinal Peptide)
NPY (Neuropeptide Y)
Neurotensine

MARQUEURS NEUROENDOCRINES

CgA (Chromogranine A)
CgB (Chromogranine B)
CgC (Chromogranine C)
NSE (Neuron Specific Enolase)
Synaptophysine
Cytochrome b561

REFERENCERS BIBLIOGRAPHIQUES

(Abrahamsson et al., 2000; di Sant'Agnese et al., 1989)
(di Sant'Agnese et al., 1989; Nagakawa et al., 2001)
(di Sant'Agnese et al., 1989)
(Nagakawa et al., 2001; Varvarigou et al., 2004)
(Krsek, 2003)
(Fetissof et al., 1987)
(Abrahamsson et al., 1986)
(Mosca et al., 2005; Nagakawa et al., 2001; Wu et al., 1998a)
(Cecio et al., 1993)
(Di Sant'Agnese and Cockett, 1994; Siddiqui et al., 2006)
(Nagakawa et al., 2001)
(Morales Martinez and Pedron, 1999)
(Nagakawa et al., 2001)
(Nagakawa et al., 2001)
(Cox et al., 1999; Vias et al., 2007)

REFERENCERS BIBLIOGRAPHIQUES

(DeLellis, 2001; Mosca et al., 2005; Takekoshi et al., 1999)
(Cussenot et al., 1998; Feldman and Eiden, 2003)
(DeLellis, 2001; Takekoshi et al., 1999)
(DeLellis, 2001; Shimizu et al., 2005)
(Akerstrom et al., 2005; DeLellis, 2001)
(DeLellis, 2001; Hook and Metz-Boutigue, 2002)

Tableau 1: Liste des principales neurohormones et des marqueurs neuroendocrines identifiés dans les cellules neuroendocrines prostatiques

C. ROLE PHYSIOLOGIQUE

La prostate intervient de différentes façons dans de nombreux processus physiologiques. D'une part, elle joue un rôle *sécrétoire* et ses produits de sécrétion composent notamment une partie du liquide spermatique. D'autre part, de par sa position péri-urétale, elle intervient de façon *mécanique* au niveau des processus urinaires (miction) et reproducteurs (éjaculations) grâce à un système de sphincters intraprostatiques.

1. Rôle sécrétoire de la prostate

La sécrétion de la glande prostatique qui est continue (0,5 à 2ml par 24 heures), joue un rôle de protection du tractus urogénital contre les agents pathogènes extérieurs et s'intensifie en période pré-éjaculatoire pour constituer une partie du plasma séminal (0,5 ml de liquide prostatique pour un éjaculat moyen de 3 ml (Mann, 1974), lequel représente le milieu optimal pour la survie et la locomotion des spermatozoïdes. La sécrétion prostatique légèrement acide (pH 6,4) renferme des ions (citrate, magnésium et zinc), du cholestérol, des phospholipides, des enzymes (phosphatase acide, protéase) et une polyamine, la spermine ou encore le PSA. La composition exacte des produits sécrétés est reportée dans le tableau 2.

<i>Composants</i>	<i>Taux moyen total</i>	<i>Éléments d'origine prostatique</i>
Electrolytes	980 mg / 100mL	Calcium (28 mg/100mL) Zinc (14 mg/100mL) Acide Citrique (376 mg/100mL)
Hydrates de carbone	302 mg / 100 mL	
Composés nitrés	754 mg / 100 mL	Spermine (273 mg/mL)
Prostaglandines	21 mg / 100 mL	
Protéines totales	4000 mg / 100 mL	
Acides aminés libres	1258 mg / 100 mL	
Autres :		
Cholestérol	103 mg / 100 mL	?
Acide sialique	124 mg / 100 mL	
Glutathione	30 mg / 100 mL	
Enzymes	11000-12000 U / mL	Phosphatases acides (400 U / mL) Leucine aminopeptidase (1173 U / mL) Diamine oxydase Alpha-amylase Proteinase seminale

Tableau 2: Composition du liquide séminal chez l'homme (Khoury, 1991; Khoury and Wright, 1991)

Le PSA, caractérisé dans plasma séminal humain en 1971, est découvert comme étant un produit de sécrétion prostatique mais également un marqueur exclusif de la prostate humaine, d'où son appellation (Stephan et al., 2002). Cette glycoprotéine de 33-34 kDa ressemble aux nombreuses protéases murines de la famille des kallikréines. Ses substrats dans le plasma séminal sont deux protéines sécrétées par les vésicules séminales : la fibronectine et la séménogéline, protéine provoquant la gélification du sperme. Bien qu'il n'y soit pas destiné, le PSA est observé dans la circulation sanguine, ce qui fait qu'actuellement, il reste le meilleur et le seul antigène disponible pour le diagnostic et la surveillance du cancer prostatique (Stamey et al., 1987). En effet, il a pu être établi une corrélation entre le taux de PSA plasmatique et le volume glandulaire de la prostate (Babaian et al., 1992).

Enfin, il est à noter que la prostate participe également, en tant que glande endocrine, à l'élaboration et la sécrétion des hormones stéroïdes et peptidiques.

2. Rôle mécanique de la prostate

Les deux sphincters (lisse et strié) urétraux intraprostatiques confèrent à la prostate un double rôle mécanique dans les processus mictionnels et éjaculatoires. Le système de sphincters permet tout d'abord, en association avec la vessie, de stocker les urines et d'assurer la continence. Cette fonction est assurée grâce notamment aux innervations végétatives et somatiques: le sphincter lisse permet la phase de remplissage du réservoir vésical *via* le système sympathique et l'évacuation des urines *via* le système parasympathique en association avec le relâchement du sphincter strié.

De plus, les sphincters et les fibres musculaires lisses de la prostate interviennent également au niveau des fonctions de reproduction: lors de l'éjaculation. Le sphincter lisse reste contracté pour empêcher l'éjaculation rétrograde dans la vessie, alors que le sphincter strié se relâche (les innervations étant les mêmes que pour la régulation de la miction).

La prostate intervient donc dans les processus de reproduction et de miction, grâce à un double contrôle glandulaire et musculaire : la gravité des conséquences d'un dérèglement anatomique ou fonctionnel de la prostate tel que l'on peut l'observer en cas d'hyperplasie bénigne ou de cancer est donc facilement compréhensible.

D. ROLE DES ANDROGENES

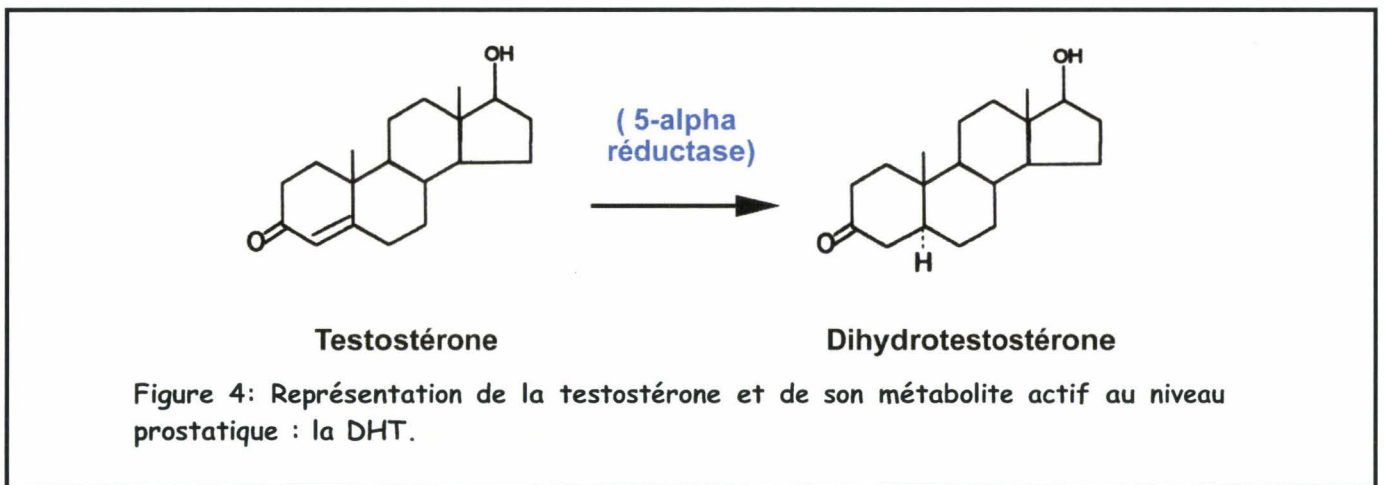
Les androgènes sont nécessaires au bon développement de la prostate car ils contrôlent la différenciation et la croissance de la prostate dès le développement embryonnaire.

1. Métabolisme des androgènes

Les androgènes représentent l'ensemble des hormones impliquées dans l'acquisition, le maintien et le fonctionnement des caractères mâles chez les individus. En effet, la castration avant la puberté empêche la prostate de se développer et d'atteindre sa maturité fonctionnelle. De plus, la castration après la puberté provoque une atrophie de la glande et un arrêt de l'activité sécrétoire. Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol et donc très hydrophobes ce qui leur permet de diffuser librement au travers des membranes cellulaires pour atteindre leurs récepteurs cytoplasmiques ou nucléaires des cellules. La production d'androgènes est régulée par l'axe hypothalamo-hypophyso-

gonatique. La gonadolibérine (GnRH ou LH-RH) est sécrétée de façon pulsatile au niveau de l'hypothalamus. Elle est responsable de la production de LH au niveau de la glande hypophysaire. La LH induit la production d'androgènes au niveau des cellules de Leydig.

L'androgène prépondérant chez l'individu mâle est la testostérone (Figure 4). Elle est synthétisée à 95% par les cellules de Leydig dans les testicules et à 5% par la glande cortico-surrénale 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. La simple administration de testostérone exogène à un animal ou un homme castré suffit à induire une reprise du développement pondéral de la prostate et de son activité sécrétoire. L'androgène actif des cellules épithéliales intermédiaires, apicales épithéliales matures ou musculaires lisses est la 5-alpha dihydrotestostérone (5α -DHT) représenté en figure 4. Elle est formée à partir de testostérone dans les cellules cibles par une enzyme cytoplasmique : la 5-alpha réductase de type II. 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.



2. Mode d'action des androgènes

Outre les contrôles physiologiques des androgènes intervenant par des effets génomiques via leur récepteur, il a également été montré que des effets non génomiques existaient.

a. Effets génomiques.

Ce mode d'action est sans conteste le plus connu (Figure 5). La 5α -DHT se lie au AR ce qui induit la translocation de ce dernier dans le noyau où il va réguler l'activité

transcriptionnelle de ses gènes cibles tel un facteur de transcription. La testostérone peut également se lier aux AR présents dans le cytoplasme et le noyau des cellules prostatiques mais elle est 3 à 10 fois moins efficace que la DHT car cette dernière plus stable une fois liée au récepteur (Partin and Coffey, 1994).

Le récepteur aux androgènes est une protéine de 90 kDa appartenant à la super famille des récepteurs aux stéroïdes (Beato and Sanchez-Pacheco, 1996). Il se compose de 919 acides aminés, formant trois domaines : un domaine activateur de transcription, un domaine de liaison à l'ADN possédant deux doigts de zinc lui octroyant une forte affinité pour une séquence nucléotidique spécifique aussi appelée « Androgen Response Element » (Marengo and Chung, 1994) et un domaine de liaison au ligand qui se trouve dans la partie C-terminale du récepteur (Prinsloo and Van Aswegen, 2000).

Une fois liée au ligand, le récepteur s'homodimérise et peut ainsi se lier aux gènes androgéno-dépendants au niveau des séquences ARE et recruter de multiples facteurs de transcription. Les gènes androgéno-dépendants possèdent souvent plusieurs ARE répartis sur la région du promoteur du gène. Les gènes prostatiques androgéno-dépendants les plus connus sont codant pour le PSA et la probasine. Cependant, de nombreux autres gènes sont sous contrôle de la voie des androgènes (pour revue, voir (Dehm and Tindall, 2006).

Le récepteur des androgènes est donc un élément déterminant pour le transcriptome et pour le phénotype des cellules androgéno-dépendantes. Néanmoins, l'activité de ce récepteur est modulée par de nombreux facteurs ou coactivateurs. L'expression de ces derniers fluctue au cours de l'oncogénèse prostatique entraînant une régulation différentielle des gènes cibles du AR (Mestayer et al., 2003).

b. Effets non génomiques.

Ces effets non génomiques des androgènes correspondent, par définition, à une action des androgènes par liaison ou non avec leur récepteur pouvant déclencher des effets biologiques sans action sur la régulation transcriptionnelle. Connus depuis 1982 (Orsini, 1982), les effets non génomiques (ou non géotropiques) des androgènes restent peu étudiés et donc moins explicités que les effets génomiques (Figure 5). La première caractéristique de ces effets est leur cinétique. Contrairement, aux effets génomiques qui sont détectables après plusieurs minutes (voire quelques heures), les effets non génomiques sont très rapides et déclenchent des réactions en l'espace de quelques secondes. L'autre caractéristique de ces effets est qu'ils ne nécessitent pas de maturation préalable des stéroïdes par des aromatasés.

Ainsi, la testostérone induit des effets non génomiques plus importants que ceux produits par la 5 α -DHT.

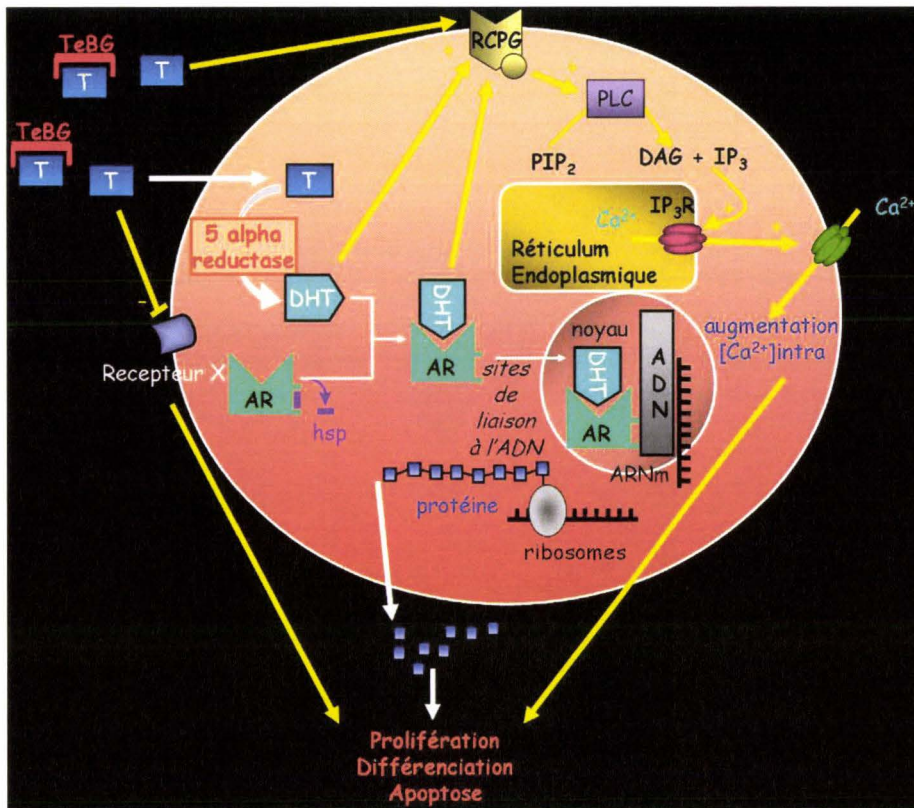


Figure 5: Schématisation des effets génomiques et non génomiques des androgènes.

Dans le cadre des effets génomiques « lents » (flèches blanches), la testostérone plasmatique (T) est liée à 98 % à la Testostérone-Binding Protéin (TeBG). Seule la testostérone libre traverse la membrane plasmique, pour être transformée en 5-alpha dihydrotestostérone (DHT) par la 5-alpha réductase. La fixation de la DHT au AR (Récepteur aux Androgènes) dans le cytoplasme des cellules cibles, provoque la libération d'un complexe protéique (hsp) libérant le site de fixation à l'ADN du AR. Le AR migre vers le noyau, et active les gènes de réponse aux androgènes.

Dans le cadre des effets non génomiques « rapides » (flèches jaunes) les androgènes seuls ou liés à AR peuvent activer ou inhiber différentes voies comme celle de l'entrée de calcium par activation d'un récepteur membranaire couplé aux petites protéines G (GPCR) conduisant à l'activation de la voie PLC (Estrada et al., 2006). Des études montrent que la testostérone peut inhiber le canal calcique voltage-dépendant de type-T dans les cardiomyocytes de rat (Michels et al., 2006) ou le canal calcique voltage-dépendant de type-L dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Hall et al., 2006). Dans la prostate, des études montrent que sous l'action des androgènes, AR interagit directement avec le récepteur à l'EGF et diminue son autophosphorylation (Bonaccorsi et al., 2006) conduisant à une diminution de l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate (Bonaccorsi et al., 2004).

Au final, ces effets génomiques et non génomiques modulent les processus cellulaires (prolifération, apoptose, ...)

II. CANCERS PROSTATIQUES ET TRAITEMENTS

La prostate est le siège de trois affections principales : la prostatite (inflammation d'origine bactérienne), l'adénome (hyperplasie bénigne des épithélia) et l'adénocarcinome (cancer de l'épithélium). Ces pathologies prostatiques peuvent toucher l'homme jeune (prostatite aiguë) mais aussi et surtout l'homme à partir de 40-50 ans. Il est à noter que la prostatite, comme l'adénome, ne favorisent pas l'apparition d'un cancer et que les trois pathologies peuvent coexister chez un même individu. Par souci de clarté, nous ne traiterons que du cas du cancer prostatique.

A. LE CANCER DE LA PROSTATE

1. Epidémiologie du cancer de la prostate

Avec plus de 40 000 nouveaux cas déclarés et environ 10 000 décès par an en France (Remontet et al., 2003), le cancer de la prostate, pathologie généralement sporadique et la plus fréquente chez les hommes de plus de 50 ans, représente la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme après celui du poumon. En France, en 1994, 95 % des cas de cancers prostatiques ont été diagnostiqués entre 57 et 88 ans, l'âge moyen de découverte de cette pathologie étant de 73 ans (Richard, 1994), mais certains hommes sont atteints à un âge bien plus précoce.

Dans les pays développés, l'incidence du carcinome de la prostate croît exponentiellement avec l'âge (Figure 6). L'augmentation de 23% de la mortalité liée au cancer prostatique, dans les vingt dernières années, reflète l'allongement de l'espérance de vie des sociétés occidentales, mais il est aussi vraisemblable de penser que cette croissance importante de la maladie soit également due à l'essor de nouveaux moyens diagnostiques.

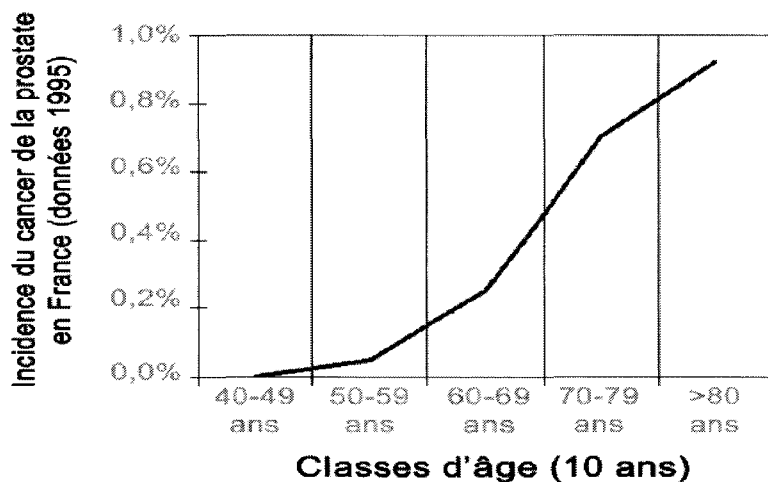


Figure 6 : évolution de l'incidence du cancer de la prostate en fonction des classes d'âges dans la population masculine française (source : Dr A. De La Taille, 1995).

Enfin, outre l'allongement de l'espérance de vie, il a été recensé un certain nombre de facteurs de risque influençant sur l'apparition et/ou l'évolution du cancer.

2. Facteurs de risque

a. Les facteurs familiaux héréditaires

Dans 80 % des cas, le cancer survient de manière sporadique. Un facteur génétique familial n'est retrouvé que chez 20 % des malades et dans 5 % des cas, la transmission du cancer est autosomique dominante (Latil and Lidereau, 1998). Selon le nombre de parents du premier degré qui sont atteints d'un cancer prostatique, le risque de cancer pour un homme de la famille est de 2 à 5 fois celui d'un homme sans antécédents familiaux (Fournier et al., 2004; Ghadirian et al., 1997; McLellan and Norman, 1995).

b. Les facteurs environnementaux

Un régime à teneur élevée en calories, riche en graisses et en viandes serait favorable au cancer de la prostate (Pienta and Esper, 1993). Le bêta-carotène et le lycopène, précurseurs de la vitamine A auraient un rôle protecteur tout comme la vitamine E et D, et le sélénium ; les extraits d'isoflavanoïde de soja ont montré expérimentalement un pouvoir inhibiteur sur la croissance de lignées tumorales prostatiques (Wisard and Leisinger, 2006). Cependant, les résultats semblent contradictoires et l'efficacité de certains « traitements alimentaires » est contestée et demeure sujet à débat (Canene-Adams et al., 2007; Jatoi et al., 2007). Les modes alimentaires pourraient donc expliquer la faible incidence du cancer de prostate parmi les populations asiatiques (Morton et al., 1997). Ainsi au Japon pour une classe d'âge allant de 35 à 64 ans, l'incidence du cancer est 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 deux fois supérieure à celle de la population blanche.

L'alcool, un temps suspecté, ne semble pas avoir d'influence sur ce type de cancer (Breslow and Weed, 1998). De la même manière, aucune étude à ce jour ne semble pouvoir confirmer un quelconque effet du stress.

Plus étrange, l'exposition au soleil pourrait jouer un rôle protecteur (Luscombe et al., 2001). En interrogeant plus de 200 hommes victimes de cancer de la prostate, il apparaît que les hommes ayant subi les plus fortes expositions aux ultraviolets sont atteints de la maladie plus tardivement, en moyenne 5 ans plus tard.

3. Origine cellulaire et développement du cancer prostatique

a. Origine cellulaire du cancer prostatique

La croissance normale de tissus, y compris les tissus prostatiques, est maintenue grâce à un équilibre entre le taux de prolifération cellulaire et le taux d'apoptose ou MCP (Mort Cellulaire Programmée). Le concept selon lequel un déséquilibre de cette balance de croissance est responsable de la cancérogenèse prostatique a émergé au milieu des années 90, grâce à des études cinétiques de la croissance de la prostate (Berges et al., 1995; Tu et al., 1996). Cette cancérogenèse prostatique est un processus alliant mutations géniques, modifications phénotypiques et sélection clonale. La principale caractéristique de cette transformation est d'augmenter la résistance à l'apoptose des cellules de la prostate (Berges et al., 1995; Denmeade et al., 1996; Kyprianou et al., 1997).

Au cours de l'évolution du cancer vers les stades les plus avancés, les cellules se différencient et acquièrent des mutations pro prolifératives (Amirghofran et al., 2004). Donc des défauts dans les mécanismes d'apoptose et de prolifération sont impliqués dans l'émergence des tumeurs prostatiques.

Le dernier stade de la cancérisation voit le développement de métastases migrant, en majorité, dans les ganglions lymphatiques proximaux et dans le tissu osseux.

La nature des cellules à l'origine du cancer n'est pas clairement définie et deux hypothèses s'opposent. L'adénocarcinome serait dû :

- soit à la transformation des cellules épithéliales apicales ce qui stipule donc que les cellules apicales sécrétrices acquièrent un pouvoir prolifératif.
- soit à la transformation des cellules souches épithéliales ce qui stipule que des dérégulations du cycle cellulaire des cellules souches basales et/ou des cellules apicales intermédiaires puissent induire une hyperprolifération de l'épithélium sans forcément exclure le maintien de la différenciation apicale des cellules luminales.

Le phénotype des cellules cancéreuses prostatiques correspond en majorité à celui des cellules apicales matures (van Leenders and Schalken, 2003) cependant dans certains cas de cancer des cellules apicales intermédiaires sont également présentes avec parfois l'expression de marqueurs de cellules souches comme le « Prostate Stem Cell Antigen » (PSCA) (Gu et al., 2000; Wang et al., 2006).

b. Développement du cancer prostatique

Le cancer de la prostate se développe souvent très lentement et reste localisé dans les premiers stades de la maladie d'où une qualification de cancer « silencieux » ou « sournois ». La plupart des cancers se développent dans la zone périphérique de l'organe, environ 15% dans la zone transitionnelle et 5% dans la zone centrale. Initialement, les cycles de division cellulaire et de prolifération tumorale sont lents avec une vitesse de doublement du foyer pouvant atteindre plusieurs années. Le fait que ces foyers cancéreux se développent à la périphérie de la glande explique le caractère sournois de cette pathologie dont les débuts s'accompagnent de très peu de signes fonctionnels, notamment mictionnels. Le diagnostic de ce cancer est généralement basé sur un toucher rectal, un dosage du PSA circulant (plus de 4ng/ml de PSA total circulant est associé à un risque tumoral), 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 sur lesquels nous reviendrons au point suivant (cf. I. E. 4.). 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.

Quand le cancer évolue, il peut s'étendre en dehors de la prostate par envahissement des tissus et organes proches de la prostate ou par envahissement d'organes à distance (os, ganglions, etc.) formant ainsi des métastases. On parle alors de cancer non localisé de la prostate. Le cancer prostatique est, comme tous les cancers glandulaires, un adénocarcinome dans plus de 95% des cas sous influence des hormones sexuelles mâles et donc sous contrôle des androgènes.

4. Rôle des androgènes dans le développement du cancer prostatique

La découverte de l'androgéno-dépendance du développement normal de la prostate humaine est à la base de travaux tentant de mettre en évidence le rôle des androgènes, de la 5 α -DHT plus précisément, dans la cancérogenèse de la prostate (Huggins and Hodges, 2002). Il est établi que les hommes castrés avant la puberté ne développent pas de cancer prostatique. De plus, les travaux de Huggins et Hodges en 1941 ont montré les bénéfices de la castration chez les patients atteints de cancer prostatique. La privation androgénique induit, entre autre, l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses chez le rat (Kyprianou and Isaacs, 1988).

En outre, il est montré que le développement des cancers peut s'accompagner d'une augmentation d'expression du AR et/ou des mutations conduisant à l'activation de cette protéine. Il a été montré que des souris qui le surexpriment développaient des néoplasies mais

pas d'adénocarcinomes (Stanbrough et al., 2001). Bien que stimulant la prolifération d'une lignée cancéreuse prostatique en culture (Zegarra-Moro et al., 2002), le AR n'a pas pour rôle primaire que le contrôle de la prolifération. En fait, le pouvoir oncogénique du AR proviendrait de la synergie d'action avec d'autres gènes régulant la prolifération (ex : *myc* et la famille *ets*). En effet, il a été montré que le 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).

5. Différenciation neuroendocrine dans le cancer prostatique

Depuis quelques années, la différenciation neuroendocrine représente un intérêt considérable car, dans le cancer de la prostate, elle semble être associée à un pronostic clinique très défavorable.

Souvent les cancers prostatiques présentant une différenciation neuroendocrine sont caractérisés par la présence de foyers de cellules neuroendocrines au sein de cellules malignes non neuroendocrines. A l'heure actuelle, la différenciation neuroendocrine dans le cancer de la prostate est associée à un pronostic clinique très défavorable. En effet, l'évolution de la prostate vers un phénotype cancéreux s'accompagne d'une augmentation du nombre de foyers de cellules neuroendocrines (Cohen et al., 1991; di Sant'Agnese and Cockett, 1996; Tarle et al., 1994). Les cellules neuroendocrines représentent d'ailleurs un index de l'évolution du cancer : dans le cas d'un sujet atteint d'un cancer prostatique présentant une différenciation neuroendocrine (par multiplication de ces cellules), le taux de survie après six ans est inférieur à 6 %, alors qu'il atteint 96 % dans le cas des cancers sans différenciation neuroendocrine.

6. Le cancer neuroendocrine pur

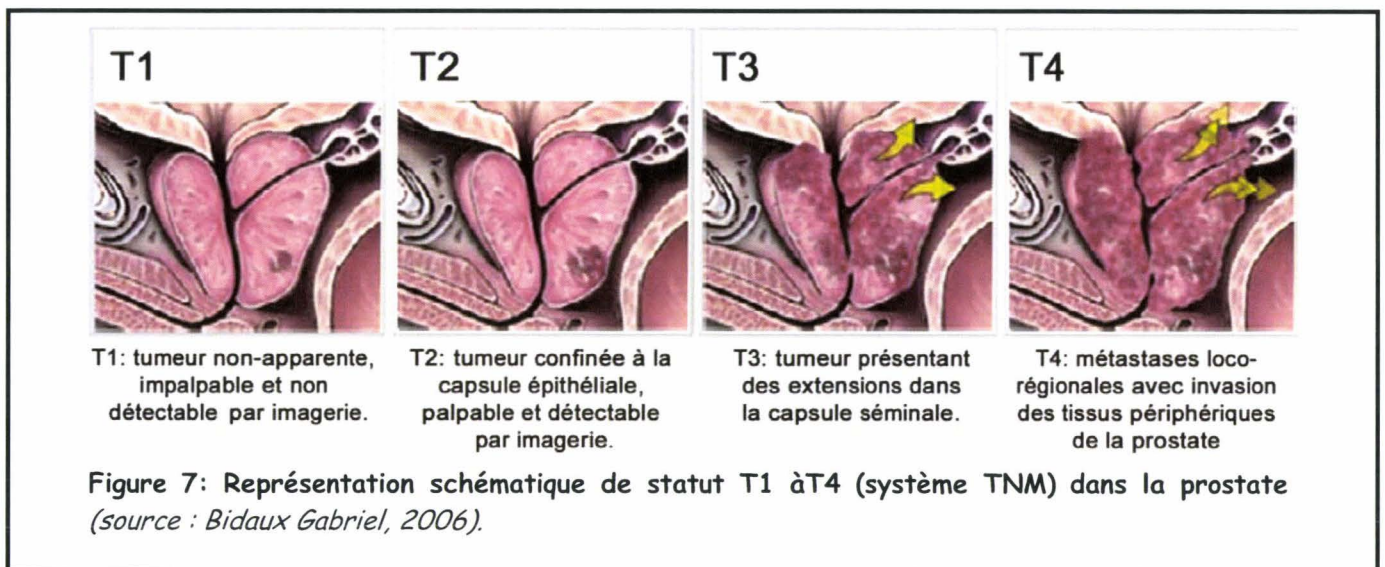
Une étude démontre que la transformation spécifique des cellules neuroendocrines de la prostate saine provoque l'apparition d'un cancer neuroendocrine pur (Garabedian et al., 1998). Cette pathologie rare (<5% de tous les cancers de la prostate) touche les sujets plus précocement que l'adénocarcinome (entre 30 et 40 ans). Elle 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 sont sans effets.

B. CLASSIFICATION ONCOLOGIQUE

Le système Tumeur, Node, Metastasis (TNM) et le score de Gleason sont couramment utilisés pour classer les cancers en fonction de leur degré oncologique. Le premier évalue la localisation et la taille de la tumeur et le second prend en compte l'état de différenciation du tissu cancéreux.

1. Le système TNM

Ce système, développé en 1977 par Ammon et coll (Ammon et al., 1977), évalue la taille de la tumeur et son degré d'extension aux tissus avoisinants et aux autres organes (Figure 7).



Le stade T correspond à l'extension de la tumeur primitive.

- **Les différents stades infra-cliniques (T1)** équivalent à des tumeurs impalpables et difficilement détectables par échographie. De nombreux foyers cancéreux resteront latents (Stade T1A) et d'autres évolueront localement, sans provoquer de trouble clinique, et sans être détectable au toucher rectal (Stades T1B et C).
- **Le stade clinique intracapsulaire (T2)** équivaut à des tumeurs plus étendues mais confinées à la capsule épithéliale. Ces tumeurs sont détectables par palpation et peuvent être prélevées par une aiguille à biopsie.
- **Le stade de franchissement de la capsule prostatique (T3)** équivaut aux cellules malignes du foyer cancéreux intraprostatique se développant par contiguïté vers les espaces périprostatiques à travers la capsule, et vers les vésicules séminales.

- **Le stade métastatique (T4)** définit les métastases gagnant les organes périphériques. Ce stade ultime est donc le point de départ de la dissémination métastatique vers les ganglions du petit bassin, vers les organes et, le plus souvent, vers les os.

Le stade N correspond à la présence ou non de métastases ganglionnaires. N0 définit l'absence d'envahissement lymphatique et N3 la taille tumorale et la distance de propagation les plus élevées.

Le stade M décrit l'absence ou la présence de métastases à distance, M0 correspondant à l'absence de métastases, M1 à la présence de métastases dans les organes comme les os, les poumons, le foie et ou le cerveau.

2. 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 permet d'identifier le stade du cancer selon son état de différenciation, et selon 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 8). Il est noté de 2 à 10, 2 représentant les cancers les plus différenciés, et 10 les plus indifférenciés, c'est à la dire les plus graves.

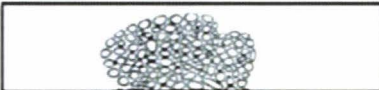




	1	Petites glandes uniformes, avec modifications mineures des noyaux des cellules.
	2	Acini de tailles moyennes et plus rapprochés mais sans disruption de la lame basale.
	3	Tailles et morphologies des acini très variables avec invasion du stroma et des structures périphériques comme les vésicules séminales.
	4	Cellules atypiques envahissant les tissus périphériques.
	5	Zones cancéreuses indifférenciées, invasion accentuée.

Figure 8: Caractérisation du grade de Gleason par l'étude morphologique des tissus (Gleason and Mellinger, 1974).

C. LES THERAPEUTIQUES DU CANCER

Il existe deux types de traitements utilisés contre le cancer prostatique : les traitements curatifs et les traitement palliatifs. Le traitement curateur consiste en une prostatectomie

chirurgicale, ou en une radiothérapie externe. Le traitement palliatif lui comprend le traitement hormonal, la radiothérapie externe, mais également le traitement des complications et des métastases. Il est à noter qu'il n'existe actuellement aucune chimiothérapie ayant fait la preuve de son efficacité. En effet, les cellules cancéreuses prostatiques sont connues pour leur faible taux de prolifération, et les agents chimiothérapeutiques actuels sont impuissants.

1. Traitements curatifs

La prostatectomie radicale est une technique chirurgicale visant à enlever la totalité du tissu pathologique prostatique et est utilisée dans les traitements du cancer. Enfin, la radiothérapie externe qui est utilisée dans les cas de cancer permet par irradiation de détruire des tissus ciblés (Larre et al., 2007). Bien que le traitement le plus utilisé reste la prostatectomie radicale par chirurgie dans les cas de cancer, l'utilisation de traitements palliatifs peut s'avérer plus adéquate dans certaines configurations.

2. Traitements palliatifs

Les traitements palliatifs visent avant tout à réduire le taux des androgènes circulants ou à empêcher leur action par hormonothérapie. En effet, il est fermement établi que les androgènes régulent la croissance des cellules prostatiques (Feldman and Feldman, 2001). Dans la plupart des cas, les thérapeutiques anti-androgéniques sont :

- **Des inhibiteurs de la 5 α - réductase** (finastéride) : La 5 α - réductase est l'enzyme responsable de la transformation de la testostérone en son métabolite actif : la 5 α -DHT au niveau prostatique (Andriole et al., 2004; Thorpe et al., 2007).

- **La castration ou rétrocontrôle chimique**, qui va diminuer les taux sériques d'androgènes grâce à des analogues de la LH-RH ce qui permet de réduire la synthèse de testostérone par les testicules en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire qui régule cette synthèse (Soga and Sugimura, 2007).

- **L'utilisation des oestrogènes** constitue une autre façon de provoquer un arrêt de synthèse de testostérone par les testicules par inhibition de la sécrétion hypophysaire de LH (Fluchter et al., 2007).

- **Les antagonistes des androgènes** (avec les stéroïdiens : Androcur®, Cyprostat® Megace® et les non stéroïdiens : Eulexin® Nilandron® Casodex®) quant à eux ont pour but d'empêcher l'action des androgènes au niveau des organes cibles en se liant à leurs récepteurs de façon compétitive (Baltogiannis et al., 2004; McLeod, 1993).

Le retrait des androgènes entraîne l'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.

F. EVOLUTION DU CANCER PROSTATIQUE VERS L'ANDROGENO-INDEPENDANCE

Comme nous l'avons vu, les traitements actuels utilisés contre le cancer de la prostate consistent en l'inhibition des effets des androgènes circulants. Cependant, il est fréquent que, soumis à ces traitements, le cancer prostatique acquière la capacité de se développer indépendamment des androgènes. Ces cancers dits hormono-indépendants sont très agressifs et échappent à tout traitement actuellement connu.

1. Le récepteur aux androgènes

L'échappement hormonal consiste en une perte de la régulation du AR et à la prévalence des régulations dites ligand indépendantes.

Au niveau phénotypique, lorsque les cancers évoluent vers l'androgéno-indépendance, le phénotype intermédiaire devient majoritaire (van Leenders et al., 2002; van Leenders et al., 2001). Au niveau moléculaire, l'échappement hormonal peut s'expliquer soit par :

- Une amplification génique du AR augmentant donc son expression
- Un changement de régulation du gène au niveau de son promoteur
- Des mutations du récepteur entraînant une activation constitutive indépendante du ligand ou une perte de spécificité du récepteur pour son ligand (Gioeli, 2005).

2. Les autres facteurs

L'échappement hormonal s'accompagne également souvent d'une évolution de la sécrétion paracrine vers la sécrétion autocrine de nombreux autres facteurs. En effet, il a été montré l'existence de croisements entre les voies de signalisation liées aux récepteurs aux androgènes et celles activées par les facteurs de croissance. 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 le AR de manière ligand-indépendante (Fong et al., 1992a; Montano and Djamgoz, 2004; Prewett et al., 1996).

Outre les facteurs de croissance et les récepteurs tyrosine kinase, il a été reporté que l'IL-6 (Interleukin-6) et la cycline E pouvait stimuler le AR de manière ligand-indépendante (Hobisch et al., 1998; Sadar and Gleave, 2000).

Enfin, il a été montré que les lysophospholipides, plus particulièrement le LPA (acide lysophosphatidique), permettait la survie des cellules androgéno-indépendantes par activation des voies NFkappaB et du récepteur tyrosine kinase (Kue et al., 2002; Raj et al., 2004).

Bien que le AR ait une importance dans la progression du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance (Buchanan et al., 2001; Zegarra-Moro et al., 2002), il semble y avoir différents mécanismes indépendants du AR. Ceci pourrait être le cas de la différenciation neuroendocrine du cancer de la prostate.

3. La différenciation neuroendocrine

Lors de l'évolution de la prostate vers un phénotype cancéreux androgéno-indépendant, il a été montré que le nombre de foyers de cellules neuroendocrines augmentait encore par rapport au cancer androgéno-dépendant (Cohen et al., 1991; di Sant'Agnese and Cockett, 1996; Tarle et al., 1994). De nombreuses études suggèrent l'implication des cellules neuroendocrines dans l'évolution du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance par production de neurohormones à activité mitotique (Cox et al., 1999; Farini et al., 2003; Hansson and Abrahamsson, 2001).

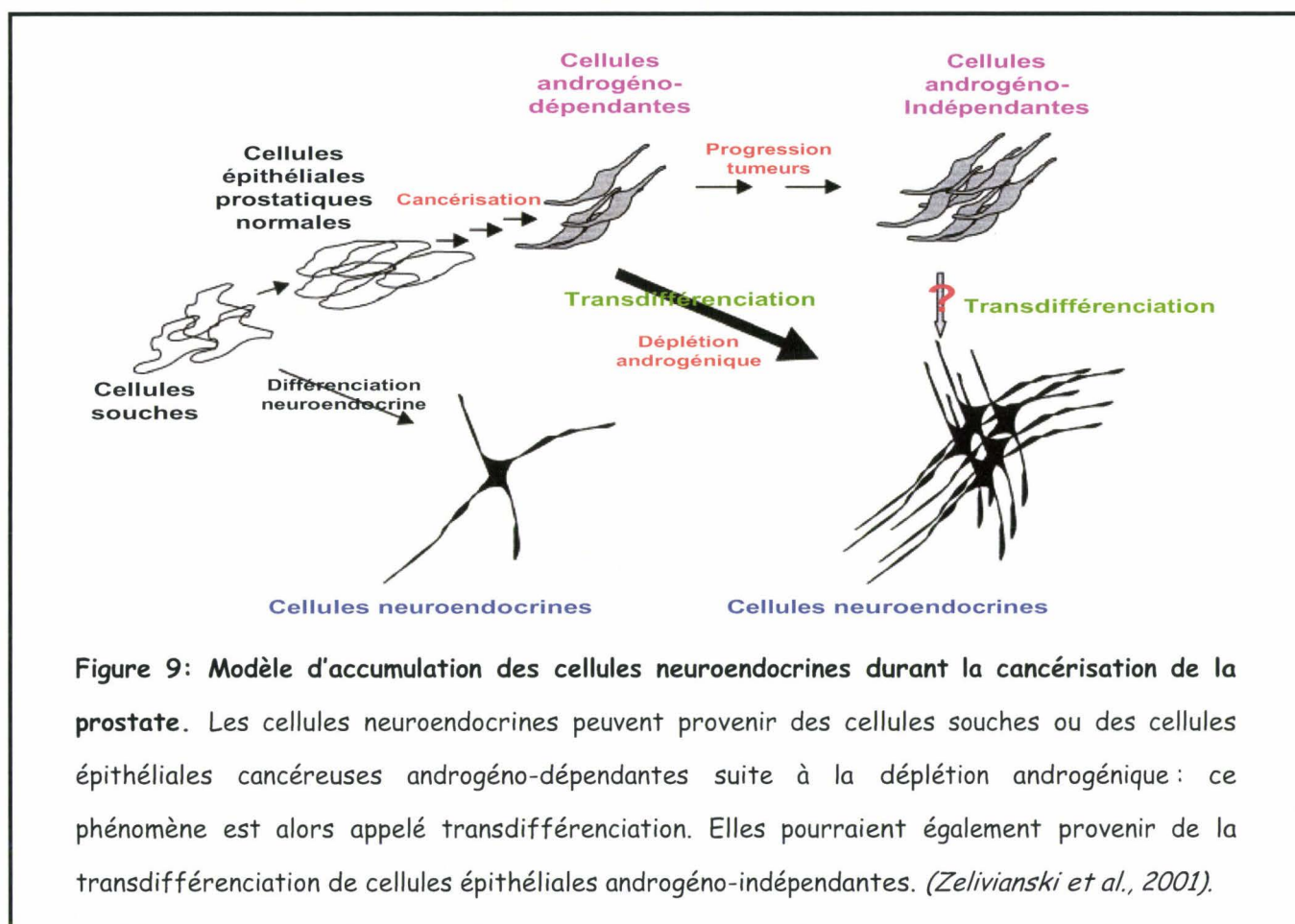
La présence de ces foyers de cellules neuroendocrines malignes dans un cancer prostatique pourrait s'expliquer de différentes façons et est représentée par la figure 9.

La première théorie consiste en l'existence de microenvironnements localisés responsables de la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses. Les cellules neuroendocrines saines et malignes n'expriment pas le AR (Krijnen et al., 1993). Les cellules tumorales neuroendocrines insensibles à l'hormonothérapie peuvent donc proliférer et remplacer les cellules androgéno-dépendantes éliminées par le traitement. Dans ce sens, il a été montré que des patients traités par des thérapeutiques anti-androgéniques présentaient une augmentation du nombre de cellules neuroendocrines (Abrahamsson, 1999). Ainsi, le cancer dans sa globalité tend à devenir androgéno-indépendant.

La seconde théorie postule que les cancers présentant une différenciation neuroendocrine pourraient être dus à une stimulation paracrine des cellules neuroendocrines saines. Ces dernières sécrètent des hormones régulées par des oncogènes. Lorsque ces oncogènes sont dérégulés, la sécrétion paracrine des hormones augmente ce qui rend ces cellules tumorales (Cockett et al., 1993). En accord avec cette hypothèse, une croissance

tumorale pourrait être due à un dysfonctionnement de sécrétion ou de régulation des récepteurs ou des voies de signalisation des neuropeptides.

Enfin, il a été proposé qu'en réponse à une transformation maligne, une cellule épithéliale ou basale développerait des caractéristiques neuroendocrines « dormantes » d'abord par perte du AR lors des premières phases du cancer puis par terminaison de la différenciation neuroendocrine lors de la progression tumorale (Abrahamsson, 1999). La prolifération et la progression de ces cellules seraient assurées par des mécanismes autocrine/paracrine acquis lors de leur différenciation neuroendocrine. Il est à noter que certaines publications 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 de 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).



Cependant, les études concernant un rôle de la différenciation neuroendocrine comme pronostic clinique défavorable restent contradictoires (Aprikian et al., 1993; Quek et al.,

2006). Ainsi, des travaux montrent que le grade de la tumeur et la présence de métastases sont fortement liées avec la différenciation neuroendocrine de la tumeur et le pourcentage de survie (McWilliam et al., 1997) alors que d'autres études ne trouvent aucune corrélation entre différenciation neuroendocrine et grade de la pathologie ou pourcentage de survie (Abrahamsson et al., 1998; Bubendorf et al., 1996; Cohen et al., 1994; Noordzij et al., 1995). Ceci peut s'expliquer par un nombre d'études sur des prélèvements prostatiques encore assez limités et des techniques d'études différentes. Les mesures de différenciation neuroendocrine du cancer prostatique à partir de prélèvements sanguins de patients représentent un indicateur plus représentatif pour quantifier celle-ci. Ainsi, il a été montré une corrélation entre taux sérologique de NSE et de CgA, taux sérologique de produits de neurosécrétion et l'androgéno-indépendance (Kadmon et al., 1991; Tarle and Rados, 1991). Le marquage sérologique semble donc être plus fiable au niveau du pronostic que le marquage tissulaire.

Conclusion

La différenciation neuroendocrine du cancer prostatique a donc différentes origines. L'évolution vers l'androgéno-indépendance du cancer prostatique résulterait de phénomènes exclusifs ou concomitants comme la perte du AR de cellules épithéliales devenant neuroendocrines et/ou du développement des cellules neuroendocrines malignes déjà présentes pouvant influencer les cellules voisines par leurs sécrétions.

III. IMPLICATION DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE PROSTATIQUE

L'évolution du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance se traduit par la capacité des cellules à survivre indépendamment du stroma grâce à l'intervention de facteurs non androgéniques parmi lesquels les facteurs de croissance tiennent un rôle important.

Les facteurs de croissance en se liant à leurs récepteurs jouent un rôle prépondérant dans la régulation normale de la croissance cellulaire par activation transmembranaire, puis une cascade de phénomènes cytoplasmiques aboutissant par exemple à la transcription de gènes spécifiques d'une ou de plusieurs protéines. Les facteurs de croissance produits soit directement sous leur forme active, soit sous forme de précurseurs clivés en polypeptides définitifs peuvent agir de manière paracrine ou autocrine contrairement aux hormones sécrétées agissant de manière endocrine (Figure 10).

Les gènes codant pour les facteurs de croissance et leurs récepteurs sont appelés proto-oncogènes. Leur perturbation aura des répercussions sur l'expression des facteurs de croissance, provoquant une croissance cellulaire anarchique conduisant le tissu concerné vers l'hyperplasie ou la néoplasie. A ce titre, le rôle des facteurs de croissance dans les pathologies prostatiques a été étudié (Roznovanu et al., 2005).

A. FACTEURS DE CROISSANCE

Les facteurs de croissance sont des glycoprotéines (molécules composées de sucres et de protéines) de faible poids moléculaire (6 à 30 kDa) régulant la croissance et de nombreuses fonctions cellulaires, par fixation sur leurs récepteurs spécifiques cellulaires de haute affinité. Il existe des facteurs différents, tous désignés par les mots growth factor (facteur de croissance) auxquels s'ajoute le nom du tissu sensible à leurs effets stimulants (Patt and Houck, 1983).

Ainsi, par exemple, le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (Alvarez et al., 2006) est spécifique des plaquettes sanguines, le NGF (Nerve Growth Factor) influe sur la croissance et la différenciation des neurones (Heese et al., 2006). L'EGF (Epidermal Growth Factor) influe sur le développement de l'épiderme de la peau (Huang et al., 2001) et le FGF (Fibroblast Growth Factor) sur celui des fibroblastes (Tassi and Wellstein, 2006).

En somme les facteurs de croissance font partie des cytokines ; ils agissent par des récepteurs cellulaires qui leur sont spécifiques. Ils peuvent activer des oncogènes inducteurs d'une hyper-prolifération tissulaire par dérégulation des protéines stimulant la prolifération.

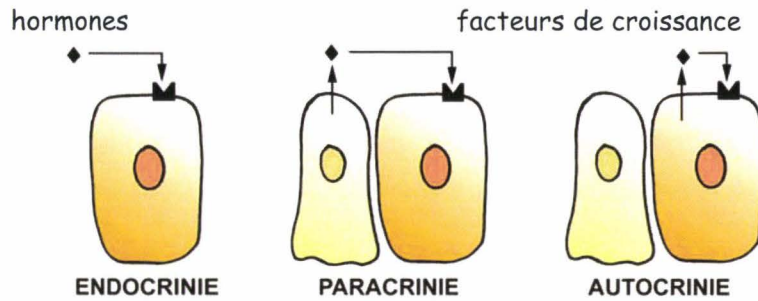


Figure 10: Schématisation des modes de stimulation par les hormones et facteurs de croissance.

Contrairement aux hormones sécrétées de manière endocrine, à distance du tissu effecteur, la plupart des facteurs de croissance agissent de manière « paracrine », c'est-à-dire que le facteur est sécrété par une cellule autre que la cellule stimulée et agit sur des cellules voisines. Il est dit « autocrine » dans le cas de cellules sécrétant le facteur qui stimule ses propres récepteurs. (source : Legrand Guillaume, 2002)

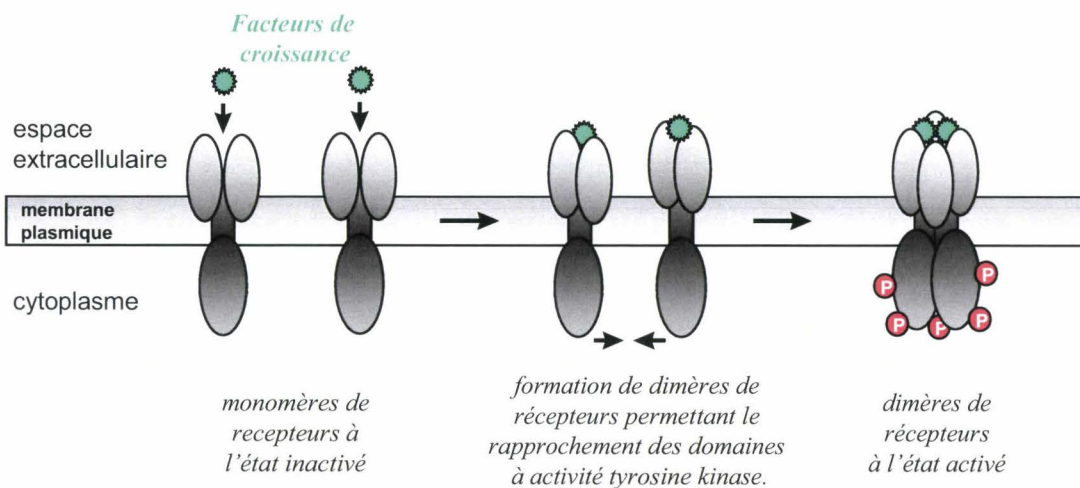


Figure 11: Activation des récepteurs aux facteurs de croissance

A l'état inactivé, les monomères de récepteurs peuvent lier des facteurs de croissance sur leur domaine extracellulaire. La fixation de ceux-ci entraîne la formation de dimères de récepteurs induisant le rapprochement des domaines cytoplasmiques et leur activation mutuelle, via leurs domaines tyrosine kinase par autophosphorylation. (source : Legrand Guillaume, 2002).

B. LES RECEPTEURS AUX FACTEURS DE CROISSANCE

Les récepteurs des facteurs de croissance (non hématopoïétiques) sont formés d'une chaîne glycoprotéique (deux dans le cas du récepteur de type insuline) transmembranaire, ayant un domaine protéique extracellulaire de liaison avec le facteur de croissance (le ligand), et un domaine intracellulaire d'action. Il a été mis en évidence par Ushiro et Cohen (Ushiro

and Cohen, 1980) que ces récepteurs possédaient généralement une activité tyrosine kinase stimulée par « autophosphorylation » après la liaison du ligand à son récepteur et la formation de dimères ou d'oligomères de récepteurs générée par cette liaison, ce qui permettait au final la traduction du signal (Figure 11) (Gouni-Berthold and Sachinidis, 2004; Tarnawski, 2005). La séquence aminée du domaine extracellulaire du récepteur est connue pour un grand nombre de facteurs de croissance. Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont regroupés selon leur structure tertiaire en 7 classes différentes.

C. TRANSMISSION DES SIGNAUX DES FACTEURS DE CROISSANCE

La stimulation des récepteurs conduit à la transmission d'un signal vers le noyau grâce à des cascades de phosphorylations. Il existe plusieurs voies selon le type de récepteurs et le type cellulaire, convergeant vers la phosphorylation de facteurs de transcription de l'ADN (Schlessinger, 2000). Deux voies principales aboutissent à cette activation : la voie des protéines G, et la voie des phospholipases (Figure 12).

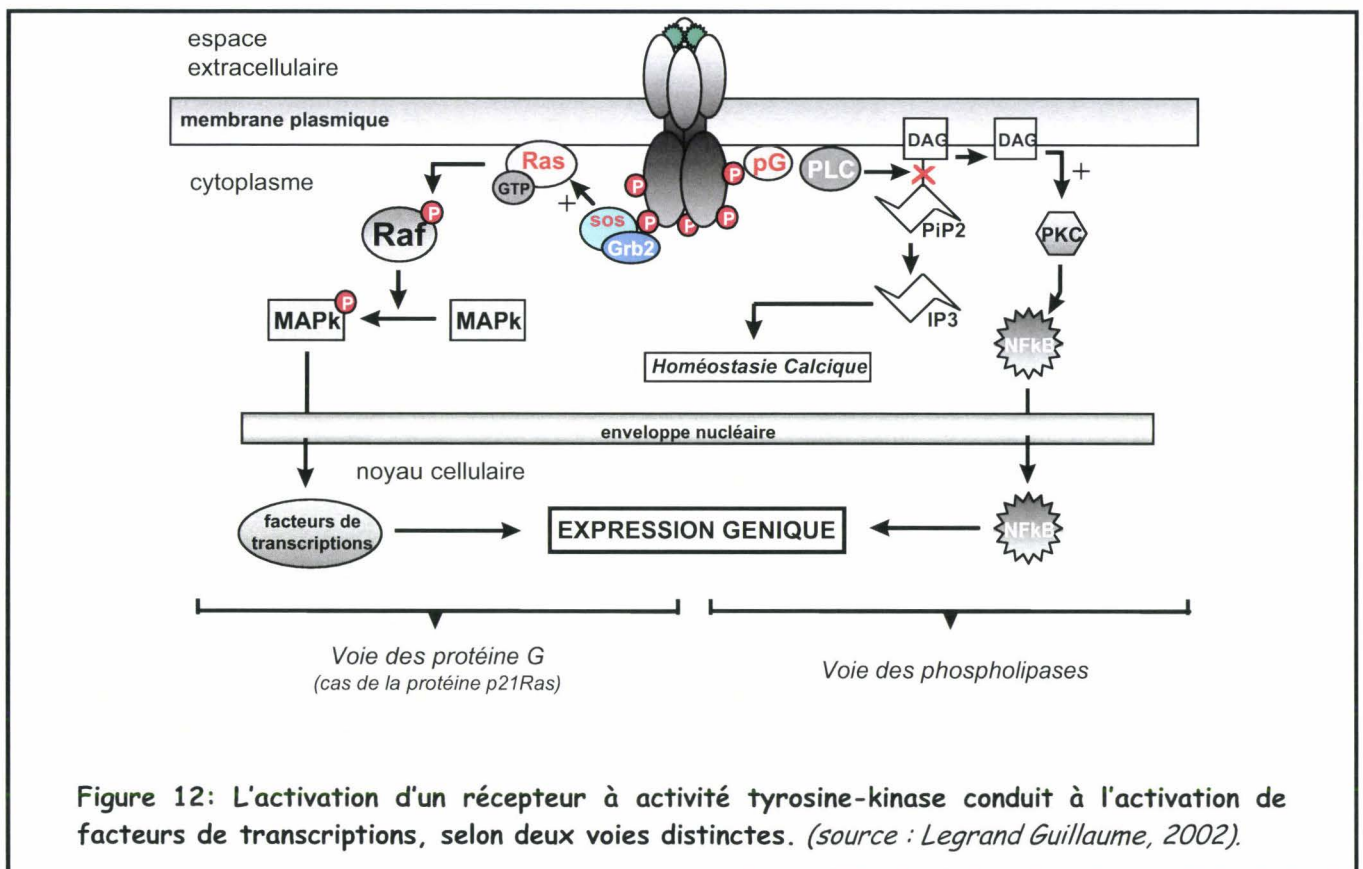


Figure 12: L'activation d'un récepteur à activité tyrosine-kinase conduit à l'activation de facteurs de transcriptions, selon deux voies distinctes. (source : Legrand Guillaume, 2002).

1. La voie des protéines G

Cette voie fait intervenir des protéines spécifiques liant le GTP (Guanine Tri Phosphate) appelées protéines G par couplage des récepteurs avec les effecteurs intracellulaires ce qui permet la transmission du signal (Gutkind, 1998). La plus étudiée des protéines G est une protéine de 21kDa appelée Ras, ou p21Ras (Monteiro et al., 2005; Stice et al., 1999). Cette protéine, arrimée à la membrane plasmique grâce à son résidu hydrophobe C terminal, peut se trouver sous deux formes : une forme inactive, liée au GDP (Guanine Di Phosphate), et une forme activée, liée au GTP. Ainsi, après stimulation par des facteurs d'échanges liées aux récepteurs tels que SOS (Son Of Sevenless protein), ou Grb2 (Growth-factor-receptor-bound protein 2), elle transmet la phosphorylation grâce à la protéine effectrice Raf, qui pénètre dans le noyau et phosphoryle les facteurs de transcription de l'ADN (Ueda and Saijo, 2001).

2. La voie des phospholipases

Cette voie fait intervenir la phospholipase C (PLC- γ), activée soit indirectement par l'intermédiaire d'une protéine G, soit par phosphorylation directe d'un résidu tyrosine, permet l'hydrolyse de phospholipides et plus particulièrement du phosphoinositol (PIP₂), en deux seconds messagers : l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃), et le diacylglycerol (Moolenaar et al.). Le DAG active spécifiquement la protéine kinase C (PKC) activant à son tour des facteurs de transcription (Oliva et al., 2005).

Outre la formation d'IP₃ et de DAG, la fixation d'un facteur de croissance à son récepteur va engendrer des signaux dépendants d'autres seconds messagers, tels que le calcium (Ca²⁺) et l'acide arachidonique.

Le calcium intracellulaire voit son taux varier lors de la fixation de facteurs de croissance à leurs récepteurs (Schubert et al., 1978). Ainsi, il a été montré grâce aux sondes fluorescentes que l'EGF et le PDGF provoquent une augmentation rapide du taux de Ca²⁺ cytoplasmique (Moolenaar et al., 1984). L'activation du récepteur à l'EGF (EGF-R) induit l'ouverture de canaux calciques membranaires indépendant du voltage et l'influx de Ca²⁺ depuis le milieu extracellulaire. La stimulation de canaux potassiques dépendant du Ca²⁺ a également été décrite pour d'autres facteurs tels que l'insuline et le FGF (Wiecha et al., 1998). Nous reviendrons plus en détail sur le calcium dans une partie suivante (cf V).

Outre le calcium, un autre second messager a également été montré pour être impliqué dans la transduction des signaux des facteurs de croissance : l'acide arachidonique. En effet, des travaux montrent que l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique empêche

l'expression de facteurs de transcriptions par l'EGF (de Laat et al., 1999; Handler et al., 1990; Sellmayer et al., 1991).

Il est à noter que même si un récepteur semble être spécifique de son facteur de croissance, les voies de transmission sont communes et peuvent converger vers un effecteur unique donnant lieu à une certaine redondance du signal. Cette convergence des voies de signalisation permet aussi l'existence de mécanismes d'amplification du signal, ou au contraire de rétrocontrôle, ou enfin d'interférence entre les messages (Doroquez and Rebay, 2006; Garcia-Segura et al., 2006).

D. FACTEURS DE CROISSANCE ET PATHOLOGIES PROSTATIQUES

Il est bien établi que la progression d'une prostate saine vers une prostate hyperplasique ou cancéreuse, ainsi que l'acquisition de l'androgéno-indépendance, s'accompagnent de modifications de l'expression des facteurs de croissance ainsi que de leurs récepteurs (Russell et al., 1998). Suivant leur sur ou sous expression, le mode de stimulation (paracrine ou autocrine) et le phénotype des cellules traitées, les facteurs de croissance ont des effets prolifératifs, mitogènes, anti-apoptotiques, ou différenciateurs. Parmi ces nombreux facteurs, nous nous limiterons dans ce chapitre à l'EGF qui a particulièrement attiré notre attention dans le cadre du travail de thèse.

1. Caractéristiques générales de l'Epidermal Growth Factor (EGF)

L'EGF, le facteur de croissance le plus anciennement connu (décrit pour la première fois par Cohen, en 1962) a été mis en évidence chez la souris mâle, animal chez qui son injection rapidement après la naissance provoque l'ouverture précoce des paupières grâce à ses propriétés prolifératives sur les cellules de l'épiderme (de Laat et al., 1999). Une fois mis en évidence chez l'homme, il s'est avéré identique à l'urogastrone, substance particulièrement abondante dans l'urine et connue pour son inhibition de la sécrétion gastrique acide. Ces 20 dernières années, de nombreux facteurs de croissance apparentés à l'EGF, et 4 récepteurs apparentés au récepteur au EGF-R ont été identifiés et interviennent dans le développement, la régénération, la différenciation, et la transformation de cellules issues de divers tissus (Alroy and Yarden, 1997; Edwin et al., 2006; Yarden, 2001).

Fortement exprimé dans de nombreux tissus humains normaux ou cancéreux, l'EGF est sécrété par les cellules impliquées dans la cicatrisation, à savoir les plaquettes sanguines, les

macrophages et les cellules épithéliales. Il est donc très présent dans les processus de réparation tissulaire impliquant la migration et la prolifération de cellules épithéliales.

Le gène codant pour le précurseur de l'EGF humain (pro-EGF) est situé sur le chromosome 4. La séquence codant pour le pro-EGF constituée d'une chaîne polypeptidique 1217 acides aminés, pour une masse moléculaire de 133 kDa est composée de 4 domaines (Goodlad and Wright, 1996) mais seuls les acides aminés 977 à 1029 (soit 53 acides aminés pour 6kDa) forment l'EGF humain mature (Figure 13).

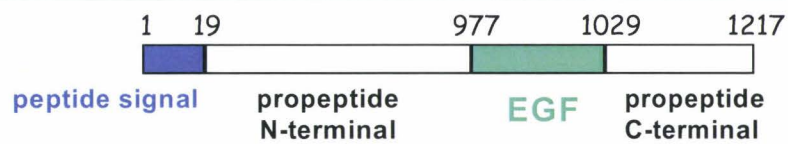


Figure 13: Représentation de la séquence codant pour le précurseur de l'EGF. Les acides aminés 1 à 19 forment la séquence signal, tandis que les acides aminés 977 à 1029 forment l'EGF mature. De part et d'autre de la séquence correspondant à l'EGF mature se trouvent donc deux extensions polypeptidiques comptant respectivement 976 et 188 acides aminés.

Une fois synthétisé, le pro-EGF est transféré à la membrane plasmique et ancré par un court domaine transmembranaire situé dans le propeptide C terminal, puis l'EGF mature est finalement libéré par des protéinases extracellulaires. L'EGF mature, bioactif est caractérisé par une triple boucle maintenue en place par trois ponts cystéine intramoléculaires (Figure 14) (Prestrelski et al., 1992).

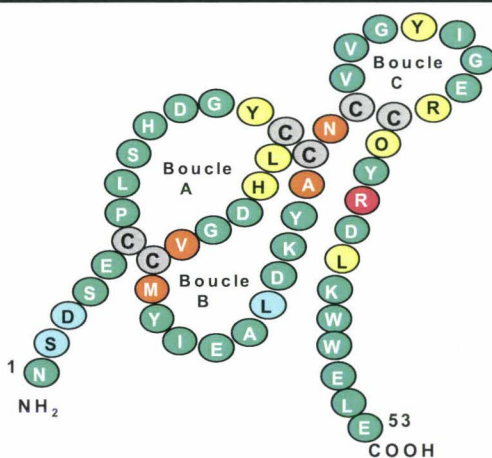


Figure 14: Représentation de l'EGF mature. L'EGF humain est composé d'une seule chaîne polypeptidique de 6 kDa, comptant 53 acides aminés. La structure générale forme une triple boucle (boucles A, B, et C), maintenue en place par 3 ponts disulfures intrachainés, entre deux résidus cystéine (C), nécessaires à l'activité biologique du polypeptide. (source : Legrand Guillaume, 2002).

D'autres peptides de structure proche forment la famille des peptides apparentés à l'EGF. On compte notamment l'HB-EGF, le Transforming Growth Factor-alpha (TGF-alpha),

l'amphireguline, l'épireguline, la betacelluline, ainsi que des heregulines et des neuregulines (NRG 1 à 4) pour lesquelles des isoformes ont été clonées (Aggarwal et al., 2006; Britsch, 2007; Johnston et al., 2006).

Le récepteur à l'EGF (EGF-R) est une glycoprotéine formée d'une seule chaîne polypeptidique de 1188 acides aminés pour 170kDa avec un domaine N-terminal extracellulaire fixant l'EGF, une hélice transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire portant l'activité tyrosine kinase de type I, caractérisé par sa structure repliée en trois domaines (Ullrich et al., 1984). Basés sur leurs homologues de séquences avec l'EGF-R, une série de molécules apparentées ont été identifiées. On définit ainsi une famille « erbB », composée de 4 molécules (Britsch, 2007), dont ErbB1 est l'EGF-R, ErbB2 semble ne pouvoir lier aucun ligand et interviendrait par hétérodimérisation avec notamment ErbB1 (King et al., 1988; Stern and Kamps, 1988), tout comme ErbB3 qui a perdu son activité tyrosine kinase intracellulaire (Alroy and Yarden, 1997). La majorité des ligands de la famille de l'EGF se lie exclusivement à l'EGF-R ou ErbB1, alors que les betacellulines peuvent lier à la fois ErbB1 et ErbB4, tandis que les heregulines et neuregulines lient ErbB3 et/ou 4, mais pas l'EGF-R (Jost et al., 2000). De plus, il a récemment été montré que la neureguline 1 (NRG1) qui joue un rôle important pendant le développement du système nerveux, du coeur, et des glandes mammaires a pour récepteurs des hétérodimères composés d'ErbB2 avec ErbB3 ou ErbB4 (Britsch, 2007). La fixation du ligand au domaine extracellulaire provoque l'activation du récepteur et son homo ou hétérodimérisation (Jost et al., 2000), ce qui permet la phosphorylation réciproque sur certains résidus de tyrosine encore nommée autophosphorylation.

2. Implication de l'EGF dans les pathologies prostatiques

L'EGF est connu pour jouer un rôle important dans le développement de la prostate humaine normale et cancéreuse (Roznovanu et al., 2005). Ainsi, l'addition d'EGF dans des cultures de cellules prostatiques humaines saines, ou cancéreuses, conduit à une stimulation de la prolifération (Jones et al., 1997). En outre, l'addition d'anticorps anti-EGF-R inhibe la prolifération du cancer prostatique *in vivo* (Prewett et al., 1996) et *in vitro*, sur les lignées cancéreuses LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) et DU145 (Fong et al., 1992b). De plus, il est connu que l'EGF intervient dans le caractère invasif de la tumeur car il stimule l'activité chimio-migrative des lignées de cellules cancéreuses (Jarrard et al., 1994; Rajan et al., 1996).

Le profil d'expression de l'EGF et de son récepteur, ainsi que son mode de stimulation des cellules sont modifiés lors des processus de cancérisation et lors des processus d'acquisition de l'hormono-indépendance.

- *Les cellules épithéliales prostatiques saines*, exprimant le récepteur à l'EGF, subissent un contrôle paracrine de leur croissance, par les cellules stromales qui synthétisent l'EGF (Prinsloo and Van Aswegen, 2000). Il est admis que le nombre de EGF-R exprimé par les cellules épithéliales augmente lors du développement d'hyperplasies prostatiques (Prinsloo and Van Aswegen, 2000). Il a ainsi été proposé que le passage vers un phénotype hyperplasique s'accompagne d'une augmentation du taux d'expression du EGF-R par les cellules épithéliales afin d'intensifier ce contrôle paracrine lié au EGF-R (Leav et al., 1998).

- *Au cours du processus conduisant à la cancérisation*, les cellules malignes présentent un mode de stimulation majoritairement autocrine par l'EGF (Figure 15). En effet, les cellules épithéliales cancéreuses acquièrent la capacité de sécréter de l'EGF indépendamment des cellules stromales et ceci a été décrit aussi bien in vivo ou une sécrétion d'EGF par les cellules épithéliales est détecté dans 68% des cancers prostatiques (Fowler et al., 1988) qu'in vitro sur les lignées de cellules épithéliales cancéreuses prostatiques LNCaP et DU145 (Connolly and Rose, 1989; Connolly and Rose, 1990). En outre, il est clairement établi que l'ARN messager du récepteur à l'EGF est surexprimé avec le grade de cancer du patient (Maddy et al., 1989; Morris and Dodd, 1990) bien que les études immunohistochimiques de la protéine donnent des résultats contradictoires attribués à un rapide « turn-over » des récepteurs non détectables par cette technique (Culig et al., 1996).

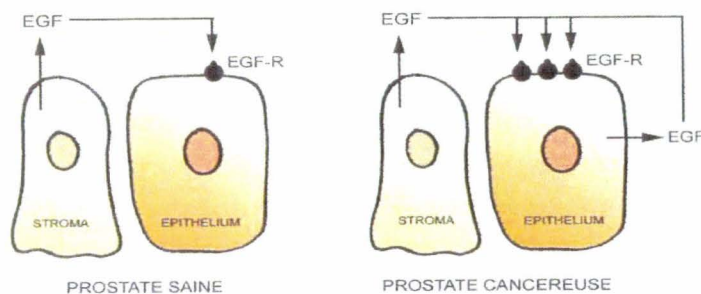


Figure 15 : Evolution du profil de l'EGF et de son récepteur dans les pathologies prostatiques. L'évolution d'un phénotype sain vers un phénotype cancéreux de la prostate humaine s'accompagne du développement d'un système de stimulation majoritairement autocrine de l'EGF. Les cellules cancéreuses expriment en effet ce facteur et montrent une augmentation du taux d'expression de son récepteur. (source : Legrand Guillaume, 2002).

Les oncogènes liés à la famille du EGF-R sont également exprimés dans la prostate, et leur profil d'expression est généralement augmenté comme c'est le cas pour erbB-2, qui apparaît dans la quasi totalité des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques (Zhau et al., 1992) en corrélation avec une aggravation du stade de la tumeur (Sadasivan et al., 1993). Enfin, une surexpression expérimentale de erbB-2 induit une augmentation du pouvoir prolifératif et métastatique de ces cellules (Zhau et al., 1996).

L'acquisition par les cellules épithéliales du phénotype androgéno-indépendant s'accompagne également de modifications du profil d'expression du facteur EGF et de son récepteur. Ainsi, il a été montré que les cellules cancéreuses androgéno-indépendantes DU-145 expriment 10 fois plus d'EGFR que les cellules prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP (MacDonald and Habib, 1992). De plus, il existe une étroite corrélation entre la progression du cancer vers l'androgéno-indépendance et l'expression du récepteur à l'EGF (Di Lorenzo et al., 2002).

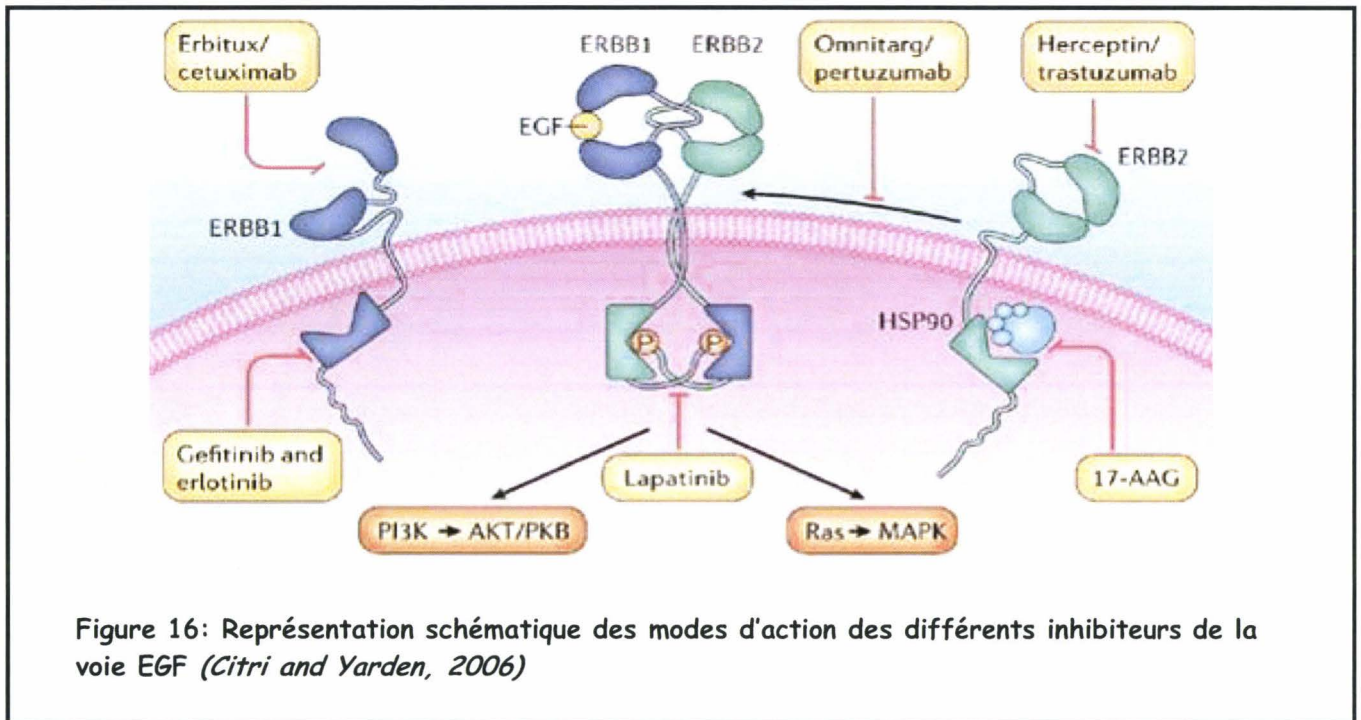
Enfin, lors de la cancérisation, d'autres molécules peuvent moduler l'activité du récepteur à l'EGF. Ainsi, il a récemment été montré que l'expression d'Id-1 (Inhibitor of differentiation/DNA binding), qui est un membre de la famille des protéines hélice-boucle-hélice fortement exprimé dans les cellules en prolifération, pouvait activer EGF-R conduisant à la progression à l'androgéno-indépendance (Ling et al., 2006). Il a également été montré que deux protéines SIRPa 1 (Signal Regulatory Protein alpha-1) et SHP-2 (Src homology-2) exprimées à la surface des cellules ont un rôle important dans la croissance et la migration des cellules malignes. SIRPa 1 est en relation avec l'EGFR. En utilisant des cellules humaines de glioblastome, les auteurs ont constaté que la liaison de SHP-2 avec EGFR induisait une hyperprolifération cellulaire ayant pour résultat la croissance cancéreuse. Cependant, quand SHP-2 est lié à SIRPa 1, la croissance non contrôlée des cellules est arrêtée (Wu et al., 2000; Zhan and O'Rourke, 2004).

De plus, un certain nombre d'études récentes ont montré l'implication des adipokines, défini en tant que polypeptides biologiquement actifs produits par le tissu adipeux, dans la carcinogenèse de prostate. Ces molécules seraient des facteurs putatifs de médiation entre l'obésité et le cancer de la prostate en agissant positivement sur la synthèse d'HB-EGF entre autre (Baillargeon and Rose, 2006).

3. Inhibiteurs de l'EGF et thérapeutiques

En raison de l'association de la surexpression de EGFR avec un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer, un certain nombre de stratégies thérapeutiques ont été

développées pour inhiber la prolifération tumorale et améliorer l'évolution clinique. Elles incluent entre autre, des anticorps monoclonaux bloquant EGFR et des inhibiteurs de la tyrosine-kinase (Figure 16).



a. Les anticorps monoclonaux anti EGFR

Les anticorps thérapeutiques ont pour but de se fixer au récepteur à l'EGF puis de recruter les lymphocytes cytotoxiques (Clynes et al., 2000). Les anticorps utilisés actuellement sont le trastuzumab (Herceptin ; Genentech) ciblant ErbB2 pour le traitement des tumeurs du sein, et cetuximab (Erbix ; Bristol Myers Squibb (BMS) /ImClone) ciblant ErbB1 pour le traitement du cancer colorectal. Les nouvelles approches thérapeutiques expérimentales visent le complexe hétérodimérique d'ErbB2 (Omnitarg/pertuzumab), ou emploient une combinaison d'anticorps (Spiridon et al., 2002) pour favoriser la dégradation du récepteur .

b. Les inhibiteurs de tyrosine-kinase

Parallèlement au ciblage de l'EGFR par les anticorps monoclonaux, les dernières années ont vu l'émergence d'une approche alternative de blocage du signal EGFR en utilisant le développement de molécules de petit poids moléculaire (les aminoquinazoline) capables de bloquer la tyrosine kinase de l'EGFR. Ces petites molécules empêchent la dimérisation des protéines ErbB. Deux drogues spécifiques d'ErbB1 : gefitinib (Iressa ; AstraZeneca) et

erlotinib (Tarceva ; Genentech/OSI), étaient récemment approuvés pour le traitement du cancer du poumon, et se sont avérés efficaces contre les tumeurs qui expriment des mutants catalytiques hyperactifs d'ErbB1(Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004). Une stratégie plus efficace serait d'employer des inhibiteurs de double-spécificité, tels que Lapatinib (GlaxoSmithKline), CI-1033 (Pfizer) et EKB-569 (recherche de Wyeth-Ayerst), visant de ce fait ErbB1 et ErbB2 (Xia et al., 2002).

c. Autres stratégies

ErbB2 dépend strictement du complexe du chaperonne HSP90 (heat-shock protein-90) pour le maintien de sa stabilité, ce qui constitue le « talon d'Achille » du système d'ErbB (Citri et al., 2004). L'efficacité des inhibiteurs d'HSP90, comme le 17-AAG (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin), est en cours d'évaluation. Cependant, une nouvelle approche pour permettre la dégradation protéasomale spécifique d'ErbB2 utilise des inhibiteurs de kinase qui dissocient HSP90 d'ErbB2 (Citri et al., 2002).

L'hétérogénéité génétique et la dynamique cellulaire seraient à la base de la résistance des tumeurs aux drogues, mais les combinaisons de traitement pourraient empêcher cette résistance (Goldie and Coldman, 1979). Les stratégies thérapeutiques visant le réseau d'ErbB pourraient être efficace (Ye et al., 1999). L'intégration des drogues d'anti-ErbB avec la chimiothérapie anticancéreuse conventionnelle et la radiothérapie permettent de surmonter la résistance aux drogues (Shou et al., 2004).

Plusieurs thérapies nouvelles empêchent l'activation d'EGFR, mais c'est une manière indirecte de traiter le problème. SIRPa 1 peut être une manière plus directe d'arrêter le cancer car il est présent naturellement dans les cellules. Les auteurs pensent pouvoir combattre le cancer par cette méthode plutôt qu'en empêchant l'activation d'EGFR (Wu et al., 2000; Zhan and O'Rourke, 2004).

Conclusion

L'EGF, de part son action sur la croissance des cellules, permet aux cellules de résister à l'apoptose, ce qui est la caractéristique majeure de l'évolution du cancer prostatique. De plus, les facteurs de croissance sont donc impliqués dans le processus d'acquisition de l'androgéno-indépendance ainsi que dans la différenciation neuroendocrine. C'est pourquoi ils représentent à ce titre une cible de choix dans le traitement des patients dont le cancer échappe au « contrôle hormonal ». A l'heure

actuelle, de nombreux inhibiteurs du récepteur à l'EGF sont développés et sont actuellement en cours d'évaluation, voir sur le marché. Il apparaît donc crucial d'étudier son rôle sur les mécanismes régulant la croissance et la différenciation des cellules prostatiques. Parmi tous les éléments susceptibles d'orienter les cellules vers telle ou telle voie, il a été décrit récemment que les altérations de l'homéostasie calcique joueraient un rôle important dans la régulation des grandes fonctions cellulaires comme la différenciation neuroendocrine.

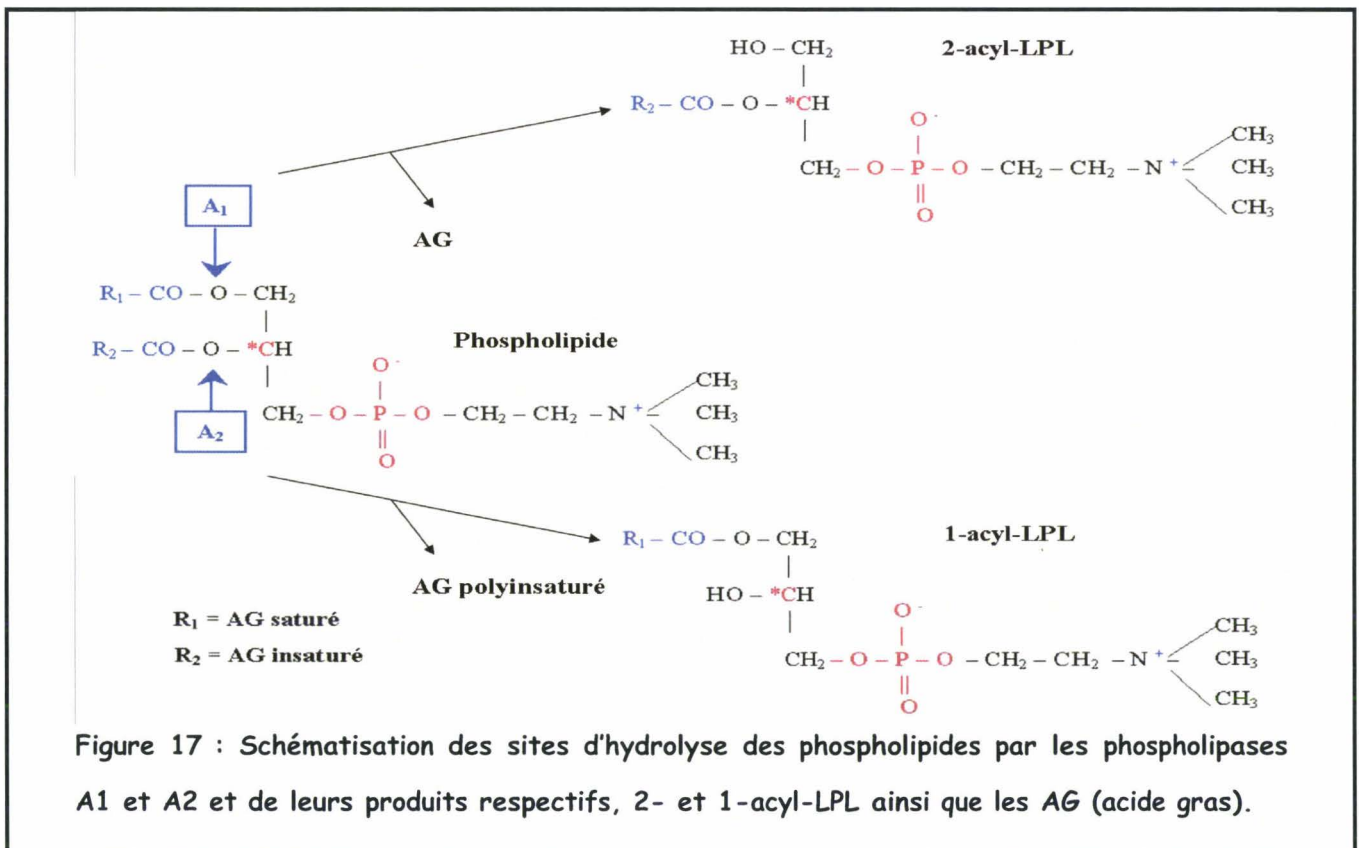
IV. IMPLICATION DES LYSOPHOSPHOLIPIDES DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE PROSTATIQUE

Au cours des années 1990, des molécules considérées jusqu'alors comme de simples intermédiaires du métabolisme lipidique ont acquis le statut de médiateurs de la communication intercellulaire. Il s'agit de phospholipides portant une seule chaîne d'acide gras, appelés lysophospholipides (LPLs). Ces LPLs présentent de nombreuses activités biologiques au sein de l'organisme (prolifération, migration, angiogenèse, facteur d'autostimulation tumorale...). Issus de l'hydrolyse par les phospholipases A (PLA) de phospholipides, il en existe aujourd'hui divers représentants dont l'acide lysophosphatidique (LPA), la sphingosine 1-phosphate (S1P), ou encore le lyso-phosphatidylcholine (LPC).

A. ORIGINE ET STRUCTURE DES LYSOPHOSPHOLIPIDES

1. Les Phospholipases A et leurs produits

Les phospholipases A (PLA) sont des enzymes hydrolytiques impliquées dans le métabolisme des phospholipides membranaires et cytosoliques. Comme présenté sur la figure 17, les phospholipases A1 (PLA₁) hydrolysent l'acide gras de la fonction alcool primaire en C1, libérant un acide gras et un 2-acyl-LPL.



Bien qu'une activité PLA1 soit détectée dans beaucoup de tissus et de cellules, un nombre limité de ces enzymes ont été purifiées et clonées à ce jour. Ceci inclue la phosphatidylsérine spécifique-PLA1 (PS-PLA1) des plaquettes de rat, la PLA1 de venin de serpent, et l'acide phosphatidique-PLA1 préférentiel (PA-PLA1) (Aoki et al., 2007).

Les phospholipases A2 (PLA₂) quant à elles hydrolysent l'acide gras de la fonction alcool secondaire en C2, libérant un acide gras polyinsaturé libre (comme l'acide arachidonique) et un 1-acyl-LPL (Capper and Marshall, 2001). Les PLA₂ sont classés en trois familles principales, les PLA₂ sécrétées (sPLA₂), cytosoliques (cPLA₂) et les calcium-indépendantes (iPLA₂). Il est à noter que pas moins de 19 différentes enzymes possédant une activité PLA₂ ont jusqu'à ce jour été identifiées. (Liscovitch et al., 1994; Moolenaar, 2000).

Les LPLs ainsi produits par ces enzymes diffèrent en fonction de la nature du groupement **R** (Figure 17) lorsqu'il est présent, mais aussi en fonction du groupement pouvant se lier au phosphate **P** (Figure 17).

Les LPLs n'ayant pas de groupement lié au phosphate appartiendront à la famille de l'acide lysophosphatidique (LPA) qui est le lysophospholipide le plus étudié à ce jour (Liscovitch et al., 1994; Moolenaar et al., 1997). La famille du LPA se compose d'un grand nombre d'espèces moléculaires différentes en raison des changements de la chaîne d'acide gras. En outre, le groupement aliphatique de la longue chaîne (groupement **X** sur la figure 18) peut se lier à l'épine dorsale du glycérol de différentes manières ce qui donne diverses sous-classes de LPAs (acyl-, alkyl-, et alkényl-LPA).

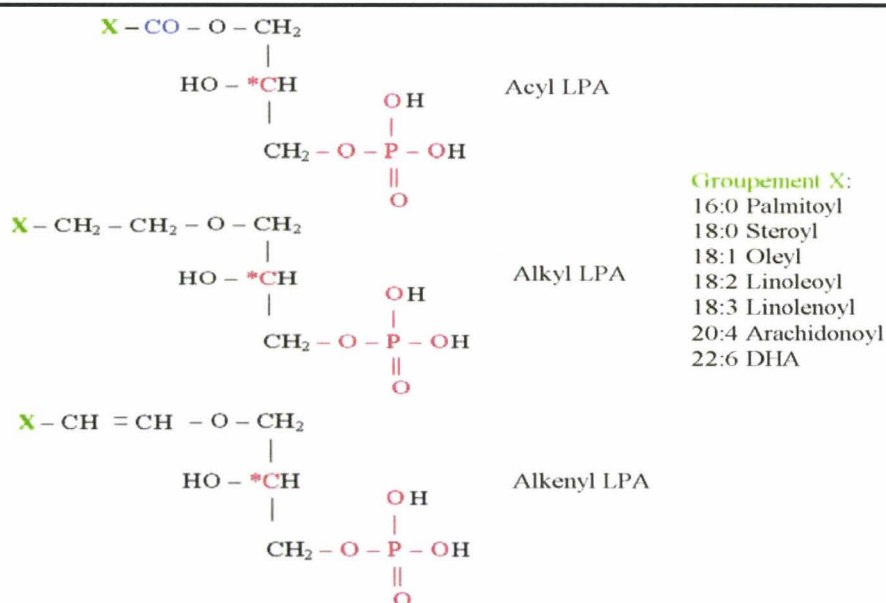


Figure 18: Différentes structures de la sous-classe de l'acide lysophosphatidique (LPA), **X**=longue chaîne latérale aliphatique.

En revanche, les LPLs ayant un groupement **X** lié au groupement phosphate quant à eux appartiendront à la famille dénommée LPX sur la figure 19. Cette famille comporte le lysophosphatidylethanolamine (LPE) (Pozzan et al.), le lysophosphatidylcholine (LPC), le lysophosphatidylglycerol (LPG), ainsi que le lysophosphatidylserine (LPS) et le lysophosphatidylinositol (LPI).

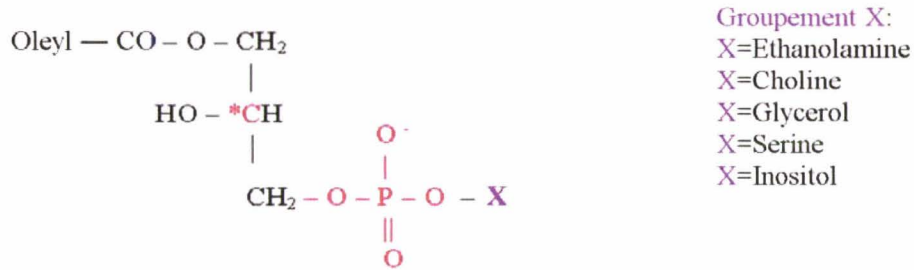


Figure 19: Différentes structures de la sous-classe des lysophospholipides-X seulement oleyls (LPX).

Enfin, des lysosphingolipides (LSL) sont formés à partir de l'hydrolyse de molécules de sphingolipides par les PLA : la sphingosine-1-phosphate (S1P) et sphingosylphosphorylcholine (SPC) (Figure 20).

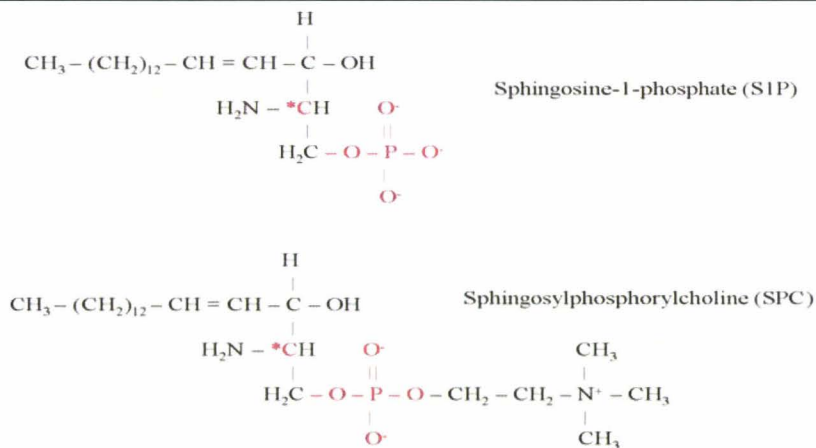


Figure 20: Structure des deux lysosphingolipides sphingosine-1-phosphate (S1P) et sphingosylphosphorylcholine (SPC).

Il est à noter que les LPLs contenant des phosphates avec une épine dorsale de glycérol ou de sphingosine, sont moins hydrophobes comparés à leur diacyl ou associés n-acyliques.

Comme le montre la figure 21, certains lysophospholipides comme le LPC peuvent être hydrolysés en LPA par une activité lysophospholipase D soluble (s-lyso-PLD) mise en évidence dans le plasma sanguin (Tokumura, 2002). L'enzyme responsable de cette activité a récemment été purifiée et identifiée (Ferry et al., 2003; Tokumura, 2002). C'est une ectonucléotide pyrophosphatase phosphodiesterase de type II, également appelée autotaxine (ATX). Il s'agit d'une protéine soluble de 125 kDa qui serait ancrée dans la membrane plasmique par son extrémité aminotermine. L'ATX est clivée par des protéase(s) encore non caractérisées qui libèrent la protéine dans les milieux extracellulaires. L'ATX est une protéine pro angiogénique mais également un facteur autocrine/paracrine pour les cellules cancéreuses stimulant la motilité cellulaire. Le mécanisme par lequel l'ATX stimule l'angiogenèse et la motilité cellulaire est resté une énigme jusqu'à la découverte de son activité lyso-PLD, activité qui permet la production de LPA et de S1P à partir des LPLs. Cette découverte représente une percée importante puisque comme nous le verrons (cf IV C), le LPA contrôle de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération et survie, ce que explique en partie le rôle de l'ATX dans le processus angiogénique et métastatique.

2. Ou se trouve les lysophospholipides?

Les LPLs sont présents dans le milieu intracellulaire suite à l'hydrolyse des phospholipides membranaires par les PLA cytoplasmiques. Cependant, ils sont également détectés dans le milieu extracellulaire (Spiegel and Milstien, 1995; Van Brocklyn et al., 1998) ce qui peut être dû soit à un transport actif, soit à une synthèse directement dans le milieu extracellulaire. Même si des protéines extracellulaires de liaison aux LPLs existent (albumine, protéines de liaison des acides gras, gelsoline), il n'a pas été mis en évidence de transporteur transmembranaire de LPLs. En revanche, il a été montré que les sPLA2 (PLA2 sécrétées) permettaient la synthèse de LPLs à l'extérieur de la cellule (Figure 21).

Les LPLs peuvent donc être synthétisés directement dans le milieu extracellulaire, ou ils se lient à l'albumine, et sont présents dans divers liquides biologiques (sang, liquide d'ascite, humeurs) Ainsi, le LPA issu de l'hydrolyse de l'acide phosphatidique par la sPLA2 (Figure 21), est véhiculé par l'albumine et présent en concentration micromolaire dans de nombreux fluides extracellulaires (liquides séminaux, salive, effusions malignes, plasma, sérum pour lequel le LPA serait responsable d'une grande partie de ses propriétés mitogènes) (Tokumura, 2002).

Issu de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) sous l'action d'une PLA2 ou de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), le LPC est également très abondant lié à

l'albumine ou à des lipoprotéines dans les fluides extracellulaires (100µM de LPC dans le plasma). Ceci lui vaut d'être considéré comme un composé lipidique majeur du plasma permettant l'apport d'acides gras et de choline aux tissus (Croset et al., 2000).

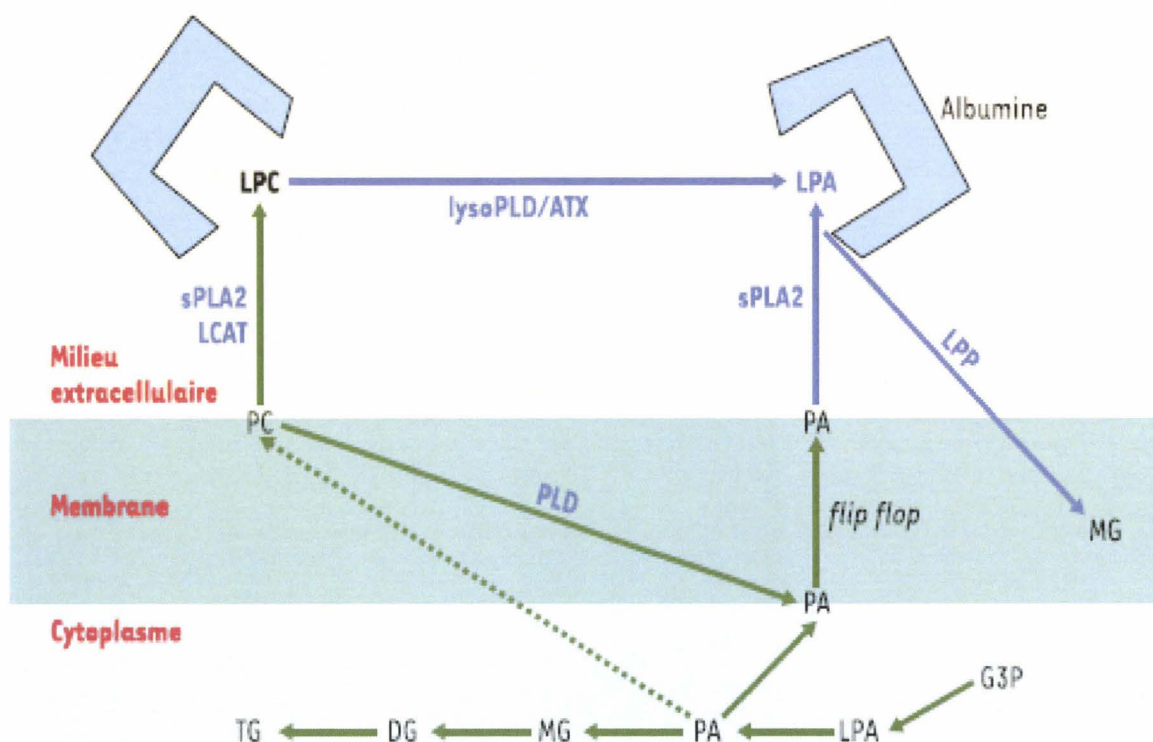


Figure 21: Anabolisme et catabolisme du LPA. Le LPA, synthétisé directement dans le milieu extracellulaire se lie à l'albumine. Le LPA peut provenir de l'hydrolyse du LPC sous l'action d'une activité lysophospholipase D (lysoPLD). Une activité lysoPLD soluble est portée par l'autotaxine (ATX). Le LPC est généré par hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) membranaire sous l'action de petites phospholipases, les phospholipases A2 sécrétées (sPLA2). Les sPLA2 peuvent également catalyser la formation de LPA à partir d'acide phosphatidique (PA), lui-même issu de l'hydrolyse de la PC par une phospholipase D (PLD). Le LPA est inactivé par déphosphorylation sous l'action de lipide phosphate phosphohydrolases (LPP) en donnant des monoacylglycérol (Montano and Djamgoz). G3P : glycérol-3-phosphate ; DG : diacylglycérol ; TG : triacylglycérol ; LCAT : lécithine cholestérol acyl transférase ; flip-flop : diffusion transversale des phospholipides d'une couche à l'autre de la membrane. (Saulnier-Blache, 2004).

B. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES LYSOPHOSPHOLIPIDES

1. Récepteurs aux lysophospholipides

Les LPLs et plus particulièrement le LPA et la S1P induisent des réponses biologiques via des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Au moins neuf récepteurs ont été identifiés: les récepteurs de LPA se composent des récepteurs de LPA₁₋₄ et ceux de la S1P se composent de S1P₁₋₅ (Fukushima et al., 2001; Hla, 2003; Ishii et al., 2004). Les trois premiers récepteurs aux LPA (LPA₁₋₃) sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G et appartenant à la famille EDG (Endothelial Differentiation Gene). Le récepteur LPA₄ montre une plus grande similitude avec platelet-activating factor GPCR. Les récepteurs à la S1P sont couplés aux protéines G et très apparentés à ceux du LPA (Raynal et al., 2005).

Les voies de transduction du signal mises en jeu par l'activation des récepteurs sont étroitement liées à la nature des protéines G auxquelles ils sont couplés comme le montre la figure 22 (Ishii et al., 2000). Grâce à leur couplage à la protéine Gi (inhibitrice), les récepteurs LPA₁₋₃ et S1P₁₋₅ conduisent à l'activation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) et des PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase). Ces activations, qui peuvent être directes ou mettre en jeu la transactivation de récepteurs de facteurs de croissance comme celui de l'EGF (Wu et al., 2002), sont impliquées dans les effets mitogéniques et antiapoptotiques du LPA et de la S1P. Les récepteurs LPA₁₋₃ et S1P₂₋₃ conduisent également à l'activation de la PLC et à l'augmentation du calcium intracellulaire *via* un couplage à la protéine Gq. Enfin, les récepteurs LPA₁₋₃ et S1P₁₋₅ inhibent l'adénylate cyclase (AC) *via* un couplage à la protéine Gi alors qu'à l'inverse, le récepteur LPA₄ génère l'activation de l'adénylate cyclase par un couplage à la protéine Gs (stimulatrice). Les récepteurs LPA₁ et LPA₂ et S1P₂₋₅ entraînent la contraction de l'actomyosine grâce à leur couplage à la protéine G_{12/13} et à l'activation de la GTPase Rho. Cette voie de transduction est impliquée dans les différents effets du LPA et de la S1P sur la motilité et l'adhérence cellulaire mais aussi dans la régulation de la transcription de certains gènes possédant un SRE (Serum Responsive Element) dans leur promoteur.

En plus de ces récepteurs, des récepteurs orphelins ont été identifiés comme récepteurs à d'autres LPLs. Le récepteur OGR1 (Ovarian cancer G protein-coupled Receptor 1) également connu sous le nom de GPR68, le récepteur GPR4 G (G-Protein-coupled Receptor 4) et le récepteur G2A ont été identifiés comme récepteurs pour le SPC et le LPC (pour revue, voir (Xu, 2002). Cependant dans beaucoup de cas les données sur leur identité se contredisent. Ainsi il a été montré que ces récepteurs seraient des senseurs aux protons,

indépendants de la signalisation des LPLs (Ludwig et al., 2003). Ces récepteurs et d'autres récepteurs orphelins/putatifs aux LPLs ont été répertoriés (pour revue, voir(Ishii et al., 2004).

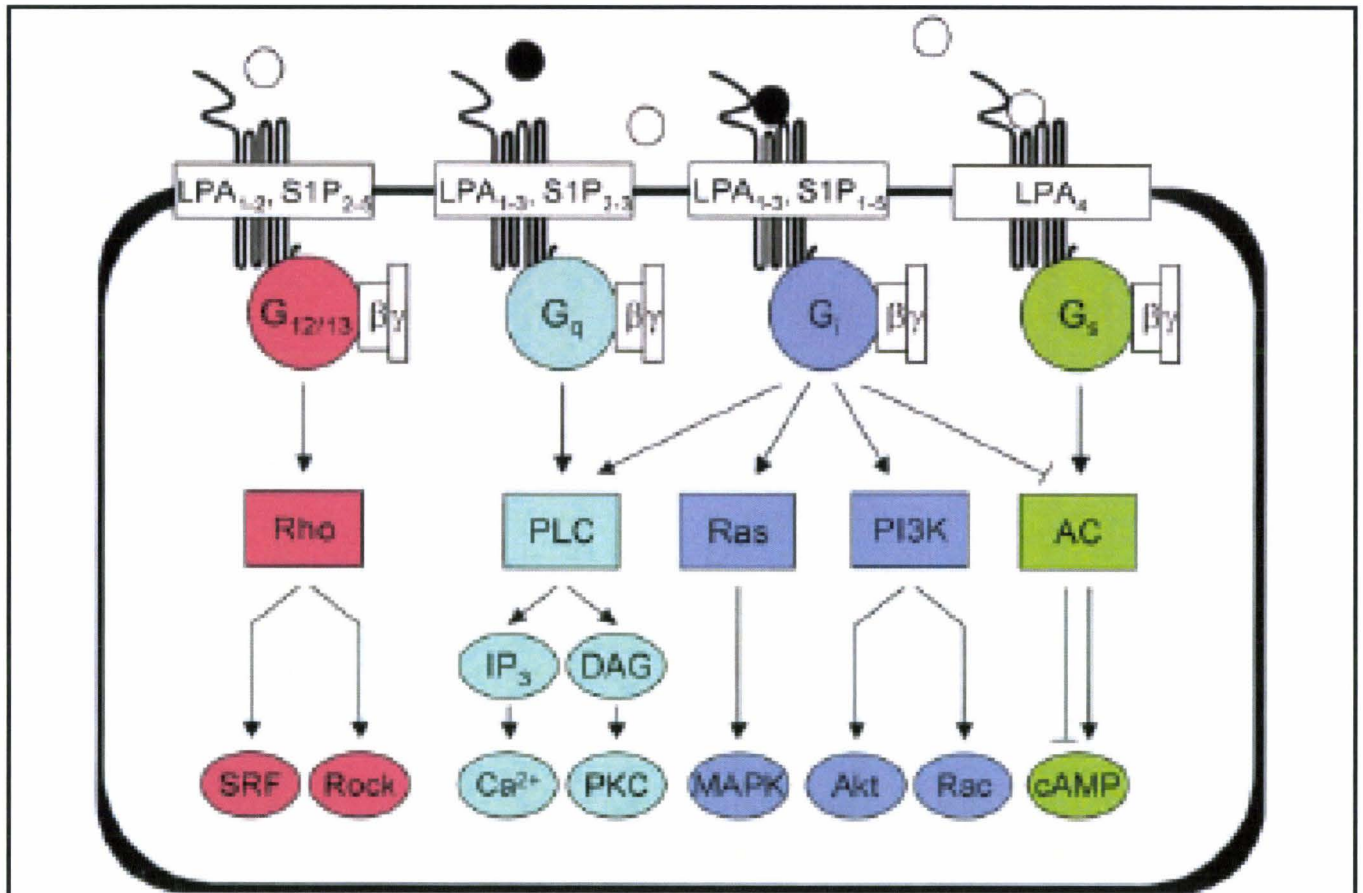


Fig 22 : Voie de signalisation des récepteurs aux LPA et S1P. PI3K : Phosphoinositol 3 Kinase; DAG : diacylglycerol ; IP₃ : inositol 1.4.5- trisphosphate; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; PKC : Protéine Kinase C ; AC : Adénylate Cyclase ; Rock: Rho-associated kinase ; SRF : Serum Response Factor. (D'après (Anliker and Chun, 2004).

2. Mode d'action et rôle des lysophospholipides

Les LPLs ont un mode d'action soit « indirect » par l'intermédiaire d'un récepteur comme cela peut être le cas pour le LPA ou la S1P, soit « direct » sans nécessité d'intermédiaires. Nous nous limiterons dans ce manuscrit à présenter les principaux rôles des LPLs.

a. Rôle du LPA

Il a été reporté que la principale activité biologique du LPA est sa capacité à stimuler par liaison à son récepteur la prolifération et/ou la survie de cellules normales ou transformées préférentiellement non-hématopoïétiques (fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules de

Schwann, cellules épithéliales ovariennes, prostatiques). Il a également été montré que le LPA pouvait induire d'autres réponses plus spécifiques du type cellulaire considéré, telles que migration, contraction, changement morphologique, modification de perméabilité, dédifférenciation... (pour revue, voir (Mills and Moolenaar, 2003). Une autre étude suppose qu'en plus de son rôle possible dans la ré-endothélialisation des vaisseaux, le LPA pourrait participer à la cicatrisation de tissus comme la cornée (Liliom et al., 1998), l'épithélium gastrique ou la peau. Il a également été montré que le LPA, par liaison à son récepteur, accélérât la maturation nucléaire de l'ovocyte, le transport de l'ovocyte dans l'oviducte isolé de souris, ainsi que la croissance et la différenciation des cellules déciduales après leur implantation (Budnik and Mukhopadhyay, 2002).

b. Rôle du LPC

Il a été montré que le LPC augmentait la prolifération dans les lymphocytes T et qu'il potentialisait l'activation de la protéine kinase C (PKC) dans d'autres lignées cellulaires (Asaoka et al., 1993; Sasaki et al., 1993). De plus, il a été reporté que le LPC jouait un rôle important dans l'athérosclérose et les maladies inflammatoires (Chisolm and Chai, 2000; Murugesan and Fox, 1996).

Les lysophospholipides ont également une action plus directe sur la concentration de calcium cellulaire. Ainsi, une étude montre que le LPC, augmente le calcium cellulaire des cellules musculaires lisses probablement par l'activation directe d'un canal calcique TRPC6 (Transient Receptor Potential Canonical 6) (So et al., 2005). Enfin, il a récemment été montré que le LPC comme le LPI activaient directement le canal TRPC5 et induisaient une entrée massive de calcium dans la cellule (Flemming et al., 2006).

c. Rôle de la SIP

Pour la SIP, il a été montré sur différents modèles cellulaires qu'elle pouvait stimuler ou au contraire inhiber la croissance cellulaire par liaison à son récepteur (An et al., 2000; Goetzl et al., 1999; Spiegel et al., 1998). Une étude récente a montré que la SIP active, via un récepteur couplé aux protéines G, le canal calcique TRPC5 générant une entrée de calcium et que ce mécanisme contribue à la motilité des cellules musculaires lisses (Xu et al., 2006).

C. LYSOPHOSPHOLIPIDES ET CANCERS

Des données récentes suggèrent que des LPLs sont impliqués non seulement dans des processus physiologiques survenant au cours du développement mais également dans des manifestations physiopathologiques (Raynal et al., 2005). Ainsi, un faisceau d'arguments suggère que les LPLs ont une fonction dans le développement tumoral : i) ils stimulent la prolifération, survie et migration de diverses cellules tumorales ; ii) ils sont retrouvés en abondance dans certaines effusions malignes ; iii) les enzymes qui les produisent sont tumorigènes (Goetzl et al., 2002). Même s'il reste à mieux définir la participation de ces «oncolipides» au développement tumoral, notamment en regard des oncogènes et suppresseurs de tumeurs, ils pourraient être les médiateurs d'un système performant d'autostimulation des capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales, ce qui en fait de nouvelles cibles potentielles en pharmacologie anticancéreuse.

1. Les LPLs et la survie des cellules cancéreuses

En raison de ses effets mitogéniques, le LPA pourrait entretenir ou amplifier la croissance des cellules cancéreuses. En augmentant la production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le LPA pourrait favoriser le processus d'angiogenèse nécessaire à l'expansion des tumeurs. Le LPA stimule également la production de certaines métalloprotéases, ainsi que la migration cellulaire, des événements favorables au processus métastatique. Enfin, le LPA est un agent anti-apoptotique, y compris *in vivo*, comme cela a pu être démontré sur des cellules cancéreuses ainsi que sur des cellules normales exposées à des traitements chimiques (cisplatine) ou des irradiations (Fang et al., 2002).

Pour la SPC, il a été décrit qu'elle favorisait la prolifération de cellules non malignes dans plusieurs types cellulaires mais qu'elle empêchait aussi la croissance des cellules cancéreuses, du sein, des ovaires, et des cellules cancéreuses pancréatiques (Berger et al., 1998; Desai et al., 1993; Tokura et al., 1999; Xu et al., 1995; Xu et al., 2001; Yamada et al., 1997).

Au niveau de la prostate, il a récemment été décrit que les LPLs constituaient des facteurs mitogéniques majeurs et qu'à ce titre, ils sont impliqués dans un ensemble de processus cellulaires dont la régulation de l'homéostasie calcique, la pathogenèse, la motilité et l'invasion des cancers de la prostate (Chun et al., 1999; Moolenaar, 1999; Spiegel and Milstien, 2003).

2. Présence des LPLs dans les effusions malignes

Le LPA est détecté dans des biopsies de tumeurs du colon mais pas dans des biopsies de colons sains (Merchant et al., 1991). Il a été montré que le LPA est retrouvé dans les ascites prélevées chez des patientes atteintes de cancer ovarien (Westermann et al., 1998). Bien que cela reste controversé, les concentrations plasmatiques de LPA seraient augmentées chez des patientes atteintes de cancer ovarien (Xu et al., 1998).

3. Des « oncoenzymes » produisant des oncolipides

Au niveau des enzymes générant les LPLs, il a été reporté que la phospholipase sécrétée A2-II (sPLA2-II) participant à la formation de LPC, est très abondante dans les lésions athérosclérotiques, et a été récemment reconnu comme facteur de risque indépendant pour les événements cardiaques (Rader, 2000). Enfin, l'expression de l'autaxine responsable de la synthèse de LPA par l'adipocyte est fortement augmentée dans les adipocytes de souris génétiquement obèses et diabétiques (Simon et al., 2002). Ainsi, grâce à son action sur la prolifération et la différenciation des préadipocytes, le LPA pourrait influencer le recrutement de nouveaux adipocytes au sein du tissu adipeux au cours de la mise en place de l'obésité.

Conclusion

Les lysophospholipides comme le LPA et la LPC et leurs effecteurs ont donc le potentiel de devenir de véritables cibles pour des approches innovantes en pharmacologie anticancéreuse entre autres. Mais avant d'en arriver là, des études préliminaires s'imposent et sont nécessaires pour permettre de mieux appréhender leur rôle dans la tumorigenèse, y compris dans celle de la prostate.

V. ROLE DU CALCIUM.

Il est bien établi que le calcium (Ca^{2+}) est un second messenger universel et un facteur clé de la signalisation intracellulaire impliqué dans l'ensemble des processus de signalisation cellulaire tels que la fécondation (Ozil, 1998), la prolifération (Berridge, 1995) ou l'apoptose (Nicotera et al., 1994). De nombreux organites intracellulaires comme les mitochondries, le noyau, l'appareil de Golgi fonctionnent comme des réserves calciques, mais, à ce jour, le réticulum endoplasmique (RE) semble constituer la plus importante réserve calcique intracellulaire ce qui fait que les cellules ont deux sources principales de calcium, l'une contenue dans ces stocks réticulaires et l'autre provenant du milieu extracellulaire.

Le calcium, messenger des plus versatiles, représente la plus petite « molécule » qui soit aussi bien compartimenté dans la cellule. Il est présent à une concentration d'environ 1mM dans la matrice extracellulaire ainsi que dans le réticulum endoplasmique et varie de 100nM à moins de 1 μ M dans le cytoplasme. Cependant, sa répartition dans un même compartiment peut être très hétérogène car il est présent sous forme libre ou liée à des protéines dites chélatrices qui sont présentes aussi bien dans le réticulum endoplasmique (ex : la calréticuline, la calbindine) que dans le cytoplasme (ex : la calmoduline, la calcineurine). Cette répartition hétérogène lui confère une dynamique importante au sein de la cellule et un rôle de messenger primordial.

Les signaux calciques sont très finement régulés, à la fois au niveau dans le temps, l'espace et en amplitude (Berridge, Bootman et Lipp, 1998) par le « calciosome », défini comme étant le répertoire des acteurs impliqués dans l'homéostasie calcique. 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 (Figure 23), les protéines chélatrices permettant de contrôler le taux de calcium libre et les protéines senseurs de calcium, détectant les variations du taux de calcium.

A. SOURCES DE CALCIUM ET SA REGULATION CELLULAIRE

1. Régulation des échanges calciques au travers du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique joue un rôle prépondérant dans le stockage et la régulation de la concentration en Ca^{2+} libre dans la cellule (Figure 23). Ce stockage est rendu possible grâce aux sarco-endoplasmique Ca^{2+} ATPases (SERCAs) qui remplissent le réticulum endoplasmique à partir du Ca^{2+} contenu dans le cytoplasme, et grâce à la présence de protéines liant le Ca^{2+} à l'intérieur du réticulum tels que la calréticuline ou la calnexine

(Arnaudeau et al., 2002; Michalak et al., 1998). De nombreuses études montrent que dans une cellule animal en général, le Ca^{2+} de ces stocks peut être libéré *via* deux types de canaux : l'un sensible au second IP3 et l'autre, sensible à la ryanodine et à la caféine. La libération du Ca^{2+} de ces stocks à la suite d'un signal stimulant la cellule active des cascades de transduction cellulaires dépendant du Ca^{2+} (Bootman and Berridge, 1995; Pozzan et al., 1994).

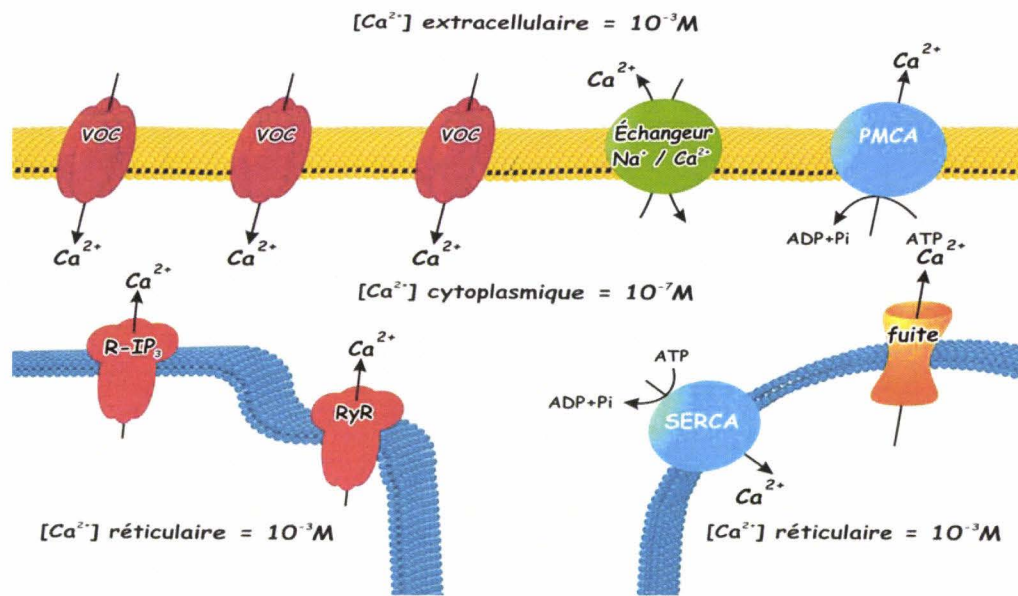


Figure 23: Représentation schématique des pompes et canaux régulant l'homéostasie calcique d'une cellule animale en général. Les mouvements de calcium suivent le gradient de concentration. L'influx de calcium depuis le milieu extérieur peut passer *via* des canaux calciques membranaires activés par différents stimuli : la vidange des stocks intracellulaires (SOC ou CRAC), le potentiel (VOC : Voltage Operated Channels), un stimulus chimique (SMOC ou ROC Second Messenger/Receptor Operated Channels). (source: Thebault Stéphanie, 2004)

a. Les pompes calciques réticulaires SERCA

Le remplissage du réticulum endoplasmique se fait grâce aux pompes calciques utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP : les SERCAs (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) (Figure 23). Ces pompes remplissent le RE en accumulant les ions Ca^{2+} issu du cytoplasme (Yu et al., 1999). Le clonage moléculaire a permis de définir une famille SERCA : SERCA1, SERCA2 et SERCA3 qui sont codées par trois gènes différents. SERCA1 est exclusivement exprimé dans le muscle squelettique, sous forme de deux transcripts différents issus d'un épissage alternatif, SERCA1a et SERCA1b (Brandl et al., 1987). Des mutations du gène codant SERCA1, *ATP2A1*, provoquent la maladie de Brody,

qui altère le muscle squelettique (Odermatt et al., 1996). SERCA2, originellement cloné à partir d'un muscle néonatal, est exprimé dans le muscle squelettique, et le muscle cardiaque (Brandl et al., 1987). Comme SERCA1, SERCA2 subit un épissage alternatif et produit deux protéines : SERCA 2a majoritairement exprimée dans le muscle strié, et SERCA2b, exprimée dans le muscle lisse et les tissus non musculaires. SERCA2b apparaît comme la forme la plus ubiquitaire de SERCAs (Guntjeski-Hamblin et al., 1992; Lytton and MacLennan, 1988; Lytton et al., 1989; Wu et al., 1995). Un troisième type de SERCAs, SERCA3, a été identifié, et est exprimé dans une large variété de tissus non musculaires, et notamment les cellules endothéliales et épithéliales (Bobe et al., 1994; Wuytack et al., 1995). Les études montrent que SERCA3 est souvent coexprimé avec SERCA2b, (Wuytack et al., 1995) et montre une affinité apparemment plus faible pour le calcium (Lytton et al., 1992).

b. Les canaux réticulaires R-IP3 et RYRs

Il existe pour les cellules animales en général, deux types de canaux pouvant libérer le Ca^{2+} réticulaire: l'un sensible à l'IP3 et l'autre, sensible à la ryanodine et à la caféine. L'IP3 produit, avec le DAG (Moolenaar et al.), grâce au clivage du PIP_2 par la PLC, active le récepteur canal IP3 (IP3R) (Figure 23) présent sur la membrane du réticulum endoplasmique ce qui entraîne une libération du calcium stocké dans celui-ci vers le cytoplasme (Berridge, 1986). La vidange du calcium réticulaire peut aussi se faire par l'activation des récepteurs à la ryanodine (RYR) (Figure 23) localisés également sur la membrane réticulaire grâce à un processus dépendant du calcium lui-même. La libération du Ca^{2+} des stocks à la suite d'un signal stimulant la cellule active des cascades de transduction cellulaires dépendant du Ca^{2+} (Bootman and Berridge, 1995; Pozzan et al., 1994).

c. La fuite passive réticulaire

Il a également été décrit une fuite passive du calcium réticulaire (Figure 23) compensant la recapture permanente du calcium par les pompes présentées ci-dessus (Hofer et al., 1998; Mogami et al., 1998; Van Coppenolle et al., 2004).

2. Régulation des échanges calciques au travers de la membrane plasmique

a. Les canaux VOC, ROC et SMOC

Les **canaux calciques voltage-dépendants** ou VOC (Voltage-Operated Channel) (Figure 22) s'ouvrent lors d'un changement de potentiel membranaire et provoquent une

entrée de calcium (Berridge, 1996). Ces canaux sont présents, entre autres, dans les cellules non excitables (ne générant pas de potentiel d'action suite à une dépolarisation membranaire).

Il existe aussi des **canaux calciques chimio-dépendants ou ROC** (Receptor-Operated Channel) qui s'ouvrent en réponse à la fixation d'un ligand (hormone, neurotransmetteur, second messenger) sur un récepteur lié directement ou non au canal et permettent un influx de calcium dans la cellule. L'ouverture de ces canaux ne nécessite donc pas d'activation de voie de signalisation intracellulaire.

Les canaux SMOC (Second Messenger-Operated Channels) sont activés par l'intermédiaire de seconds messagers comme le DAG ou l'acide arachidonique, générés par l'activation d'un récepteur membranaire (Shuttleworth et al., 2004). Par exemple, l'activation du récepteur muscarinique M3 est connue pour engendrer l'activation d'une PLA2 dont l'activité produit en retour de l'acide arachidonique 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.

b. Les canaux SOC

Les canaux SOC (Store-Operated Channel), activés suite à la libération du calcium contenu dans le réticulum sont largement présents dans les cellules non excitables (Parekh et al., 1997). Cependant, malgré cette définition simple, la nature moléculaire ainsi que les mécanismes d'activation de ces canaux restent obscurs. En parallèle de la vidange calcique réticulaire, plusieurs mécanismes différents sont sujets à d'intenses débats afin de savoir lequel est le mécanisme responsable de l'activation du SOC. Cette activation va générer une Entrée Capacitive de Calcium (Bonaccorsi et al.) et une entrée massive de calcium complémentaire de la vidange calcique et responsable de la vague calcique intracellulaire. 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 la figure 24.

Le premier mécanisme requiert une interaction entre l'IP3R et les canaux SOC appelés alors SOCCC: la fixation de l'IP3 sur son récepteur provoquerait une variation de conformation de ce dernier induisant un transfert d'énergie (sous forme de contraintes mécaniques) et par effet thermodynamique, les canaux SOCCC, initialement fermés, deviendraient ouverts.

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 SOCCIF. 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).

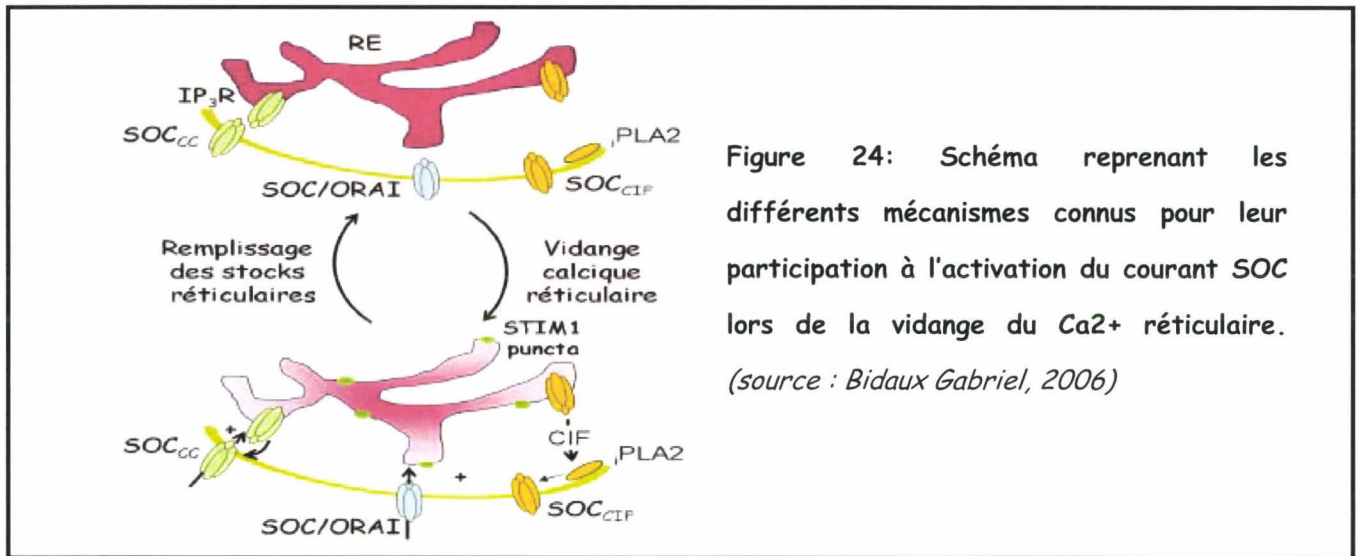


Figure 24: Schéma reprenant les différents mécanismes connus pour leur participation à l'activation du courant SOC lors de la vidange du Ca²⁺ réticulaire. (source : Bidaux Gabriel, 2006)

Cependant, récemment, 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 membranaire réticulaire détecterait une baisse de la concentration calcique réticulaire, et entraînerait son regroupement près du plasmalemme. La proximité de STIM avec les canaux SOC leur permettrait d'interagir et d'activer ces derniers (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005). De plus, 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 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.

Enfin, 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).

L'entrée massive de calcium via les SOC représente un moyen de remplir à nouveau les réserves calciques intra-réticulaires (Gill et al., 1996; Lewis, 2001; Parekh et al., 1997; Putney and McKay, 1999).

c .Les pompes et transporteurs

La membrane plasmique possède également des pompes et des transporteurs qui maintiennent le gradient de Ca^{2+} entre les milieux intra et extracellulaires. Les pompes appelées PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) font partie de la famille des ATPases de types P et ont une haute affinité pour le Ca^{2+} . Les transporteurs (comme l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) ont quant à eux pour rôle de faire sortir le calcium hors de la cellule et ainsi maintenir le gradient de concentration des ions calcium de part et d'autre de la membrane plasmique.

B. CARACTERISTIQUES DE LA SIGNATURE CALCIQUE

L'homéostasie calcique, à la base de la signalisation calcique, est un équilibre entre influx, efflux et stockage des ions calciques permettant ainsi le maintien de la compartimentation cellulaire du calcium et donc la possibilité 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 porte un message interprété par un réseau hiérarchisé.

1. Localisation

La quantité et la qualité des mécanismes induits sont définis aussi bien par l'origine du signal calcique (milieu extracellulaire ou stocks intracellulaires) que par son étendue (phénomène localisé, vagues calciques intracellulaires ou intercellulaires) (Berridge, 1993; Clapham and Sneyd, 1995). Les événements localisés, encore qualifiés d'élémentaires, peuvent être initiés par des canaux de la membrane plasmique ou réticulaire, et participent notamment à la sécrétion vésiculaire, la mitose etc... Ces événements élémentaires peuvent recruter d'autres canaux et ainsi générer des vagues calciques globales intracellulaires, voire intercellulaires, impliquées dans la prolifération, l'expression génique etc... .

Ainsi, les événements singuliers interviennent plutôt dans les processus fins comme au niveau de régions juxtamembranaires pour la libération de neurotransmetteurs dans la synapse et 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 ce qui régule 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 calciques intercellulaires entraînent la synchronisation de cellules permettant par exemple la

contraction d'un organe. Cependant, vu la vitesse de diffusion du calcium et sa portée, ces vagues sont souvent dues à la diffusion d'autres messagers comme IP3 qui induit la vidange des stocks calciques réticulaires via les récepteurs IP3 (Berridge et al., 1998; Berridge et al., 2000a; Berridge et al., 2000b).

La localisation cellulaire des canaux est également essentielle car elle permet de cibler, pour des événements élémentaires similaires, des processus cellulaires différents, voire opposés. Par exemple, la relaxation des cellules musculaires lisses est due à l'activation de canaux potassiques par des pics calciques élémentaires, localisés à proximité de la membrane. Quand ces pics calciques ont lieu plus profondément dans la cellule et qu'ils sont coordonnés pour générer une vague calcique, ils entraînent la contraction musculaire (Nelson et al., 1995; Porter et al., 1998).

2. Cinétique

La régulation temporelle des signaux calciques est un élément clé du signal calcique. Ainsi, comme le montre la figure 25, il est 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 cytoplasmique et la diminution conséquente du taux de calcium dans la lumière réticulaire déclenche la MCP des cellules (Pigozzi et al., 2004). Les cellules délivrent donc des signaux de faible amplitude ou plus couramment, des pics calciques transitoires. Ceux-ci peuvent être unique (lors de la sécrétion vésiculaire ou de la contraction musculaire) ou, si le signal doit être maintenu sur une période plus longue, répétés. Ces signaux correspondent alors à des oscillations dont la fréquence et la longévité sont modulées en fonction de l'effet escompté. Cette régulation des oscillations en terme de fréquence est cruciale pour la cellule.

Par exemple, contrairement à la vidange calcique réticulaire qui n'excède pas 100 sec pour une amplitude variant de 200 à 500nM, l'ECC peut atteindre plusieurs μM et 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 a démontré que cette prolongation de l'activité de l'ECC était en partie due au relargage lent mais soutenu du calcium absorbé par les mitochondries lors de la vidange des stocks de calciques réticulaires (Hoth et al., 2000).

3. Amplitude

Pour déclencher une réponse biologique (prolifération, apoptose, sécrétion,...) les activités des événements calciques élémentaires doivent se sommer pour obtenir un signal d'amplitude supérieure au seuil d'activation des protéines effectrices.

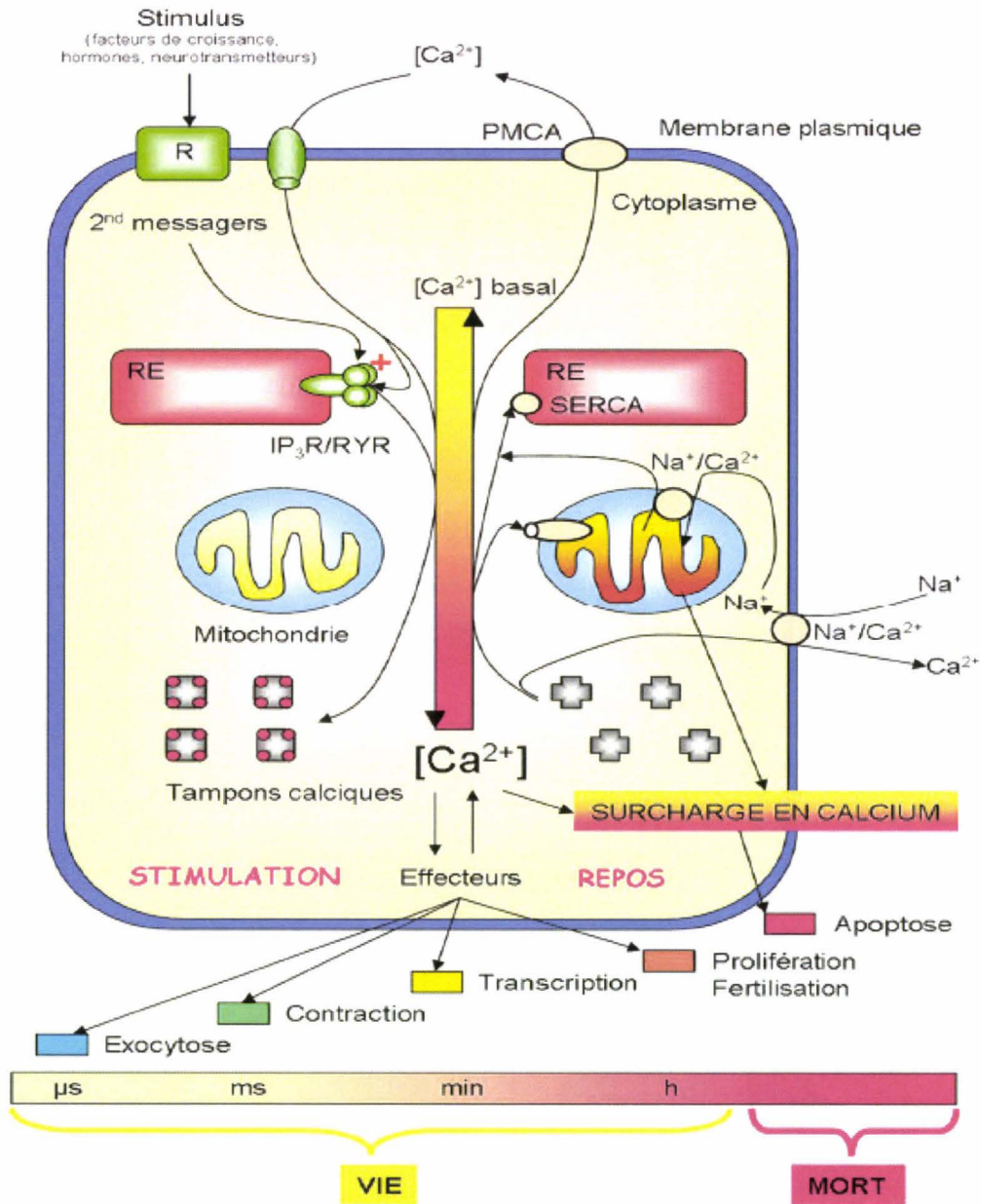


Figure 25: Représentation schématique de la propagation des signaux calciques et de l'effet physiologique de la signature calcique en fonction de ces propriétés (cinétique, amplitude).

Adapté de Berridge (*Berridge et al., 2003*).

Chaque protéine senseur de calcium possède une affinité spécifique pour ce dernier ce qui détermine un seuil de concentration calcique à partir duquel suffisamment de protéines senseur pourront être activées. Ainsi, la Ca^{2+} -calmoduline possède deux sites senseur avec des affinités différentes pour le calcium ce qui fait que l'un des deux lobes ou les deux de cette protéine seront activés en fonction de la somme des signaux calciques et joueront leurs rôles respectifs (Liang et al., 2003). Enfin, bien que plus difficile à estimer, la régulation en amplitude des signaux calciques est toutefois décrite, notamment dans l'activation de gènes (Dolmetsch et al., 1997).

Rapportée au cancer prostatique, pour un même stimulus externe (facteurs de croissance, hormones), des cellules cancéreuses différentes intégreront différemment le message ionique et donc pourront présenter des signatures calciques différentes aboutissant au déclenchement de fonctions physiologiques différentes (prolifération, résistance à l'apoptose).

C. FONCTIONS DU SIGNAL CALCIQUE

Bien qu'il soit infiniment petit, le calcium est le messenger privilégié de nombreux stimuli contrôlant les mécanismes moléculaires (régulations génique et protéique) impliqués directement dans de nombreuses fonctions physiologiques cellulaires (comme la contraction musculaire) mais dans un souci de clarté, nous nous limiterons à l'introduction de son rôle dans la prolifération, l'apoptose et la différenciation.

1. Régulation moléculaire de l'expression génique et protéique

Le contrôle de l'expression des gènes par des facteurs externes qui induisent un signal calcique intracellulaire a été démontré (Rosen et al., 1995). La régulation de l'expression des gènes par le calcium est, en règle générale, initiée par les protéines cytoplasmiques senseurs de calcium. Le principal senseur de calcium, la Ca^{2+} -calmoduline, peut stimuler des kinases comme la CamK (Calmoduline kinase) ou la PKA (Protein Kinase cAMP-dependent) une fois activée. Ces enzymes peuvent alors phosphoryler le facteur de transcription CREB (cAMP-Response Element Binding) qui, en se fixant sur ces séquences géniques spécifiques ou CRE (CREB Response Element), induit une augmentation de la transcription. 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 concentration en calcium cytoplasmique dépasse le seuil d'activation de la Calmoduline, la Ca^{2+} -calmoduline se lie à la phosphatase

Calcineurine qui va déphosphoryler NFAT permettant la translocation de ce dernier dans le noyau. Ainsi, le facteur de transcription NFAT augmente le taux de transcription de ces gènes cibles dont ceux encodant des protéines du cycle cellulaire (Crabtree, 2001). Dès la diminution du taux de la concentration calcique cytoplasmique, NFAT est rephosphorylé par une kinase et réexporté dans le cytosol. La complexité du système réside dans les oscillations des signaux calciques car ce contrôle de la prolifération nécessite une augmentation de concentration calcique cytoplasmique transitoire et répétitive afin de stimuler l'activité de NFAT de manière optimale et spécifique (Lewis, 2003). De plus, la Ca^{2+} -calmoduline est nécessaire au bon fonctionnement de la voie du AR (RA). En effet, la suppression de l'interaction de ces deux protéines bloque la translocation du RA, même en présence de 5 α -DHT (Cifuentes et al., 2004; Reddy et al., 2006).

Vue la proximité du noyau et du réticulum endoplasmique et puisqu'il existe des transporteurs calciques sur la membrane nucléaire, il est probable que le calcium puisse également 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 d'une part l'existence d'un réticulum nucléoplasmique, c'est-à-dire de boucles de membrane réticulo-nucléaires s'invaginant profondément dans le noyau des cellules et d'autre part que l'IP3 intranucléaire déclenchait une vidange depuis ces boucles (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). La régulation du calcium nucléaire soit depuis le réticulum endoplasmique *via* le cytosol soit depuis le réticulum nucléoplasmique permet un contrôle spécifique de la régulation génique calcium-dépendante.

2. Régulation de la prolifération

En réponse à des stimuli mitogéniques, la cellule génère des signaux calciques oscillants qui peuvent agir directement sur la prolifération comme par exemple lors de l'activation des lymphocytes T (Berry and Nishizuka, 1990; Partiseti et al., 1994). L'augmentation du taux de calcium cytoplasmique est donc impliquée dans la prolifération. En effet, l'utilisation d'agents connus pour bloquer l'influx de calcium induit un arrêt de la prolifération des cellules tumorales de l'encéphale (Lee et al., 1994; Loza et al., 1995).

Il a également été montré, d'une part, que la réduction du taux de calcium réticulaire provoque un arrêt du cycle cellulaire et que, d'autre part, le maintien d'une calcémie optimale

serait un élément régulateur du cycle cellulaire (Gill et al., 1996; Waldron et al., 1994). Au niveau de la prostate, les travaux du laboratoire ont montré que la diminution du taux de prolifération induite par la privation des cellules en sérum ou en androgènes était corrélée à la diminution de la concentration calcique réticulaire, mais que les facteurs de croissance EGF et IGF contrôlant la croissance des cellules androgéno-dépendantes induisent une surexpression des SERCAs et une augmentation du taux de calcium contenu dans les stocks. Le taux d'expression des SERCAs est donc corrélé au taux de prolifération de ces cellules. De plus, l'inhibition spécifique des SERCA induite par un agent pharmacologique : la thapsigargine, rend inefficace le traitement par l'EGF et l'IGF (Insulin like Growth Factor) (Legrand et al., 2001). Alternativement, la diminution du taux de Ca²⁺ réticulaire favorise la prolifération des cellules prostatiques, alors qu'une augmentation des stocks réticulaires de Ca²⁺ 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 clefs 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).

3. Calcium et 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 qui dirigent alors l'apoptose.

Cependant, il a été reporté que le calcium pouvait induire l'apoptose (Dowd, 1995; McConkey and Orrenius, 1997). A l'heure actuelle il existe deux voies impliquant le calcium, capables d'activer l'apoptose en synergie ou non à savoir soit la vidange calcique réticulaire, soit l'ECC. Il est clairement démontré, d'une part, que l'augmentation soutenue du taux de calcium cytoplasmique induit l'apoptose de nombreux types cellulaires (Jiang et al., 1994). De plus, une étude a montré qu'une élévation de le taux de calcium cytoplasme augmente l'activité de la caspase-3 qui est impliquée dans les processus apoptotiques (Juin et al., 1998).

D'autre part dans d'autres modèles cellulaires, il est clairement démontré que la seule vidange du calcium contenu dans le réticulum induit un stress réticulaire générant l'apoptose sans qu'aucune entrée capacitive de calcium ne soit nécessaire (Lam et al., 1993).

Les travaux du laboratoire ont mis en évidence que l'apoptose des cellules prostatiques métastatiques LNCaP androgéno-dépendantes pouvait être induite par la seule vidange des stocks intracellulaires sans nécessiter l'activation des canaux SOC's responsables de l'ECC) ni l'augmentation du taux de calcium cytoplasmique (Mariot et al., 2000; Skryma et al., 2000). Enfin, d'autres travaux ont montré que dans les cellules LNCaP transfectées avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et qui, de par ce fait, ont un phénotype androgéno-indépendant, la capacité d'induction de l'apoptose par la vidange réticulaire endoplasmique était diminuée (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.

4. Calcium et différenciation

Peu de données sont connues concernant l'implication du calcium dans la différenciation neuroendocrine de cellules non excitables. La concentration de Ca^{2+} libre externe a un impact très important sur l'état de différenciation des cellules. L'entrée de calcium *via* des canaux calciques voltage-dépendants semble être impliquée dans la différenciation neuroendocrine et dans la croissance des neurites de nombreux types cellulaires (Garber et al., 1989; Shitaka et al., 1996; Solem et al., 1995; Spitzer et al., 2000). 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. Les cellules épithéliales pigmentaires rétinienne sont aussi caractérisées par une différenciation calcium-dépendante (Rak et al., 2006).

Conclusion

Le calcium est un messager ubiquitaire et un élément clé des processus physiologiques cellulaires grâce aux propriétés intrinsèques des flux calciques dans la

cellule ainsi qu'à ses interactions avec son environnement. Le signal calcique, comme son homéostasie, sont directement déterminés par l'ensemble des acteurs protéiques régulant la voie de signalisation calcique ou calciosome.

De fines modifications qualitatives et/ou quantitatives de ce calciosome peuvent expliquer les réponses variables obtenues pour un même stimulus dans des cellules différentes. Ainsi, il est plausible d'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 mécanismes qui contrôlent l'homéostasie calcique dans les cellules cancéreuses ainsi que les différents calciosomes de tous les phénotypes cellulaires. Dans le cas précis de la prostate, la connaissance des différents calciosomes des cellules épithéliales normales ou cancéreuses est nécessaire pour décrire précisément les signatures calciques contrôlant la prolifération, la résistance à l'apoptose ou encore la différenciation.

Récemment, la découverte d'une nouvelle famille de transporteurs ioniques, celle des canaux TRP (Transient Receptor Potential), a enrichi le répertoire du calciosome.

VI LA SUPER FAMILLE DES CANAUX CALCIIQUES TRP

Malgré de nombreuses recherches, la nature moléculaire des canaux ROC couplés aux protéines G n'a toujours pas été clairement définie. Cependant, les membres de la famille de canaux TRP (« Transient Receptor Potential ») semblent être les meilleurs candidats pour remplir ces fonctions. Environ 32 gènes chez l'homme et plus de 70 protéines recensées à ce jour forment la super-famille des canaux TRP.

A. HISTORIQUE : LES TRP DE LA DROSOPHILE A L'HOMME

La désignation de TRP vient de la caractérisation d'un mutant de la Drosophile dont la réponse au processus de photo-transduction était altérée (Minke, 1977). Le mutant étudié à l'aide d'un électrorétinogramme (ERG), qui correspond à un enregistrement extracellulaire de la somme de l'activité électrique oculaire, montrait une dépolarisation transitoire. Les drosophiles sauvages, en réponse à une lumière prolongée, répondent par une dépolarisation soutenue enregistrée par l'ERG. En revanche, chez les mutants TRP, cette dépolarisation est transitoire ce qui conduit à la cécité. Chez la drosophile, la rhodopsine (pigment photosensible) est couplée à une PLC- β par l'intermédiaire d'une protéine Gq et entraîne l'ouverture d'un canal situé sur la membrane plasmique. Les mutants présentant un ERG transitoire possédaient donc 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 ». La génération du courant en réponse à un stimulus lumineux requiert à la fois la protéine TRP ainsi qu'une autre protéine TRP-like (TRPL) formant également un canal ionique (Montell, 1997; Xu et al., 1997). Etant donné que TRP et TRPL permettent un influx de calcium en aval d'une activation de la PLC, il a été proposé que les canaux TRP chez la drosophile puissent être un prototype de canal SOC. Les recherches se sont donc 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).

B. CLASSIFICATION ET STRUCTURES COMMUNES

Les membres de la superfamille des canaux cationiques TRP possèdent un haut degré de conservation chez tous les organismes métazoaires qui furent soumis au séquençage génomique.

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 (Birbaumer et al., 2003), Figure 26) :

- **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.

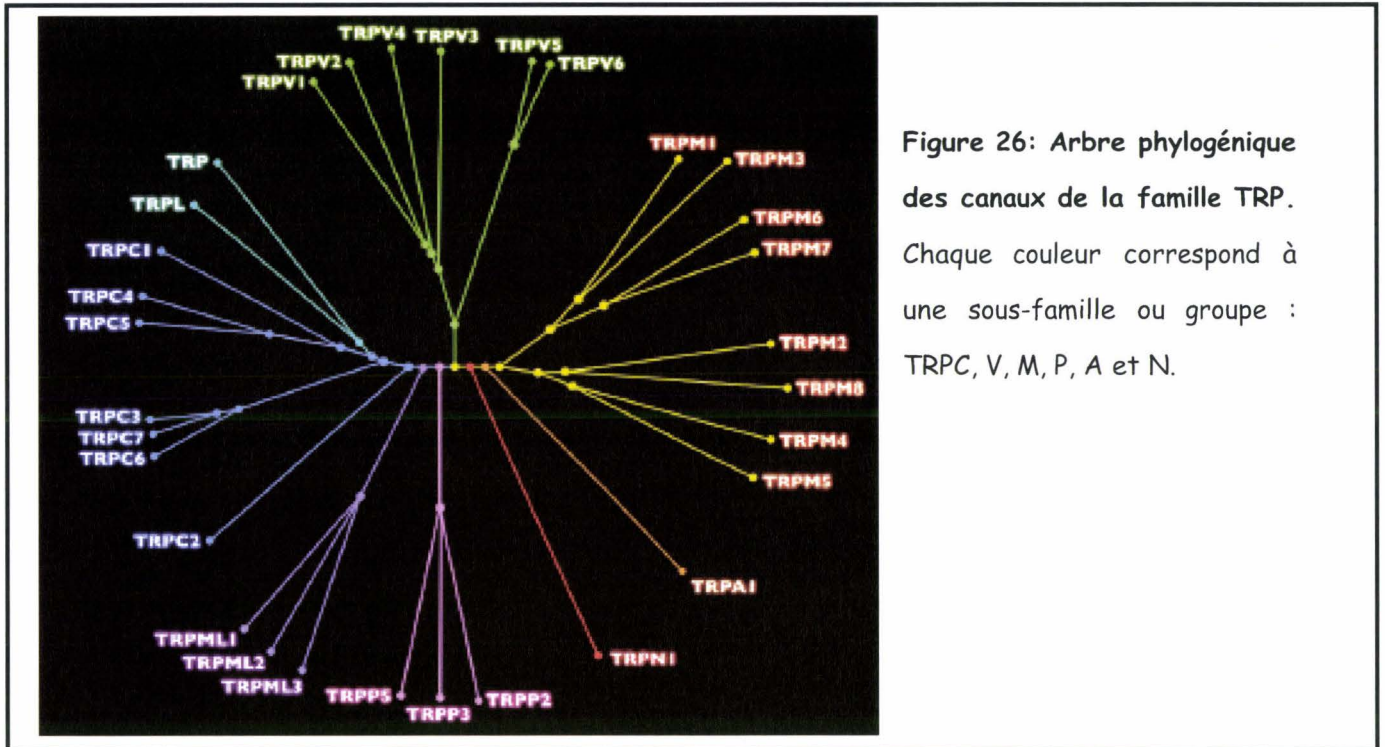
- TRPML (1-3)** pour les «Mucolipines».

- **TRPP (1-5)** issus à l'origine de deux gènes *polycystic kidney diseases 1* et *2* (PKD1 pour TRPP1, et PKD2 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 N-terminale de nombreux domaines ankyrines répétés (Montell, 2003).

- **TRPA1** (ou «ANKTM1»), un membre éloigné de la famille TRP (Story et al., 2003).

La structure générale d'un canal TRP comprend 6 segments transmembranaires hydrophobes, chacun séparé par de petites boucles hydrophiles (Figure 27). Les canaux d'une même sous-famille possèdent une structure protéique primaire et secondaire proche. Les deux boucles C- et N-terminales 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 S5 et S6 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. Par rapport aux canaux voltage-dépendants, la structure de ce domaine formant la région du pore ne présente pas de « voltage-sensor » ce qui est en accord avec les résultats montrant que les canaux TRP ne sont pas voltage-dépendants au premier sens du terme.



Un petit segment qualifié de domaine TRP, adjacent au segment transmembranaire S6, 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 N-terminale des familles C et V. D'une façon générale, il est considéré que le domaine C-terminal est impliqué dans la régulation du canal et plus particulièrement dans son activation. Par exemple, pour TRPC3, cette région contient la séquence d'interaction avec le récepteur IP3 (Zhu and Tang, 2004). La structure quaternaire homotétramérique ou hétérotétramérique des TRP (Figure 27, encart) fut déduite de leur homologie avec les canaux voltage-dépendants, puis démontrée pour les canaux TRPV1 et M8 par western blot (Dragoni et al., 2006; Kedei et al., 2001). Par exemple, les monomères de TRPC1 peuvent s'associer avec ceux de TRPC3, 4,5 et 6 (Amiri et al., 2003; Strubing et al., 2001) alors que pour ceux de TRPM6, il pourront former un canal fonctionnel avec des monomères de TRPM7 (Chubanov et al., 2004). Cependant, l'hypothèse de voir une association de monomères provenant de familles différentes est très peu probable au vu des différences structurales entre ces familles.

Bien qu'ils aient des caractéristiques communes, l'étendue de la famille TRP, les nombreuses différences fondamentales ainsi que leur structure tétramérique laissent supposer une grande diversité de régulation et un grand nombre de fonctions pour ces canaux TRP.

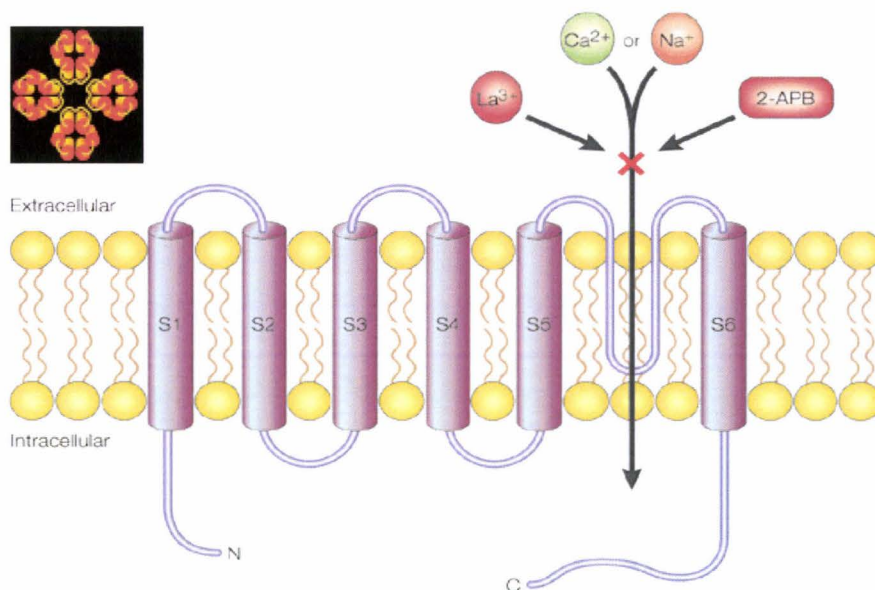


Figure 27: Représentation schématique de la structure secondaire générale d'un monomère de TRP: 6 segments transmembranaires, les deux boucles terminales sont cytosoliques avec chacune une zone hautement hydrophile et la boucle-P formant le pore ionique se situe entre les deux derniers segments transmembranaires. Dans l'encart supérieur gauche, vue du dessus d'un tétramère de TRP.

C. FONCTIONS DES CANAUX TRP THERMOSENSEURS DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE CELLULAIRE

La (les) fonction (s) des canaux TRP dans la physiologie cellulaire fait l'objet de nombreuses recherches actuelles et la liste de celle(s) ci ne cesse de s'agrandir de jour en jour nécessitant une mise à jour dans les revues (Flockerzi, 2007; Owsianik et al., 2006; Ramsey et al., 2006). Jusqu'à présent, ces études ont permis d'identifier de nombreux rôles de ces canaux dans la physiologie et la physiopathologie de la cellule (pour revue, voir (Alexander et al., 2007). Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux canaux sensibles à la température et plus particulièrement à TRPV2.

1. Le canal TRPM8

L'ultime membre de la famille TRPM fait l'objet d'intenses investigations, y compris au sein de notre laboratoire, car il est exprimé dans plusieurs tumeurs, notamment celle de la prostate. En effet, en cherchant un nouveau marqueur pronostique du cancer de la prostate Tsavaler et al., (Tsavaler et al., 2001) ont découvert un nouveau canal calcique : TRPM8. D'après ces auteurs, contrairement à TRPV6, le gène *trpm8* n'est pas exprimé dans la prostate saine et hyperplasique mais serait exclusivement transcrit dans la prostate cancéreuse. Fuessel *et al.* (Fuessel et al., 2003) ont de surcroît démontré que la spécificité et la sensibilité d'expression du gène *trpm8* étaient comparables à celle de la PSA. Une autre étude récente (Henshall et al., 2003) montre une augmentation importante de l'expression de *trpm8* dans les cancers prostatiques androgéno-dépendants, en revanche, l'expression de *trpm8* est perdue dans les cancers prostatiques avancés androgéno-indépendants. TRPM8 est également exprimé dans les neurones sensoriels innervant la peau. Dans les neurones sensoriels et les nocicepteurs, TRPM8 a été décrit comme un « thermorécepteur » car activé par des températures froides (<25°C à 30°C) de manière directe. Il est également activé par des agents mimant le froid tels que le menthol et l'iciline. Ainsi, TRPM8 agit bien comme senseur de température en permettant le déclenchement d'un message nerveux consécutif à son activation dans les neurones sensoriels. Toutefois, la distribution tissulaire de TRPM8 suggère que ce canal est plus qu'un senseur de la température. En effet, la prostate est un organe qui n'est pas sujet aux variations de température décrites comme activatrices de TRPM8. Bien que TRPM8 fasse l'objet de nombreuses études, sa fonction prostatique reste inconnue. Des travaux du laboratoire 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 (Thebault et al., 2005a). D'autres travaux du laboratoire 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 (Bidaux et al., 2005). D'autres travaux du laboratoire montrent que TRPM8 est régulé par la voie de signalisation de la iPLA2 (Ca²⁺-independent phospholipase A2) via ses produits finaux : les LPLs (lysophospholipides), agissant comme des ligands endogènes (Vanden Abeele et al., 2006).

2. Les canaux TRPA1

Exprimé dans les neurones sensoriels, le canal TRPA1 est décrit comme sensible aux basses températures (<15°C) et peut donc, comme TRPM8, être qualifié de

« thermorécepteur ». De plus, TRPA1 est activé par des agents inflammatoires tels que des cannabinoïdes (Bandell et al., 2004). Il pourrait remplir la fonction de ROC couplé à la PLC. Une étude récente 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 » c'est-à-dire un canal activé par l'augmentation de pression sur la membrane plasmique n'a pas encore été réalisée (Hu et al., 2006).

3. Les canaux TRPV

Quatre membres de la famille des canaux TRPV (TRPV1-4) fonctionnent en tant que détecteurs de chaleur (T=37°C). Alors que les canaux TRPM5 et TRPM2 sont des canaux thermosensibles ou thermodépendants, TRPV1, comme TRPM8, est qualifié de thermorécepteur directement activé par des températures respectivement supérieures et inférieures à la température corporelle.

Exprimé dans les petits neurones sensoriels, TRPV1 s'active rapidement pour des températures avoisinant les 43°C et est sensible aux composés vanilloïdes alors que TRPV2, présent dans les grands neurones sensoriels est actif pour des températures nocives supérieures à 53°C. Nous reviendrons plus en détail sur le canal TRPV2 dans la partie suivante (voir paragraphe VII).

TRPV3, principalement exprimé dans le système nerveux central, les neurones sensoriels et les kératinocytes, est sensible à la température à des seuils inférieurs à ceux observés pour TRPV1 et 2 (entre 22 et 40°C). TRPV4 constitue un canal sensible à de faibles variations de température ainsi qu'à des changements d'osmolarité (Benham et al., 2003; Caterina et al., 2000). Son activation semble dépendre de sa localisation et d'un (des) messageur(s) intracellulaire(s) (Watanabe et al., 2002a; Watanabe et al., 2002b). TRPV4, orthologue de Osm-9 chez *Caenorhabditis elegans*, pourrait être classé parmi les « mécanorécepteurs ». 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 antidiurétique (Budnik and Mukhopadhyay, ; Liedtke et al., 2000; Liedtke and Friedman,

2003; Liedtke and Kim, 2005; 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.

TRPV5 et TRPV6 sont des membres plus éloignés des précédents. Ils forment des canaux hautement sélectifs pour le calcium découverts initialement dans les épithélia intestinaux, rénaux et placentaires où ils permettraient la réabsorption de calcium (Gunthorpe et al., 2002; Hoenderop et al., 2001a; Hoenderop et al., 2001b; Peng et al., 1999). Par ailleurs, l'ARNm de TRPV6, indétectable aussi bien dans la prostate normale que dans les hyperplasies bénignes de la prostate, voit son expression augmenter lors de la cancérogénèse corrélée au taux de PSA et semble particulièrement élevée dans les métastases de la prostate, ainsi que dans les cancers hormono-indépendants (Fixemer et al., 2003; Peng et al., 2001; Wissenbach et al., 2001). Avec le gène *trpm8*, le gène *trpv6*, dont l'expression est régulée positivement par les androgènes, représente donc un candidat pour le développement de marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques pour l'adénocarcinome prostatique (Fixemer et al., 2003). Outre ce rôle, de nombreuses controverses subsistent quant à son rôle en tant que canal SOC. Des travaux de notre laboratoire montre que TRPV6 participerait en partie au courant SOC dans les cellules LNCaP (Vanden Abeele et al., 2004).

Conclusion

La famille des TRP constitue un remarquable ensemble de canaux se caractérisant par une extrême diversité tant au niveau de leurs fonctions que de leurs rôles dans la physiopathologie cellulaire. Cette grande diversité des TRP trouve son origine dans l'évolution et le besoin de développer de nouvelles fonctions afin d'assurer la survie de l'espèce. Récemment, plusieurs travaux ont rapporté que cette diversité fonctionnelle des canaux TRP est notamment sous-tendue par des modes d'activation particuliers ainsi que par une régulation précise de leur activité.

VII LE CANAL TRPV2, UN CANDIDAT INSOLITE

Dans ce dernier chapitre, nous ferons la synthèse de l'ensemble des recherches portant sur le canal TRPV2 et présentent dans la littérature. Nous commencerons par récapituler le fonctionnement du détecteur de chaleur dans les neurones thermosensoriels, puis nous répertorierons les données traitant de la régulation de l'activité du canal.

A. TRPV2 : THERMORECEPTEUR DES NEURONES SENSORIELS

Comme les canaux TRPV1,3 et 4, le canal cationique à sélectivité calcique TRPV2 (3 fois plus perméable au calcium qu'au sodium) est sensible à une augmentation de température (Figure 28) (Benham et al., 2003; Caterina et al., 1999; Cortright et al., 2001). Le senseur thermique du canal a été situé dans la boucle C-terminale des canaux (Brauchi et al., 2006). Ce canal (encore appelé VRL-1 pour Vanilloid Receptor-Like 1) est étroitement connecté à TRPV1 et fut identifié par clonage homologue chez le rat et l'humain (Caterina et al., 1999) comme chez la souris (Kanzaki et al., 1999). De plus, il a été montré que le canal TRPV1, qui présente 50% d'homologie avec TRPV2, est exprimé tant au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau de la membrane réticulaire (Turner et al., 2003). Cependant, à la différence de TRPV1, aucun activateur spécifique de TRPV2 n'a été rapporté à ce jour.

Les études fonctionnelles ont indiqué que le canal TRPV2 exprimé chez le rat répond aux températures seuil de la nociception, avec un seuil d'activation supérieur à 52°C (Caterina et al., 1999). De plus, il a été montré qu'une pré-stimulation par une température élevée permettait de sensibiliser fortement le canal et de diminuer son seuil d'activation de 13°C, c'est à dire de l'activer aux environs de 40°C (Benham et al., 2003). Cependant, outre son activation par de hautes températures, il a été décrit que la canal TRPV2 exprimé dans les myocytes aortiques murins répondait également à des stimulations mécaniques comme les changements d'osmolarité, et plus particulièrement une stimulation par une solution hypotonique, mais également à un étirement mécanique simulé (ou stretch) de la membrane (Liedtke and Friedman, 2003; Muraki et al., 2003). Pour expliquer l'activation mécanique de TRPV2, des auteurs suggèrent que ces contraintes généreraient des ligands endogènes comme acides gras et leurs dérivés. Ainsi, les lipides et leurs métabolites seraient les senseurs locaux de la déformation des membranes cellulaires (Beech et al., 2004).

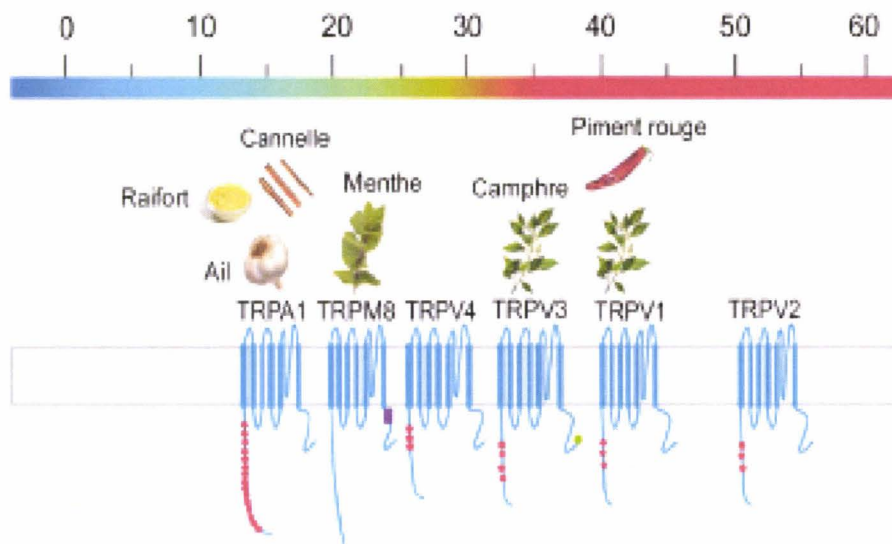


Figure 28: Schéma représentant l'alignement des thermorécepteurs TRP en fonction de leurs températures d'activation. Sont ajoutées les substances mimant les effets de la chaleur ou du froid, et parfois déclenchant la nociception. Figure adaptée de Dhaka *et coll* (Dhaka *et al.*, 2006).

L'hypothèse que TRPV2 soit un thermorécepteur, donc un senseur endogène pour une température nocive, et un mécanorécepteur, c'est-à-dire un senseur de contraintes mécaniques comme le stretch ou l'hypo-osmolarité, est encore soutenue par le fait qu'il soit exprimé dans les fibres nerveuses thermo et mecano-sensorielles A δ de grand diamètre et dans le DRG (Dorsal Root Ganglion) (Caterina *et al.*, 1999; Lewinter *et al.*, 2004).

Récemment, il a été reporté que l'expression protéique de TRPV2 est augmentée dans le DRG murin après injection intra plantaire de l'adjuvant de Freund complet induisant une inflammation périphérique (Shimosato *et al.*, 2005). En outre, TRPV2 voit également son expression augmenter dans les neurones post-ganglionnaires sympathiques de rat suite à un traumatisme du nerf (Gaudet *et al.*, 2004). Ces deux études suggèrent donc que TRPV2 puisse être impliqué dans la sensation de la douleur. Cependant, le rôle proposé de TRPV2 dans la nociception demeure toujours sujet à controverse au sein de la communauté scientifique. Ainsi, une équipe a montré que la surexpression de forme TRPV2 de souris dans les cellules CHO entraînait une augmentation de courant de 40% par rapport au courant basique en réponse à un stimulus de 54°C (Kanzaki *et al.*, 1999), alors que dans d'autres laboratoires, cette activation de TRPV2 par la chaleur n'a jamais pu être reproduite (Benham *et al.*, 2003).

De plus, TRPV2 est présent dans les neurones sensoriels du DRG, mais on le trouve également dans les tissus non neuronaux, y compris, le poumon, la rate et (Caterina *et al.*,

1999), où il est peu probable qu'il puisse avoir un rôle de senseur thermique, vu la gamme de température pour laquelle il est activé (>52°C). Enfin, son homonyme, le canal GRC a été détecté, entre autres, dans les épithélia de l'estomac, le duodénum, le grand intestin et la prostate seul ou coexprimé avec un marqueur neuroendocrine : la chromogranine A (Kowase et al., 2002).

B. REGULATION DE L'ACTIVITE DE TRPV2

Hormis ces études, peu de choses sont connues sur TRPV2, du, en partie au manque d'outils pharmacologiques spécifiques pour son activation et/ ou son inhibition, et au manque d'études de TRPV2 sur des animaux transgéniques. Cependant, il a été reporté chez la souris que la translocation du canal TRPV2 à la surface des cellules était stimulée par le facteur de croissance IGF-1 et d'autres facteurs contenus dans le sérum, suggérant un rôle additionnel du canal dans la croissance et plus particulièrement dans la différenciation neuroendocrine des cellules (Kanzaki et al., 1999). Cependant, cette translocation est beaucoup plus lente que celle observée pour TRPC5 dans le cerveau. Cette particularité a valu à TRPV2 d'être défini comme étant un canal régulé par un facteur de croissance ou GRC (Growth factor Regulated Channel) (Boels et al., 2001; Kanzaki et al., 1999). Bien que le rôle du sérum et de ses multiples composants sur TRPV2 ait été validé (voir résultats), il est à noter que l'activation et la translocation de TRPV2 par l'IGF-1 demeure une source de controverse au sein de la communauté scientifique car, beaucoup d'équipes y compris la notre n'ont à ce jour, pas réussi à retrouver ce résultat.

Outre les facteurs de croissance et le sérum, il a récemment été reporté que le 2APB (2-aminoethoxydiphenyl borate), connu pour être un modulateur non sélectif des canaux TRP, pouvait induire l'afflux de calcium (EC_{50} d'environ 130 μ M) dans les cellules HEK293 transfectées avec le canal TRPV2 de souris (Hu et al., 2004). Cependant, encore une fois, cette activation de TRPV2 par le 2-APB n'a pas pu être reproduite dans certains laboratoires (Bender et al., 2005; Chung et al., 2004) alors que d'autres on montrait, par les techniques d'imagerie calcique et de patch clamp, l'activation par le 2-APB et par de hautes températures de TRPV2 avec des différences spécifiques entre les espèces. Ainsi, pour les formes de rat et de souris surexprimées dans les cellules HEK293, l'activation de TRPV2 par le 2-APB comme par une température supérieure à 52°C est visible mais pas pour la forme humaine de TRPV2 (Neeper et al., 2007). Les auteurs expliquent cela par le fait que les extrémités cytoplasmiques N et C-terminales du canal murin, différentes de celles de la forme humaine

de TRPV2, sont nécessaires pour permettre une réponse aux stimuli 2-APB et/ou une température élevée. Cependant ces mêmes auteurs montrent que les formes humaines et murines de TRPV2 peuvent être activées par un nouvel agoniste : le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Neeper et al., 2007) ce qui laisse présager de nouveaux débats au sein de la communauté scientifique.

Le canal TRPV2 fonctionnel est, comme tous les TRP, un assemblage tétramérique de quatre monomères de TRPV. Cependant, il a été reporté que TRPV2 ne pouvait former un canal hétéromérique avec TRPV1 (Benham et al., 2003). Une étude par cristallographie a montré que du côté N-terminal, le domaine ARD (Ankyrin Repeat Domain) de TRPV2 ne permet pas la formation d'homo-oligomères, ce qui suggère que l'ARD des canaux TRPV puisse interagir avec des facteurs de normalisation plutôt que de favoriser l'assemblage tétramérique des canaux ioniques (Jin et al., 2006).

Concernant la translocation de TRPV2 vers la membrane, peu d'éléments sont référencés à ce jour dans la littérature. Cependant, l'équipe de Turner a montré récemment que la protéine RGA (Recombinase Gene Activator protein), protéine intracellulaire à 4 domaines transmembranaires, interagissait avec TRPV2 pour permettre la translocation et l'expression de ce dernier à la surface de la cellule (Barnhill et al., 2004; Stokes et al., 2004). Cette même équipe a également montré une interaction entre TRPV2 et la PKA couplée à une protéine adaptatrice ACBD3 (Acyl CoA Binding Domain protein 3) dans les cellules mastocytes (Stokes et al., 2004). Les auteurs suggèrent que la régulation de la phosphorylation par cette PKA puisse être une voie commune pour la modulation des canaux TRPV. Une autre équipe a montré très récemment dans les macrophages que le peptide chimiotactique fMLP (formyl Met-Leu-Phe) induisait la translocation de TRPV2 du compartiment intracellulaire jusqu'à la membrane plasmique et que cette translocation était inactivée par des inhibiteurs de la voie PI3-kinase (Pertusis toxin, LY294002) (Nagasawa et al., 2007).

C. TRPV2 ET PATHOLOGIES

Les données bibliographiques concernant l'implication de TRPV2 dans les pathologies sont très minces. Encore une fois, les difficultés résultent principalement du faible nombre d'outils pharmacologiques spécifiques dédiés à ce canal. Les données reliant le canal TRPV2 avec des pathologies relèvent donc principalement du domaine de l'hypothèse.

Ainsi, il a été décrit dans les myocytes que le canal TRPV2, qui se comporte comme un canal mecano- et osmo-récepteur, pourrait être impliqué dans la régulation du volume vasculaire ou dans la dégénération des myocytes (Iwata et al., 2003; Muraki et al., 2003). Une autre étude suggère que le canal TRPV2 puisse intervenir dans la voie de surcharge du calcium associée à la cardiomyopathie dystrophique (Inoue et al., 2006).

Conclusion

Le canal TRPV2 est très peu étudié à ce jour. Le manque d'outils pharmacologiques spécifiques à ce canal y est pour beaucoup. Pourtant, au vu de sa liaison avec les facteurs de croissance, de son implication probable dans la différenciation neuroendocrine, de ses modes d'activation très différents et originaux et de son expression très vaste au sein des tissus humains, il n'en demeure pas moins un candidat insolite pour lequel tout ou presque reste à découvrir.

Problématique et objectifs

La croissance normale et pathologique de la prostate est principalement sous contrôle des androgènes. Les traitements actuels des tumeurs de la prostate consistent donc en la diminution des taux sériques d'androgènes afin d'inhiber la progression tumorale. Bien que ces traitements soient efficaces dans un premier temps, un échappement thérapeutique est fréquemment observé.

En effet, les cellules tumorales évoluent d'un état androgéno-dépendant vers un état androgéno-indépendant et les tumeurs persistent. Ceci suppose que la croissance des cellules prostatiques est alors contrôlée par d'autres facteurs que les androgènes tels que des facteurs de croissance et que le mode d'expression de protéines régulées jusqu'alors par les androgènes doit être altéré.

L'identification de voies non androgéniques de régulation de la prolifération cellulaire ainsi que celle de nouveaux marqueurs impliqués dans l'évolution vers l'androgéno-indépendance s'avère donc cruciale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques compensant l'hormonothérapie. Or, un certain nombre de travaux ont montré que l'homéostasie calcique, régulée entre autres par l'action de facteurs de croissance, ainsi que l'expression et l'activité de canaux ioniques jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération cellulaire aussi bien dans un contexte physiologique que dans certains cancers. De plus, des variations d'expression de canaux ioniques ont été observées dans les cellules cancéreuses prostatiques.

I ETUDE DU ROLE DU Ca^{2+} DANS LA CROISSANCE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES

La croissance normale d'un tissu est assurée grâce à une balance équilibrée entre deux phénomènes : la prolifération cellulaire d'une part, et l'apoptose d'autre part, qui permettent le maintien normal du nombre de cellules du tissu. Un excès de prolifération cellulaire ou un défaut d'apoptose se traduit par une augmentation du nombre de cellules, qui conduit au développement d'une d'hyperplasie dans le cas d'un phénotype cellulaire normal, ou d'un cancer dans le cas d'un phénotype cellulaire modifié.

Comme nous l'avons montré en introduction, le Ca^{2+} agit comme un messager intracellulaire qui contrôle les processus de prolifération cellulaire et d'apoptose. La coordination de l'ensemble de ces fonctions nécessite une régulation précise des signaux calciques, grâce à des pompes et canaux exprimés au sein des membranes cellulaires, et dont certains sont qualifiés de « canaux régulateurs de la vie et de la mort cellulaire » (Marks,

1997). Ainsi, le Ca^{2+} et les structures qui permettent la régulation de l'homéostasie calcique sont des éléments clés des processus de prolifération cellulaire et de mort cellulaire programmée, qui contrôlent la croissance des cellules en général, et des cellules cancéreuses en particulier.

Cependant, malgré ces informations capitales, le rôle du Ca^{2+} et des structures permettant sa régulation est peu étudié actuellement dans le cancer en général, et dans le cancer de la prostate en particulier. Il est donc nécessaire de mettre en évidence le rôle du Ca^{2+} dans le contrôle de la croissance des cellules cancéreuses prostatiques, et de caractériser les mécanismes qui permettent ce contrôle.

Par conséquent, une partie de mes travaux de thèse a été d'identifier les mécanismes d'homéostasie calcique impliqués dans la croissance des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

II ETUDE DU ROLE DU Ca^{2+} DANS LE MODE D'ACTION DES FACTEURS DE CROISSANCE IMPLIQUES DANS L'EVOLUTION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES

Il est connu dans certains modèles que les facteurs de croissance sont capables d'interagir à court et à moyen terme, sur les structures qui permettent la régulation de l'activité du Ca^{2+} intracellulaire. Ainsi, il apparaît que les structures régulant l'homéostasie calcique sont des cibles potentielles des facteurs de croissance. Sachant que le Ca^{2+} intervient dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose de nombreux types cellulaires, il est donc probable que les effets des facteurs de croissance sur ces structures participent aux effets de ces facteurs de croissance sur la croissance cellulaire.

Ainsi, les facteurs de croissance, et plus particulièrement l'EGF, sont connus pour leur capacité à induire une résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes prostatiques. Il est également établi que les cellules neuroendocrines, d'une part, résistent aux stimuli apoptotiques et, d'autre part, possèdent un phénotype de cellules androgéno-indépendantes. Ainsi, dans les cellules cancéreuses prostatiques, il est connu que les cellules subissant une différenciation neuroendocrine présentent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Mori et al., 1999) et deviennent résistantes à l'apoptose (Hsieh et al., 1995). Le calcium étant impliqué dans ces phénomènes, il paraît évident qu'une altération de

l'homéostasie calcique responsable de l'arrêt de croissance ou de la résistance des cellules à l'apoptose soit impliquée dans la différenciation neuroendocrine.

Cependant, malgré ces données, le rôle du Ca^{2+} dans les effets des facteurs de croissance impliqués dans l'évolution du cancer prostatique n'est que très peu étudié à l'heure actuelle. Il apparaît donc primordial de mettre en évidence les mécanismes calciques impliqués dans le mode d'action des facteurs de croissance impliqués dans l'évolution des tumeurs prostatiques.

Le second axe de mes travaux a donc consisté à étudier l'implication des facteurs de croissance dans la différenciation neuroendocrine des cellules androgéno-indépendantes et d'étudier les modifications des mécanismes d'homéostasie calcique impliqués dans cet effet.

III ETUDE DU ROLE DU CANAL CALCIQUE TRPV2 DANS L'EVOLUTION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES

Comme nous l'avons vu, l'évolution du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance et la différenciation neuroendocrine s'accompagne de modifications d'expression de nombreuses protéines. Parmi ces protéines, les canaux ioniques ne font pas exception. Le canal à sélectivité calcique TRPV2, initialement décrit pour être activé par une température physiologiquement très élevée ($>53^{\circ}\text{C}$), a également été montré pour être activé par un facteur de croissance : l'IGF1 (Kanzaki et al., 1999). Cependant, cette activation est soumise à de nombreuses controverses au sein de la communauté scientifique. De plus, il a été suggéré que ce canal pouvait être impliqué dans le processus de différenciation neuroendocrine (Kanzaki et al., 1999).

Après avoir montré que les facteurs de croissance, et plus particulièrement l'EGF, participent à la régulation de la prolifération des cellules androgéno-dépendantes LNCaP ainsi qu'à la différenciation neuroendocrine des cellules androgéno-indépendantes DU145, notre attention s'est logiquement portée sur l'étude du canal calcique TRPV2.

Cependant, malgré les données bibliographiques, peu d'outils pharmacologiques sont connus tant pour activer que pour inhiber TRPV2. De plus, la version humaine de ce canal ne semble pas être activée par les mêmes agonistes que la version murine (2APB, température élevée,...) (Neeper et al., 2007).

Le dernier axe de ma thèse consista à examiner l'expression protéique, la fonctionnalité, et la voie d'activation de TRPV2 dans les cellules cancéreuses prostatiques ainsi que son implication dans la différenciation neuroendocrine de ces cellules.

L'objectif général de ce travail a donc été d'identifier les mécanismes d'homéostasie calcique impliqués dans la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques. La connaissance des mécanismes impliqués dans la différenciation neuroendocrine pourrait se révéler importante dans le développement de nouvelles thérapies contre le cancer de la prostate.

Matériels et Méthodes

I. CULTURE CELLULAIRE

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé sur différents types cellulaires : les cultures primaires de prélèvements humains (hyperplasies bénignes et cancers de la prostate), les lignées prostatiques cancéreuses androgéno-dépendantes LNCaP, et androgéno-indépendantes LNCaP C4-2, DU145 et PC3 ainsi que les lignées HEK 293 et CHO contrôle (CTL) et surexprimant le canal mTRPV2 (CHOmTRPV2) couramment utilisées pour la surexpression de canaux, dans notre cas, il s'agira respectivement de la forme humaine et murine du canal TRPV2.

A. LES LIGNEES CELLULAIRES

1. Lignée cellulaire cancéreuse prostatique androgéno-dépendante LNCaP

Cette lignée (clone FGC ; CRL 1740,) est commercialisée par l'ATCC (American Type Cell Collection, USA) et est commercialisée au laboratoire. Il s'agit d'une lignée établie à partir d'une biopsie d'un ganglion sous axillaire métastasé pratiquée sur un homme de 50 ans atteint d'un carcinome prostatique. Elle représente le premier stade de la cancérisation pour lequel des traitements et des thérapies sont mises en œuvre actuellement et ont une efficacité plus ou moins bonne. Les LNCaP expriment le PSA et le AR. Ces cellules sont caractérisées par leur androgéno-dépendance : la présence d'androgènes est nécessaire pour maintenir leur prolifération.

2. Lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante LNCaP C4-2

La lignée LNCaP C4-2 provient du laboratoire du Dr F. Cabon et est cultivée au laboratoire. Initialement, cette lignée fut créée par l'équipe de Leland et Chung qui cherchait à développer des lignées dérivées de LNCaP (Thalmann et al., 1994; Wu et al., 1994; Wu et al., 1998b) Celles-ci ont été obtenues par co-injection chez l'animal de cellules LNCaP avec des fibroblastes d'origine osseuse. Quatre lignées ont été obtenues de ces tumeurs chimériques dont la lignée C4-2 établie in vitro est capable in vivo de métastaser au ganglion et parfois à l'os après injection soit orthotopique, soit sous-cutanée. Ces cellules sont caractérisées par leur androgéno-résistance: elles ont acquis la capacité de survivre mais prolifère très faiblement en absence d'androgènes.



3. Lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante DU145

Cette lignée (HTB-81) est également commercialisée par l'ATCC et est cultivée au laboratoire. Elle est établie à partir d'un ganglion métastatique du cerveau d'un patient de 65 ans atteint d'un cancer prostatique mais également d'une leucémie. Elle représente le stade évolué du cancer de la prostate pour lequel à l'heure actuelle aucun traitement efficace n'existe. Les DU145 n'expriment ni le PSA, ni le AR. Ces cellules sont caractérisées par leur hormono-insensibilité: elles ont acquis la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes. Certains auteurs remettent en cause l'origine prostatique de cette lignée étant donné ses caractéristiques et dans la mesure où les métastases cérébrales de cancer de la prostate sont exceptionnelles chez l'homme.

4. Lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante PC3

Cette lignée (CRL-1435) provient de l'ATCC et est cultivée au laboratoire. Elle est établie à partir d'une métastase localisée au niveau des vertèbres lombaires d'un patient caucasien de 62 ans présentant un adénocarcinome prostatique peu différencié. Les PC3 n'expriment ni le PSA, ni le AR. Il s'agit d'une tumeur extrêmement agressive in vivo comme in vitro et qui est caractérisé par son hormono-insensibilité: les PC3 ont acquis la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes. Ces cellules présentent le phénotype des cellules épithéliales intermédiaires précoces.

5. Lignée de surexpression HEK 293

La lignée HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) provient de l'ATCC et est cultivée au laboratoire. C'est une lignée transformée dérivant de cellules rénales corticales d'embryon humain (Simmons, 1990)

6. Lignées de surexpression CHO et CHO_mTRPV2

La lignée CHO (Chinese Ovarian Hamster) dérive de l'ovaire hamster chinois: le griseus de *Cricetulus* et est cultivée au laboratoire. Cette lignée provenant de l'ATCC est utilisée pour des études cytogénétiques en raison de son petit nombre de chromosome et un bon modèle pour l'étude des changements génétiques dans les cellules de mammifères (Guerrant et al., 1974).

La lignée CHOmTRPV2 résulte de l'insertion du plasmide contenant le gène mTRPV2 dans des cellules CHO. Les CHOmTRPV2 surexpriment donc la protéine canal mTRPV2. Cette lignée provient du laboratoire du Dr Rassendren (Montpellier).

B. CONDITIONS DE CULTURE

Les cellules cancéreuses prostatiques sont cultivées dans des flacons plastiques de 75 cm² (Falcon) dans une étuve à 37°C saturée en humidité et enrichie à 5% de CO₂. Ces cellules sont cultivées dans un milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, France) contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Seromed, Strasbourg), de la L-Glutamine (2mM, Sigma, L'Isle d'Abeau, France), et, comme antibiotique, de la Kanamycine (10mg/ml). Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine.

Pour la lignée HEK 293, les conditions de culture sont identiques hormis le milieu de culture utilisé qui est le milieu DMEM-HG (Gibco) complété comme précédemment. Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine.

Pour les lignées CHO, le milieu utilisé est le milieu Ham F12 (Gibco) complété par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, la L-Glutamine est déjà présente et, comme antibiotique, de la Pénicilline-Streptomycine (10mg/ml). Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine.

Conformément aux recommandations de l'ATCC, la fréquence des passages est de un par semaine sauf pour les CHO pour lesquelles le nombre de passage est de deux par semaine. Ce passage s'effectue lorsque les cellules arrivent à environ 80% de confluence, après aspiration du milieu et après un rinçage avec 2ml d'une solution de trypsine-EDTA (0,25%, ICN, USA). Les cellules sont ensuite décollées par une incubation de 5 minutes à 37°C avec 2 ml de cette même solution. L'effet de la trypsine est inhibé par l'ajout de 8 ml de milieu de culture. Après dissociation par pipetages successifs et répétitifs, les cellules sontensemencées dans de nouveaux flacons (20000 à 50000 cellules/ml) pour l'entretien de la culture où les études en Western-blot.

Les cellules peuvent êtreensemencées sur d'autres supports pour une utilisation par différentes techniques : pour les mesure de prolifération cellulaire, les cellules sontensemencées dans des puits de plaques 96 puits (Greiner, Allemagne); pour les études en imagerie calcique ou en apoptose par coloration de Hoechst, les cellules sontensemencées dans des boites de pétrie de 35 mm de diamètre (Greiner, Allemagne) contenant une lamelle de verre de 22 mm de diamètre (Greiner, Allemagne). Pour les études en immunohistochimie,

les cellules sont ensemencées dans des boîtes de pétrie de 35 mm de diamètre (Greiner, Allemagne) contenant 3 lamelles de verre de 10 mm de diamètre (Greiner, Allemagne).

Un lot de cellules ne sera trypsinisé que 10 semaines de suite pour éviter toute dérive du profil génétique.

C. CONGELATION/ DECONGELATION

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 auquel s'ajoute 45% de milieu conditionné de la lignée, filtré deux fois et 10% de DMSO.

Le protocole de décongélation est le suivant:

- * 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 1000rpm.
- * Eliminer le surnageant pour enlever le DMSO de la solution.
- * Ensemencer les cellules dans 10 ml de milieu complet dans un flacon de 75 cm².

D. INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION NEUROENDOCRINE PAR SERUM « DESTEROÏDE »

L'induction de la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP par la déprivation androgénique est obtenue par l'utilisation d'un sérum de veau foetal préalablement déstéroïdé, et d'un milieu RPMI-1640 sans rouge de phénol.

Le sérum de veau foetal décomplémenté est mélangé à du charbon actif (10 % de charbon rapport poids/volume ; Sigma, L'Isle d'Abeau, France) pendant 16 heures à 4°C. Ce mélange

est ensuite centrifugé à 10000 xg pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant récupéré est centrifugé 30 minutes à 27000 xg. Le surnageant résultant de cette dernière centrifugation est passé sur filtre 0,22 µm.

II. MESURE MICROFLUORIMETRIQUE DU CA²⁺ LIBRE INTRACELLULAIRE SUR CELLULE UNIQUE

De nombreuses sondes fluorescentes permettant de mesurer la concentration en ions calcium libres ont été synthétisées depuis l'introduction par Tsien et ses collaborateurs de la sonde Quin2 en 1982. Pour notre travail, nous avons utilisé les sondes calciques Fura-2 (pour les mesures cytoplasmiques) et le Mag-Fura-2 (pour les mesures des taux intraréticulaires).

1. Propriétés physicochimiques des sondes

a. Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2

Le Fura-2 est un composé dérivé du fluorophore stilbène possédant quatre fonctions carboxyles dont l'arrangement spatial octacoordonné est caractéristique des chélateurs de calcium ; EGTA et BAPTA (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Dans notre étude, nous utilisons le Fura-2 sous la forme lipophile et non chargée d'acétoxyméthylester de Fura-2 ou Fura-2/AM, qui peut pénétrer dans la cellule où des estérases cytoplasmiques libèrent par hydrolyse le Fura-2 acide dont la fluorescence est proportionnelle à la concentration en calcium libre.

La liaison du calcium sur la molécule de Fura-2 libre provoque un déplacement du spectre d'excitation sans modification du spectre d'émission (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Le Fura-2 libre de calcium présente un pic d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 380\text{nm}$ (F380) alors que le Fura-2 saturé en calcium présente un pic d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 340\text{nm}$ (F340). Le pic de fluorescence est mesuré dans tous les cas à 510 nm. Ainsi, une augmentation de calcium intracellulaire se traduit par une augmentation de l'émission de fluorescence à 510 nm lorsque le Fura-2 est excité à 340 nm et par une diminution de l'émission de fluorescence lorsque le Fura-2 est excité à 380 nm. De cette façon, le rapport de la fluorescence mesuré pour ces deux longueurs d'ondes d'excitation peut être calculé et utilisé comme une mesure directe du calcium libre après calibration du système.

b. Caractéristiques de la sonde calcique Mag-Fura-2

Le Mag-Fura-2 est un dérivé de Fura-2 possédant les mêmes caractéristiques que celui-ci. Il montre cependant une affinité beaucoup plus faible pour le calcium ($K_d=53\mu M$): il sera sensible dans une gamme de concentration plus élevée, telles que les concentrations intraréticulaires. Nous avons donc utilisé le Mag-Fura-2-AM pour quantifier le calcium libre du réticulum endoplasmique en veillant à éliminer les molécules de sonde restant dans le cytoplasme par perméabilisation des membranes avec la digitonine à 0,5mg/ml.

2. Equipement optique

L'équipement est composé d'un microscope à épifluorescence (Olympus IX 70), d'une lampe au xénon (Applied Imaging, GB), d'une caméra digitale CCD (Charge Coupled Device) 12 bits (MicroMax 5 MHz, Princeton), d'un ordinateur dont le logiciel MetafluorS. O (Universal Imaging) permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des images.

La lampe au xénon émet de la lumière dont la longueur est réglée à l'aide d'un filtre monochromateur (Fill Photonics). Les UV cheminent via une fibre optique et traversent les miroirs dichroïques : les signaux à 340 et 380 nm provenant du monochromateur sont orientés spécifiquement vers la préparation cellulaire, tandis que le signal de réponse à 510 nm, provenant de la préparation cellulaire, est orienté spécifiquement vers le caméra digitale. Les signaux lumineux à 510 nm sont capturés par la caméra CCD et convertis en signaux numériques qui sont quantifiés par la système d'analyse et visualisés en fausse couleur en fonction de leur intensité lumineuse sur l'écran de l'ordinateur (gamme allant du bleu au rouge, respectivement pour des concentrations basses à élevées en calcium intracellulaire). La fréquence d'échantillonnage moyenne utilisée est d'une image toutes les 6 secondes (voir figure 29).

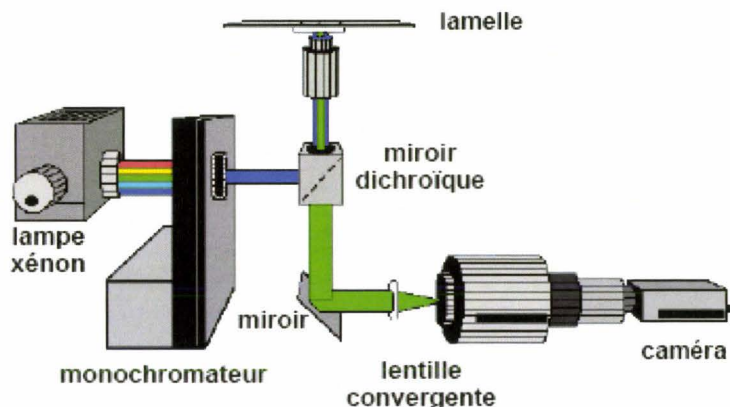


Figure 29 : Schéma représentant l'équipement optique utilisé en imagerie calcique

3. Calibration des signaux de fluorescence

Après soustraction de l'autofluorescence, la formule suivante décrite par Grynkiewicz:

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

nous permet de calculer la concentration intracellulaire en calcium avec :

- K_d : constante de dissociation du complexe Fura-2-calcium, calculé par Grynkiewicz (Grynkiewicz *et al.*, 1985), égale à 225 nM ; Cette constante n'est pas affectée de façon notable par des changements de pH et de la concentration en magnésium dans la gamme physiologique.

- R : rapport des intensités de fluorescence (F340/F380).

- R_{max} : rapport maximum F340/F380 lorsque le Fura-2 est saturé en calcium.

- R_{min} : rapport minimum F340/F380 lorsque le Fura-2 est sous forme libre.

- β : rapport du signal fluorescent, pour une longueur d'onde $\lambda = 380$ nm, en absence de calcium et à saturation : F380 fura-2 libre/F380 Fura-2 saturé.

Le calcul des constantes de calibration (R_{min} , R_{max} , β) se fait par exposition de cellules chargées en Fura-2/AM à 5 μ M de ionomycine (ionophore calcique qui permet d'égaliser les concentrations extra et intracellulaires en calcium) en présence de 10mM de EGTA pour la détermination du R_{min} ou de 10mM de $CaCl_2$ pour la détermination du R_{max} .

4. Milieu d'enregistrement

Nous utilisons pour les mesures de calcium un milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) composé d'H2O distillé complété par, en mM, NaCl (142.6), KCl (5.6), Na_2HPO_4 (0.34), KH_2HPO_4 (0.44), Glucose (5.6), $NaHCO_3$ (4.2), HEPES (10). La solution standard : HBSS $2Ca^{2+}$ est obtenue par l'addition de 2mM de $CaCl_2$ et de 1mM de $MgCl_2$ alors que la solution sans calcium HBSS $0Ca^{2+}$ est obtenue par l'addition de 3mM de $MgCl_2$; ces solutions sont utilisées à pH 7.3-7.4.

5. Charge des cellules en Fura-2/AM et Mag-Fura-2

Les cellules cancéreuses prostatiques sont chargées pendant 45 minutes, à 37°C avec 2 μ M de (Mag) Fura-2/AM. La charge est obtenue de la façon suivante : le milieu de culture est remplacé par une solution de HBSS contenant 2 μ M de (Mag) Fura-2/AM. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 45 minutes. Le temps de charge écoulé, elles sont soumises à 3 rinçages successifs avec du milieu utilisé pour l'enregistrement.

Pour les lignées HEK 293 et CHO, le protocole diffère quelque peu. En effet, les premières ont tendance à se décoller facilement et les secondes se chargent très mal. C'est

pourquoi, le milieu de charge utilisé est le milieu de culture propre à chaque lignée. Pour le reste, les paramètres ne diffèrent pas de ceux précédemment présentés.

Chaque cellule présente alors une charge relativement homogène indiquant ainsi que le Fura-2 ne pénètre pas dans les organites intracellulaires connus pour stocker le calcium interne. Pour le Mag-Fura-2, après perméabilisation des membranes par la digitonine à 0,5mg/ml pour éliminer les molécules de sonde contenues dans le cytoplasme, les cellules présentent alors une charge relativement homogène au sein du réticulum.

6. Estimation du calcium libre réticulaire avec la sonde calcique Mag-Fura-2

Après avoir chargé les cellules avec la sonde Mag-Fura-2, nous perméabilisons les membranes avec la digitonine à 0,5mg/ml ce qui permet de ne conserver que les molécules de sonde piégées dans le réticulum, et ainsi de quantifier le calcium libre réticulaire.

III. MESURE DE VIABILITE CELLULAIRE.

Le kit de mesure de prolifération utilisé (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) est une méthode colorimétrique pour déterminer le nombre de cellules viables. Le kit de dosage 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 Turkey-Kramer grâce au logiciel GraphPad InStattm (GraphPad Software, V2.04), en considérant $P < 0,05$ comme significatif.

IV. MESURE DE L'APOPTOSE PAR LA TECHNIQUE D'HOESCHT

Le bisbenzimidazole (Hoescht 33528 Sigma) est un agent intercalant de l'ADN permettant la visualisation de la chromatine en microscopie à fluorescence. Pour ce faire, les cellules cultivées sur des lamelles traitées au collagène sont fixées au méthanol (-20°C) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite rincées trois fois au PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), et incubées à l'obscurité avec la solution de Hoescht (1mg/ml), pendant 30 minutes à température ambiante. Après ces 30 minutes d'incubation, la solution de Hoescht est aspirée

et les cellules sont de nouveau rincées 2 fois par du PBS 1X. Les lamelles sont alors montées sur lame (au glycerol) et conservées à l'obscurité. Les différentes morphologies des noyaux apoptotiques telles que la condensation périnucléaire de la chromatine, l'hyper-condensation de la chromatine et la formation de vésicules apoptotiques, sont observées au microscope à épifluorescence Olympus BH2 à une longueur d'onde d'excitation de 435nm.

V. TRANSFECTION TRANSITOIRE

1. Lipofection

Les transfections de plasmide ou de siARN (petits ARN interférants) par lipofection furent réalisées avec le Geneporter™2 (Gene Therapy System). 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 complété est ajouté sur les cellules pendant une demi-journée. Le milieu est ensuite remplacé par du nouveau milieu complété. 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 JetSI™-ENDO (Polyplus transfection). Le principe de ces lipofecants reste le même.

Afin de déterminer lequel était le plus approprié, un test de transfection a été réalisé avec un siARN contrôle couplé à la fluorescéine dans la lignée LNCaP. Ce test comparant le Geneporter™2, le JetSI™-ENDO a permis de valider leur efficacité.

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 nucléique 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 76 culottées par centrifugation puis reprises dans 100 µL 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 72 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:

Lignée	Tampon	Programme
HEK	V	A23
LNCaP	R	T009
DU-145	L	A23
PC-3	V	T013

VI. MESURE DE L'EXPRESSION D'ARN MESSAGERS (ARNM)

1. Récupération des cellules et extraction des ARNm

Toutes les solutions utilisées sont « RNase free ». Les ARN totaux des cellules sont extraits selon la méthode décrite par Chomczynski (Chomczynski P and Sacchi N 1987).

* Rinçage les cellules avec du tampon PBS stérile à 4°C puis décollement des cellules avec une solution de PBS+EDTA 0,54mM.

* 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.

* Ajouter pour $1,5$ à 2×10^6 cellules 563µl de solution D +2β mercapto-éthanol 0,7% (la solution devient visqueuse), puis aspirer et refouler plusieurs fois avec une seringue de 1ml + 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 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'H₂O, vortexer, puis doser avec le biophotomètre.

2. 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.

3. 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.

4. 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

5. 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					

Le résultat de al PCR est ensuite visualisé sur un gel d'agarose avec Bet (Bromure d'ethidium).

VII. IMMUNODETECTION

A. EXTRACTION DES PROTEINES

Après un lavage au PBS, le tapis cellueaire 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 (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) selon les recommandations du fournisseur.

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 000ème (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 densimétrie, 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.

C. 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 et pour se faire, j'ai 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 prostatiques comme les lignées LNCaP normales et C4-2 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 consiste à incuber la lamelle 10 min sur la glace dans du PFA 4%.

Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois 10mn dans du PBS puis sont mises à saturer dans du PBS-gélatine (Phosphate Buffered Saline –gélatine 1.2%) pendant 30 minutes à 37°C pour éviter les fixations aspécifiques. Les cellules sont mises à incuber avec les anticorps primaires souhaités dans du PBS-gélatine pendant 1 heure à température ambiante. Elles sont ensuite rincées dans du PBS-gélatine plusieurs fois et mises à incuber avec les anticorps secondaires correspondants couplés à la FITC pendant 1 heure à température ambiante dans du PBS-gélatine. Avant montage dans du Mowiol®, l'ensemble est rincé une fois dans du PBS-gélatine et deux fois dans du PBS. Les cellules sont enfin observées à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss LSM 510). Les paramètres d'acquisition sont identiques et fixes pour permettre les comparaisons d'intensité en immunofluorescence.

D. IMMUNOHISTOCHEMIE

Les immunohistochimies ont été réalisées sur des coupes de tissus congelées dans du tissu tek. Les coupes en tissu-tek sont directement découpées puis prêtes à l'emploi. 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.

E. 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).

VIII. ANALYSE DES DONNEES

Les résultats sont exprimés en terme de moyenne \pm SEM. Les courbes sont réalisées grâce au logiciel Origin 5.0 (Microcal Software, Inc). Chaque expérience a été réalisée plusieurs fois. L'analyse statistique des résultats de prolifération est effectuée avec le test de Turkey-Kramer grâce au logiciel GraphPad InStattm (GraphPad Software, V2.04), en considérant $P < 0,05$ comme significatif (*) et $P < 0,001$ comme très significatif (***)

Résultats

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

Cette partie est scindée en trois chapitres. Nous commencerons par traiter de l'évolution de l'homéostasie calcique lors de la croissance et de la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques. Nous poursuivrons avec l'étude de la fonctionnalité et de l'activation du canal calcique TRPV2. Enfin, nous finirons avec la description du rôle de TRPV2 dans l'évolution du cancer prostatique vers la différenciation neuroendocrine.

CHAPITRE 1

ARTICLE 1

LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES LNCAP EST UN POINT DE CONTROLE DE LA VIE ET DE LA MORT CELLULAIRE

Cet article auquel j'ai collaboré, montre pour la première fois que les mécanismes calciques impliqués dans le contrôle de la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques sont différents.

En effet, la première partie des résultats montre qu'une modulation, positive ou négative, stable du contenu des stocks calciques intracellulaires par les facteurs de croissance EGF, IGF-I et TNF-alpha qui régulent l'expression des protéines SERCAs, ou par des outils pharmacologiques (TG), provoque une modification, dans le même sens, du taux de prolifération dont l'amplitude est proportionnelle au taux de Ca^{2+} intraréticulaire. Par contre, des modifications transitoires du contenu de ces stocks calciques ne perturbent pas la prolifération de ces cellules.

De plus la seconde partie des résultats montre que l'apoptose des cellules LNCaP peut quant à elle, être induite par des modifications stables ou transitoires du contenu des stocks calciques intracellulaires, mais uniquement par des agents qui provoquent une réduction massive de ce contenu.

Ainsi, les résultats présentés dans cet article élucident pour la première fois une partie du mécanisme qui lie les stocks calciques intracellulaires à la croissance et la mort cellulaire, et met en avant la cinétique et l'amplitude des modification du contenu de ces stocks dans le phénomène qui conduit la cellule vers la vie ou la mort. En outre, ayant montré que l'IGF-I l'EGF et le TNF-alpha régulent l'expression des protéines SERCAs, ce phénomène semble bien être au centre du mécanisme par lequel les agents physiologiques contrôlent la croissance des cellules LNCaP.

Role of Endoplasmic Reticulum Calcium Content in Prostate Cancer Cell Growth Regulation by IGF and TNFalpha

SANDRINE HUMEZ,^{1,2*} GUILLAUME LEGRAND,¹ FABIEN VANDEN-ABEELE,¹ MICHAËL MONET,¹ PHILIPPE MARCHETTI,³ GILBERT LEPAGE,¹ ALEXANDRE CREPIN,¹ ETIENNE DEWAILLY,¹ FRANK WUYTACK,⁴ AND NATALIA PREVARSKAYA¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM EMI 0228, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

²Université d'Artois, Faculté Jean Perrin, Rue Jean Souvraz, Lens, France

³INERM U459, Faculté de médecine, 1 place Verdun, Cedex, Lille, France

⁴Laboratorium voor Fysiologie, Dept Molecular Cell Biology, K. U. Leuven, Campus Gasthuisberg Herestraat Leuven, Belgium

Variations in calcium concentration within the endoplasmic reticulum ($[Ca^{2+}]_{ER}$) may play a role in cell growth. This study evaluates the regulation of calcium pools by growth modulators of prostate cancer (PC) cells, the insulin growth factor (IGF), and the tumor necrosis growth factor-alpha (TNFalpha) as well as evaluating the possible role of $[Ca^{2+}]_{ER}$ variations as signals for growth modulation. We show that IGF (5 ng/ml), which increases cell growth, induces an increase in $[Ca^{2+}]_{ER}$ whereas TNFalpha (1 ng/ml) which reduces cell proliferation and induces apoptosis, reduces $[Ca^{2+}]_{ER}$. IGF-induced $[Ca^{2+}]_{ER}$ increase is correlated to an overexpression of the sarcoendoplasmic calcium-ATPase 2B (SERCA2b), whereas TNFalpha-induced $[Ca^{2+}]_{ER}$ decrease is associated to a reduction in SERCA2b expression. Pretreatment with epidermal growth factors (EGF) or IGF does not prevent TNFalpha from affecting the induction of apoptosis, $[Ca^{2+}]_{ER}$ reduction and SERCA2b downregulation. Reduction in $[Ca^{2+}]_{ER}$ induced by thapsigargin (TG) (from 1 pM to 1 μM, 48 h) reduces LNCaP growth in a dose dependent manner and induces apoptosis when cells are treated with 1 μM TG. We also show that a transient TG application (1 pM, 1 nM, 1 μM 15 min) is insufficient to induce a long lasting decrease in $[Ca^{2+}]_{ER}$, since $[Ca^{2+}]_{ER}$ remains identical to the control for 48 h following TG application. These treatments (1 pM and 1 nM, 15 min) do not modify cell growth. However, TG (1 μM, 15 min) induces apoptosis. We thus identify $[Ca^{2+}]_{ER}$ and SERCA2b as a central targets for causing LNCaP PC cell life or death induced by growth modulators. Furthermore our results indicate that calcium pool contents can regulate cell growth. J. Cell. Physiol. 201: 201–213, 2004.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

Calcium (Ca^{2+}) homeostasis modulation is a mechanism common to a number of signal transduction pathways that regulates a wide range of cell phenomena. Cytosolic Ca^{2+} is known to control numerous cell functions, including contraction, gene expression, and proliferation (Berridge, 1995). The maintenance of Ca^{2+} levels within the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) is another critical factor for cell growth (Waldron et al., 1994). The ER is a dynamic environment perfectly designed for protein synthesis, posttranslational modifications, and folding. Moreover, the maintenance of high intraluminal Ca^{2+} is essential for these processes (Michalak et al., 1998). Therefore, alterations in the Ca^{2+} concentration within the ER ($[Ca^{2+}]_{ER}$) may destabilize the physiological balance of the ER lumen and influence normal cell growth.

Sandrine Humez and Guillaume Legrand contributed equally to the results of this study.

Contract grant sponsor: INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale); Contract grant sponsor: ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer).

*Correspondence to: Sandrine Humez, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM EMI 0228, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bât. SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. E-mail: sandrine.humez@univ-lille1.fr

Received 7 July 2003; Accepted 22 December 2003

DOI: 10.1002/jcp.20049

It is now well established that cancer cell net growth is characterized by the balance of two opposite processes: (i) progression through the cell cycle, inducing proliferation, and (ii) apoptosis, or programmed cell death. Interestingly, the Ca^{2+} content of intracellular pools has been shown to control both progression through the cell cycle (Short et al., 1993) and apoptosis (Preston et al., 1997). Previous research in our laboratory has demonstrated the crucial role played by Ca^{2+} pools in prostate cancer (PC) cell development. Indeed, on the one hand, we have shown that depletion of the intracellular Ca^{2+} stores in androgen-sensitive LNCaP PC cells by thapsigargin (TG) is sufficient to trigger apoptosis without any participation of extracellular Ca^{2+} (Skryma et al., 2000). On the other hand, we also clearly demonstrated that Ca^{2+} pool content controlled cell growth in LNCaP cells and that sarco-enoplasmic Ca^{2+} -ATPases (SERCAs), proteins responsible for Ca^{2+} uptake within the ER, play an important role in epidermal growth factor (EGF) induced cell proliferation (Legrand et al., 2001). This intriguing pattern established the potential differential involvement of the mechanisms controlling $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ in cell proliferation and/or apoptosis. However, it is still unclear how a single event, Ca^{2+} store modulation, can control two of the most important phenomena in cell life and death: growth and apoptosis. Moreover, whereas many studies have described the relationship between artificial Ca^{2+} -pool depletion (using such pharmacological tools as Ca^{2+} ionophore or TG) and apoptosis, there is no available data concerning the potential role of changes in Ca^{2+} pool content in apoptosis control by physiological agents such as growth factors (GFs) and cytokines.

Our study therefore aimed to (i) characterize the regulation of Ca^{2+} stores by GFs and cytokines and (ii) elucidate the role of Ca^{2+} pool modulation as a signal for growth modulation in human PC cells.

We used insulin-like growth factor-1 (IGF1) and tumor necrosis factor- α (TNF α) as growth regulators, since it is now well established that human prostate growth is regulated by GFs and cytokines, and that progression to PC is correlated with the deregulation of these biological agents' signaling behavior (Sokoloff et al., 1996; Djakiew, 2000; Smith et al., 2001). Studies have shown that IGFs are potent mitogens for a variety of cancer cells, including PC, as they stimulate cancer cell growth and suppress programmed cell death (Djavan et al., 2001). Moreover, high circulating levels of IGF1 are associated with an increased risk of PC (Shi et al., 2001). On the other hand, it is now well established that cytokine TNF α is a growth regulator of numerous cell lines. It has also been shown to inhibit PC cell line proliferation in vitro (Nakajima et al., 1995) and in xenografted mice in vivo (van Moorselaar et al., 1991). GFs and cytokines and in particular IGF1 and TNF α , thus appear to be crucial physiological regulators of cell growth and cell death in PC cells.

The results reported in this study reveal that Ca^{2+} pool content and SERCA expression are targets of growth modulators such as GFs and cytokines. We also characterize the way in which intraluminal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ participates in cell growth control given that the growth of LNCaP cells is proportionally controlled by the stable

filling state of Ca^{2+} store content. A stable modulation of these stores by physiological agents or pharmacological tools is always linked to a proportional modulation of cell growth. Apoptosis-inducing factors such as TNF α also reduce Ca^{2+} store content. However, our results clearly demonstrate that the mechanisms by which $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ is involved in apoptosis are critically different from those of cell growth control: apoptosis was induced only when Ca^{2+} pools were dramatically depleted, even transiently, whereas a slight modulation in the store had no effect on cell viability. Thus, this article elucidates a part of the mechanism linking Ca^{2+} pool homeostasis, cell growth, and apoptosis, highlighting the kinetics of Ca^{2+} store modulation and the filling state of Ca^{2+} pool content as crucial parameters in cells' life or death.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The androgen-sensitive human PC cell line LNCaP, obtained from the American Type Culture Collection was kept in culture in RPMI 1640 medium (Gibco-Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France) and 5 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France). Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Prior to fluorescence measurements, the cells were trypsinized and transferred to glass slips. Cells were used 1–4 days after trypsinization. The medium was replaced every 48 h.

Proliferation assays

The assay medium was the same as that used for culture, but supplemented with 2% fetal calf serum. The 6-well plates (Nunc, Applera, France) had a final volume of 2 ml and were assayed 48 h after seeding. LNCaP were cultured at 4×10^4 cells per well for 3 or 4 days of treatment with or without reagents, as indicated. Proliferation was determined by cell counting. The medium was replaced every 48 h.

Determination of apoptosis with Hoechst staining

Cells were cultured on glass slips. After treatment, they were fixed in cold methanol (-20°C) for 10 min and washed twice with PBS before staining with 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 for 30 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and mounted with coverslips, using glycerol. Apoptotic cells exhibiting condensed and fragmented nuclei were counted under an Olympus-BH2 fluorescent microscope. At least 500 adherent cells were examined for each case and the results were expressed as the number of apoptotic cells over the total number of cells counted. For experiments presented in Figures 6 and 8, cells were collected into a PBS-EGTA (0.54 mM) buffer and plated on slides using cytospin (Shandon, Pittsburg, PA) before staining.

TUNEL measurement of DNA fragmentation

Cells were collected into a PBS-EGTA (0.54 mM) buffer and plated on slides using cytospin (Shandon). Apoptotic DNA fragmentation was detected, using the TUNEL assay according to the manufacturer's recommendations (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche, Meylan, France). Cells were fixed at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS pH 7.4.

After 1 h of incubation slides were washed with PBS and the blocking solution (3% H₂O₂ in methanol) was added for 10 min at room temperature and then rinsed with PBS. Slides were then treated with a permeabilization solution (0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate) for 2 min on ice and washed twice with PBS. The TUNEL reaction mixture were added for a 1 h incubation period in a humidified chamber at 37°C and then rinsed three times with PBS. Samples were analyzed in a drop of PBS under a fluorescence microscope and the cells were then counted.

DNA-fragmentation analysis

After various treatments, the cells (2×10^6 cells per sample) were harvested and gently homogenized in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 200 μ g proteinase K. Cells homogenates were then incubated at 37°C for 6 h. DNA was subsequently extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and precipitated overnight with an equal volume of isopropyl alcohol, pelleted and resuspended in Tris-HCl-EDTA (TE) buffer containing 20 μ g/ml RNase. The resulting DNA was quantitated spectroscopically, and 10 μ g of DNA were analyzed for fragmentation assay on a 1.8% agarose gel. The gel was then stained with ethidium bromide and visualized using a UV light source.

Analysis of cell cycle and apoptotic rate by flow cytometry

Flow cytometry was used to analyze cell cycle and apoptosis, as previously described (Zamzami et al., 1995). In short, cells were fixed overnight at 4°C with 70% ice-cold ethanol/PBS followed by propidium iodide (PI, 50 μ g/ml) staining and analyzed in a Coulter XL cytofluorometer. Cell cycle compartments were deconvoluted from a single-parameter DNA histogram of 30,000 events using the WINCYCLE 32 (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA) after the exclusion of cell doublets. The results were expressed as a percentage of cell population. A significant proportion of apoptotic cells were lost, due to the repeated washing procedures, so the apoptosis measured with flow cytometry is therefore under estimated.

Ca²⁺ measurements using Fura-2 AM

The culture medium was replaced by an HBSS solution containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of this solution were adjusted to 310 mOsm l⁻¹ and 7.4, respectively. When a Ca²⁺ free medium was required, CaCl₂ was omitted and replaced by equimolar MgCl₂. Dye loading was achieved by transferring the cells into a standard HBSS solution containing 1 μ M Fura-2 AM (Calbiochem, Meudon, France) for 40 min at 37°C, then rinsing them three times with dye free solution. Intracellular Ca²⁺ was measured by an imaging system (Princeton, Evry, France). The glass cover slip was mounted in a chamber on a Olympus microscope equipped for fluorescence. Fura-2 fluorescence was excited at 340 and 380 nm and emitted fluorescence was measured at 510 nm. The [Ca²⁺]_{cyt} concentration was derived from the ratio of the

fluorescence intensities for each of the excitation wavelengths (F340/F380), and from the Grynkiewicz equation ($K_d \cdot \beta = 224$ nM, $R_{\min} = 0.18$, and $R_{\max} = 1.7$). All recordings were made at room temperature. The cells were continuously perfused with HBSS solution and chemicals were added via a whole-chamber perfusion system. The flow rate of the whole-chamber perfusion system was set to 1 ml/min and the chamber volume was 500 μ l.

Direct quantification of [Ca²⁺]_{ER}

In order to obtain images of Ca²⁺ within the ER, LNCaP cells were loaded with 2 μ M of the AM-ester derivative of Mag Fura-2 (Mag Fura-2) for 45 min at 37°C. After incubation with the dye, the cells were rinsed briefly in a high K⁺ solution (in mM): 125 KCl, 25 NaCl, 10 HEPES, 0.1 MgCl₂ (pH 7.2), and then exposed for 2 min to an "intracellular buffer" at 37°C and 5 μ g/ml digitonin. Digitonin permeabilized cells were continuously superfused with a digitonin-free "intracellular buffer" supplemented with 0.2 mM Mg-ATP and free [Ca²⁺] clamped to 170 nM using a Ca²⁺/EGTA buffer. The Mag Fura-2 fluorescence ratio was calibrated using exposure to 10 μ M ionomycin and 15 mM Ca²⁺ or 10 mM EGTA, assuming a dissociation constant for Ca²⁺-Mag Fura-2 at room temperature of 53 μ M (Hofer and Schulz, 1996). Ratio imaging measurements of Mag Fura-2 fluorescence were obtained using an imaging system (Princeton).

Immunocytochemistry

The cells were seeded on glass coverslips and grown to 70–80% confluence. They were then fixed in cold acetone for 15 min at –20°C. The coverslips were washed several times with PBS, blocked with 1.2% gelatin in PBS (PBSG) for 30 min to avoid non specific binding, and subsequently incubated overnight at 4°C in 100% humidity with the primary antibodies for SERCA2b (polyclonal rabbit IgG, gift from Prof. Frank Wuytack) or CRT (polyclonal rabbit IgG, SPA-600, Stressgen, Victoria, BC, Canada). The slides were washed several times with PBSG, incubated for 1 h at 37°C with secondary antibodies (donkey anti-rabbit IgG labeled with FITC, Jackson, West Grove, PA), washed with PBS and mounted in Mowiol. The sections were observed under a Zeiss Axiophot microscope equipped with epifluorescence (excitation: 450–490 nm, emission: 520 nm). Negative controls consisted in the omission of the primary antibody.

Western blot

Following treatments, LNCaP cells were rinsed with a NaCl solution (150 mM) and lysed in an ice-cold homogenizing buffer (pH 7.2) containing 20 mM PO₄Na₂K, 1% Triton X-100, 1% sodium desoxycholate, 5 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma) for 30 min. The homogenates were cleared by a centrifugation at 900g for 10 min and the protein content in the supernatants was determined using the BCA method (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL). Four micrograms of the total proteins of each sample were analyzed on a 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. After transfer onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry electroblotter, the membrane was cut

into thin strips that were further processed for immunodetection. The strips were blocked in 5% non-fat dry milk in TBST (15 mM Tris buffer (pH 8), 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20), washed three times, then incubated with the mouse antibody: anti SERCA2b (from Prof. Frank Wuytack). After washing, blots were incubated for 1 h with the corresponding horseradich peroxidase-linked secondary antibody and processed for chemoluminescent substrate (Pierce) according to the manufacturer's instructions. The blots were then exposed to X-Omat AR films (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

Data analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Plots were produced using origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Each experiment was repeated several times, *n* indicates the number of cells used to express mean and SEM and *N* the number of experiments. The Turkey-Kramer test was used for statistical comparison of means and differences and $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

IGF1 stimulates LNCaP cell growth

IGF1 stimulates LNCaP cell growth in a dose-dependent manner (Fig. 1A, $N = 5$). Proliferative assays showed that 0.5–20 ng/ml IGF1 increased cell growth after 4 days of treatment, as estimated by cell counting. The maximal effect was observed at a dose of 5 ng/ml. At this concentration, IGF1 induced an increase corresponding to $145 \pm 3\%$ of the total number of cells under control conditions ($N = 5$).

TNFalpha inhibits cell growth, and prevents IGF1 from stimulating LNCaP cell growth

TNFalpha at doses of 0.1–10 ng/ml inhibited LNCaP cell growth in a dose-dependent manner after 4 days of treatment (Fig. 1B). The maximal effect was observed at a dose of 1 ng/ml. At this concentration, TNFalpha induced a decrease corresponding to $57 \pm 2\%$ of the total number of cells, under control conditions ($N = 5$).

Moreover, TNFalpha prevented IGF1 from stimulating LNCaP cell growth (Fig. 1C). Indeed, treating LNCaP cells with 1 ng/ml TNFalpha combined with 5 ng/ml IGF1 did not affect cell growth as compared to treatment with TNFalpha alone. The total cell number after 4 days of treatment was $56 \pm 2\%$ of control for IGF1/TNFalpha treated cells ($N = 5$), i.e., not statistically different from cell culture with TNFalpha alone. As we had previously shown that 2 ng/ml EGF stimulates LNCaP cell growth, with a maximal effect after 4 days of treatment (Legrand et al., 2001), we also investigated the effect of TNFalpha on EGF-induced cell growth. Our results showed that TNFalpha also prevented EGF from stimulating cell growth (Fig. 1C).

TNFalpha induces apoptosis in LNCaP cells

TNFalpha also increases the level of apoptosis in LNCaP cells (Fig. 2). Apoptosis assays using Hoechst staining showed that a 4-day treatment of LNCaP cells with 1 ng/ml TNFalpha resulted in apoptosis for $7 \pm 1\%$ ($N = 5$) of cells, compared to less than 1% apoptosis in controls. Treatment with EGF (2 ng/ml) or IGF1 (5 ng/ml) combined with TNFalpha (1 ng/ml) did not protect

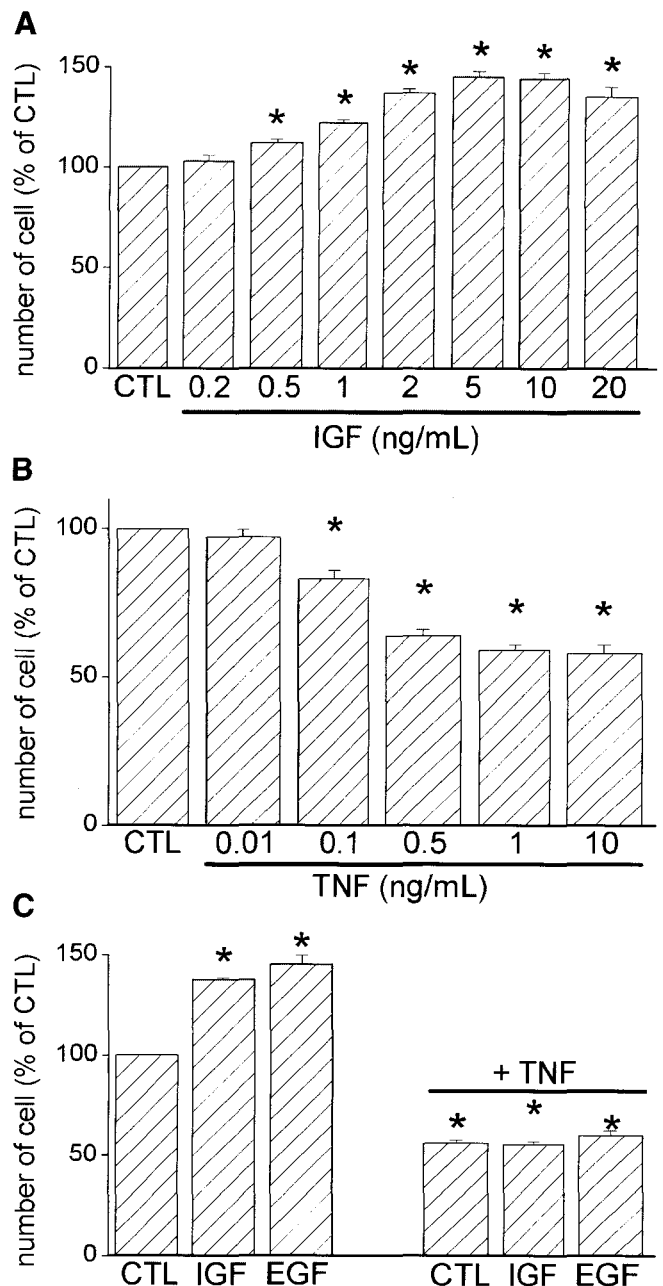


Fig. 1. Insulin growth factor (IGF) and tumor necrosis growth factor-alpha (TNFalpha) regulated LNCaP cell growth. Cells were seeded in 6-well plates containing 2 ml culture medium supplemented with 10% fetal calf serum at a density of 4×10^4 cells per well. On the following day, the medium was replaced by a medium containing 2% serum supplemented with the indicated doses of IGF1 and TNFalpha. The medium was replaced every 48 h. After 4 days of treatment, the number of cells in each well was counted. The effect of IGF1 (A) and TNFalpha (B) on LNCaP cell growth was investigated for doses between 0.2 and 20 ng/ml, and between 0.01 and 10 ng/ml, respectively. When cells are treated with epidermal growth factor (EGF) 2 ng/ml or IGF1 5 ng/ml combined with TNFalpha 1 ng/ml (C), TNFalpha prevents growth factors from stimulating LNCaP cell growth.

cells from the TNFalpha-induced apoptosis, as TNFalpha treatment combined with EGF or IGF resulted in $6.6 \pm 1\%$ and $6.8 \pm 1\%$ of apoptotic cells, respectively.

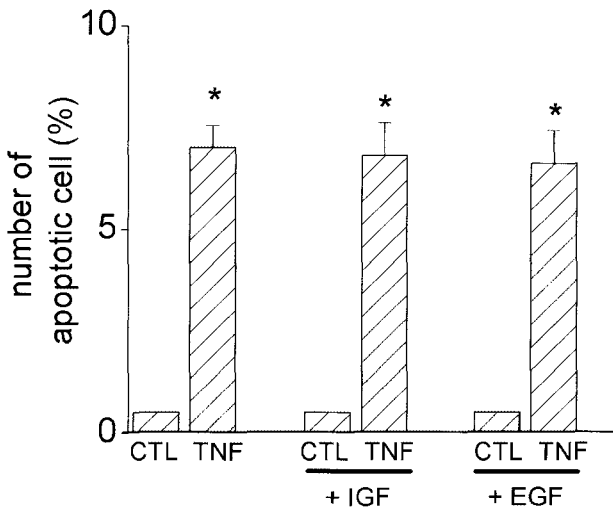


Fig. 2. TNF induces apoptosis in LNCaP cell line. Apoptosis was labeled using the Hoechst staining method. Cells were seeded on glass slips in a medium supplemented with 10% fetal calf serum at a density of 2×10^4 cells per dish. On the following day, the medium was replaced by a medium containing 2% serum (CTL) supplemented with 1 ng/ml TNFalpha for 48 h (TNF). Protecting effects of growth factors were investigated by treating cells with 2 ng/ml EGF (EGF) or 5 ng/ml IGF (IGF) for 48 h before adding 1 ng/ml TNFalpha combined with EGF (TNF/EGF) or IGF (TNF/IGF).

Our results thus showed that IGF1, EGF, and TNFalpha are physiological agents that control LNCaP cell growth and indicate that these agents are good tools for studying the effects of physiological agents that increase or decrease cell growth in the state of calcium homeostasis in LNCaP cells.

LNCaP cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_{cyt}) is not altered by IGF or TNFalpha

As [Ca²⁺]_{cyt} has been reported to be essential for cell growth in several cell lines, we investigated the effect of IGF1 and TNFalpha on LNCaP cells [Ca²⁺]_{cyt}. Our experiments, using 5 ng/ml IGF1 or 1 ng/ml TNFalpha (optimal doses for modulating LNCaP cell growth), failed to demonstrate either short- (30 min) or long-term (2 and 4 days) modulation of [Ca²⁺]_{cyt} (data not shown). [Ca²⁺]_{cyt} was not statistically different from control values under our experimental conditions (81 ± 15 nM, $n = 237$, $N = 7$).

IGF increases, whereas TNFalpha decreases the amount of Ca²⁺ within the ER

Maintaining Ca²⁺ homeostasis within the ER is essential for cell growth in several cell lines. Since IGF1 and TNFalpha regulate cell growth and apoptosis in the LNCaP cell line, we investigated the effects of these factors, applied for 4 days, singly or combined, on ER Ca²⁺ content. Estimation of the Ca²⁺ store content was assessed by the TG method. TG, the most potent selective SERCA inhibitor, is often used to estimate Ca²⁺ pool content. In the presence of extracellular Ca²⁺, SERCA inhibition generally results in a biphasic increase in [Ca²⁺]_{cyt}, reflecting a passive Ca²⁺ release through ER leak channels, followed by capacitative Ca²⁺ entry through the plasma membrane Ca²⁺ release activated channels, promoted by store depletion.

In a Ca²⁺ free medium, TG only induces an increase in [Ca²⁺]_{cyt}, due to Ca²⁺ release from intracellular stores. The ER Ca²⁺ content in Fura-2 loaded cells was estimated by measuring the difference between basal [Ca²⁺]_{cyt} and Ca²⁺ peaks induced by TG. Our results show that IGF1 increases the [Ca²⁺]_{ER} (Fig. 3Aa,Bb). At a dose of 5 ng/ml IGF1, when cell growth was most strongly stimulated, the maximal amount of Ca²⁺ released from the ER reached 274 ± 10 nM ($n = 38$, $N = 3$), corresponding to 127% of the release under control conditions (216 ± 7 nM, $n = 47$, $N = 3$). Moreover, at doses that induce apoptosis and inhibit cell growth (1 ng/ml), TNFalpha induced a decrease in the amount of Ca²⁺ released from ER: the amplitude of the TG-induced Ca²⁺ release reached 147 ± 4 nM ($n = 45$, $N = 3$), corresponding to 68% of the amplitude under control conditions (Fig. 3Aa,Bb). These results show that GFs and cytokines modulate ER Ca²⁺ content in PC cells. This ER Ca²⁺ content modulation may be a part of the transduction signal that controls cell growth and apoptosis.

TNFalpha prevents IGF1 and EGF from increasing the amount of Ca²⁺ within the ER

As we had shown that TNFalpha prevented IGF1 from inducing cell growth, we investigated the effect of IGF1 on the ER Ca²⁺ content of TNFalpha-treated cells. Our results clearly showed that, IGF1 increased the amount of Ca²⁺ within the store, whereas TNFalpha prevented this effect, in the same way as it inhibited the effect of IGF on cell growth (Fig. 3). Indeed, when IGF1 (5 ng/ml) was combined with TNFalpha (1 ng/ml), the amplitude of the Ca²⁺ response to TG was unchanged, reaching 133 ± 5 nM ($n = 38$, $N = 3$). As we have previously shown that EGF increases the amount of Ca²⁺ releasable from intracellular stores (Legrand et al., 2001), we investigated the effect of EGF on the ER Ca²⁺ content of TNFalpha-treated cells. Similar to its effect on IGF1, TNFalpha prevented EGF from increasing the amount of Ca²⁺ within the ER (Fig. 3).

Thus our results clearly show that TNF prevents GFs from increasing the ER Ca²⁺ content and thereby stimulating cell growth. Moreover, GFs were unable to protect LNCaP cells from the TNF-induced reduction of ER load, or TNF-induced apoptosis. These results, therefore, suggest that the effects of TNF, IGF1, and EGF on (i) ER Ca²⁺ content, (ii) cell growth, and (iii) apoptosis in LNCaP cells are closely linked.

SERCA protein expression is regulated by IGF1 and TNFalpha

As our results showed that IGF1 and TNFalpha modulated Ca²⁺ pool content in LNCaP cells, we went on to investigate the effect of these growth regulators on the expression of SERCAs, proteins known to play an important role in the maintenance of luminal [Ca²⁺]_{ER} (Stokes and Wagenknecht, 2000). Immunocytochemistry experiments clearly show that over a period of 48 h, IGF1 increases the expression of SERCA2b proteins (Fig. 4B), whereas TNFalpha has an inhibiting effect (Fig. 4D). Moreover, when cells were treated with TNFalpha, IGF was unable to increase SERCA2b expression (Fig. 4E). Furthermore, TNFalpha also prevented EGF from inducing the previously reported

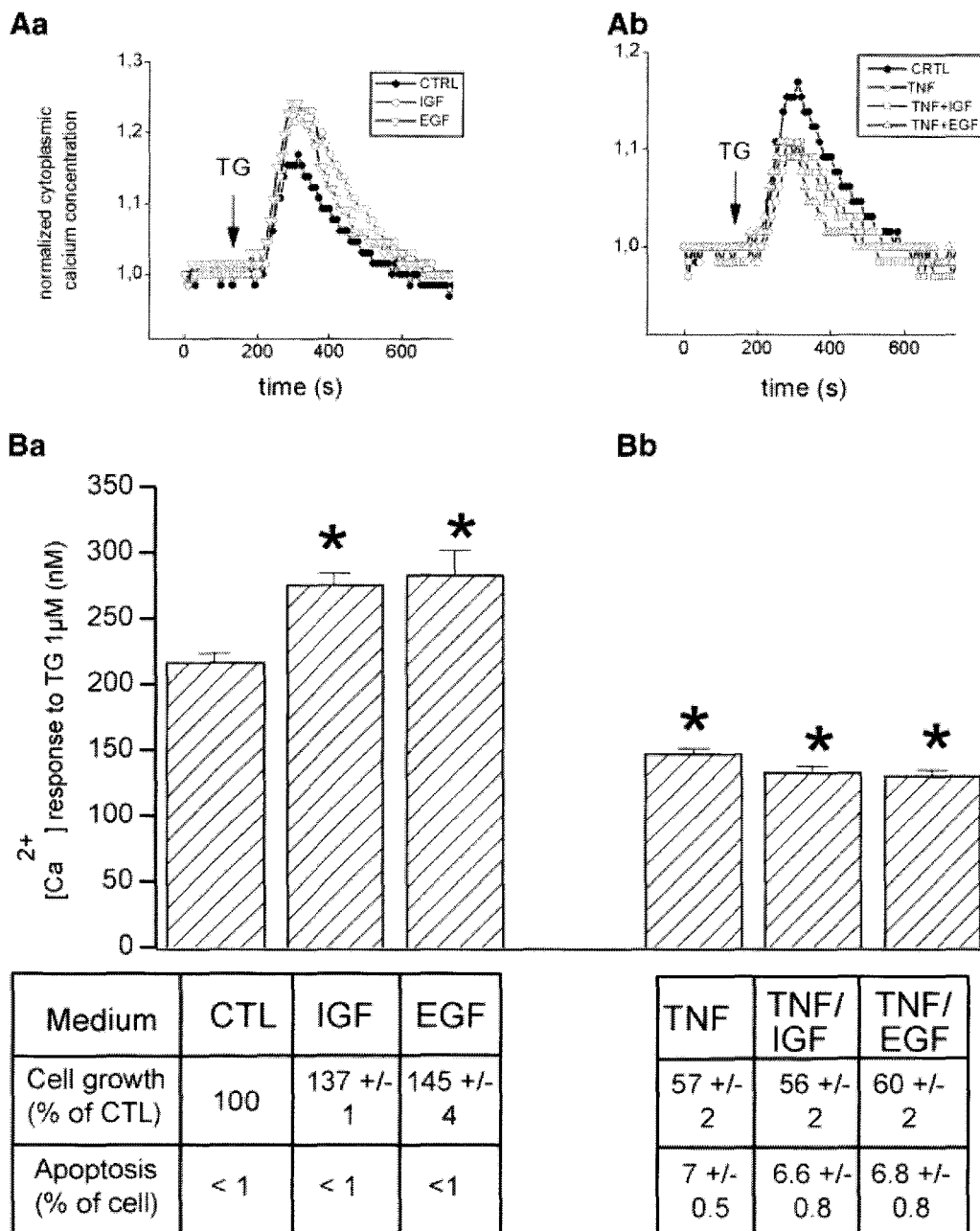


Fig. 3. IGF1 and TNF α regulate the amplitude of the TG-induced Ca^{2+} release from the ER as they regulate cell growth and apoptosis in LNCaP. Cells were cultured for 48 h in medium supplemented with 2% fetal calf serum (CTL) or in medium containing 2% fetal calf serum supplemented with 5 ng/ml IGF (IGF), 2 ng/ml EGF (EGF), and 1 ng/ml alone (TNF) or in combination with GFs (TNF/IGF and TNF/EGF, respectively). Ca^{2+} store content was estimated using the thapsigargin (TG) method. In a Ca^{2+} free medium, TG induces an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ due to Ca^{2+} release from intracellular stores. Endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} content

was estimated by measuring the difference between basal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and Ca^{2+} peaks induced by TG. **A (a and b)**: Increase in cytoplasmic calcium release from intracellular stores induced by 1 μM TG. Values are relative to the basal cytoplasmic calcium concentration. **B (a and b)**: Histograms show the amplitude of the TG-induced Ca^{2+} release reflecting the ER content that was estimated by measuring the difference between basal cytoplasmic calcium and Ca^{2+} peaks induced by TG. The table shows the corresponding growth rate (from Fig. 1) and apoptosis (from Fig. 2).

(Legrand et al., 2001) (Fig. 4C) increase in SERCA2b expression (Fig. 4F). In addition, the analysis of SERCA2b expression (Fig. 4G) by Western blot, confirms that SERCA2b expression increases following IGF and EGF treatments whereas TNF α treatments

reduce SERCA2b expression and prevent EGF and IGF from inducing SERCA2b expression. These results thus show that, in LNCaP human PC cells, SERCA2b are a common target for physiological stimuli that control cell growth.

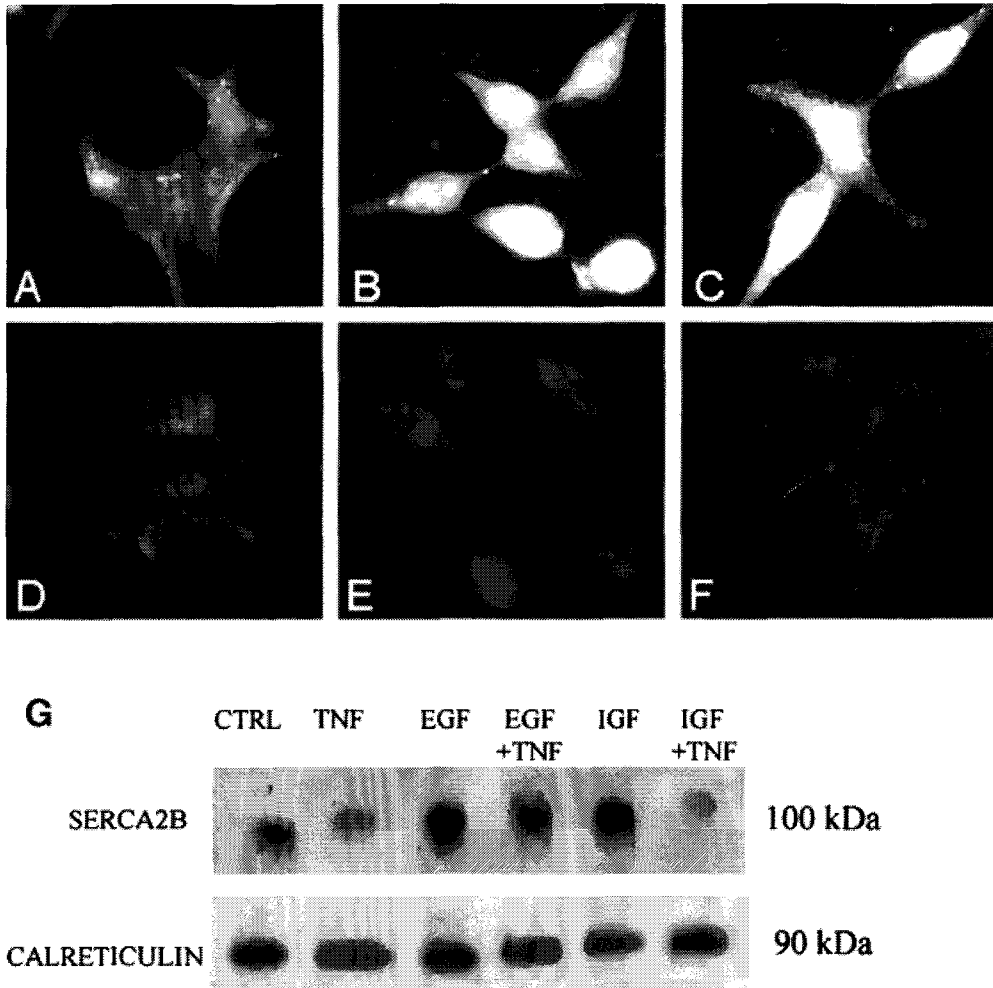


Fig. 4. IGF and TNF α regulate SERCA expression in LNCaP cells. Regulation of SERCA2b proteins expression was investigated by immunocytochemistry after 48 h growth on glass slips, in the indicated media. Assays were performed as indicated in the experimental procedures. SERCA-2b proteins were detected in basal conditions (A) and both 5 ng/ml IGF1 (B) and 2 ng/ml EGF (C) induced overexpression of this protein. 1 ng/ml TNF α induced a

downregulation of SERCA2b protein expression (D) and abolished the effect of both IGF (E) and EGF (F). G: Western blot analysis of SERCA2b expression. Both 5 ng/ml IGF1 and 2 ng/ml EGF induced overexpression of this protein. 1 ng/ml TNF α induced a downregulation of SERCA2b protein expression and abolished the effect of both IGF and EGF.

Effect of TG-induced reduction of Ca²⁺ store content on cell growth and apoptosis

We used several different doses of TG to study the effect of a Ca²⁺ store load reduction on cell growth and apoptosis, and retained three doses for our experiments: 1 μ M, which induced a maximal effect on Ca²⁺ store release (Fig. 5A), not statistically different from higher doses (data not shown); 1 nM, which induced a release corresponding to 45% of the maximum (Fig. 5B); and 1 pM, which induced a release corresponding to 22% of the maximum (Fig. 5C).

We investigated the effect of transient and sustained application of these three doses on (i) Ca²⁺ pool content, measured in Mag Fura-2 AM loaded cells, (ii) cell growth, measured by cell counting, and (iii) apoptosis, labeled by the Hoechst staining method. The basal level of [Ca²⁺]_{ER} was directly assessed using the fluorescent Ca²⁺ indicator, Mag Fura-2-AM. This compartmental-

ized fluorescent dye has been successfully used by us on a previous occasion, in order to monitor changes in free Ca²⁺ within the ER lumen (Vanden Abeele et al., 2002). Imaging experiments with Mag Fura-2-AM were conducted on cells permeabilized by mild digitonin treatment. Figure 6A shows the time course of a typical experiment, involving measurements of [Ca²⁺]_{ER} in prostate cells, in response to Ins(P)₃ (100 μ M). The application of Ins(P)₃ triggered a rapid drop in [Ca²⁺]_{ER} due to an Ins(P)₃-induced release. This was followed by [Ca²⁺]_{ER} recovery after Ins(P)₃ withdrawal, due to Ca²⁺ reuptake into intracellular stores. This recovery demonstrates that stores are still functional after permeabilization. Figure 6B shows a representative image of prostate cells (after permeabilization) loaded with Mag Fura-2-AM demonstrating Ca²⁺ localization in the ER. Our results show that sustained application of TG for 48 h stably modified the amount of Ca²⁺ within the ER (Fig. 6C). This ER Ca²⁺ content seems to be directly

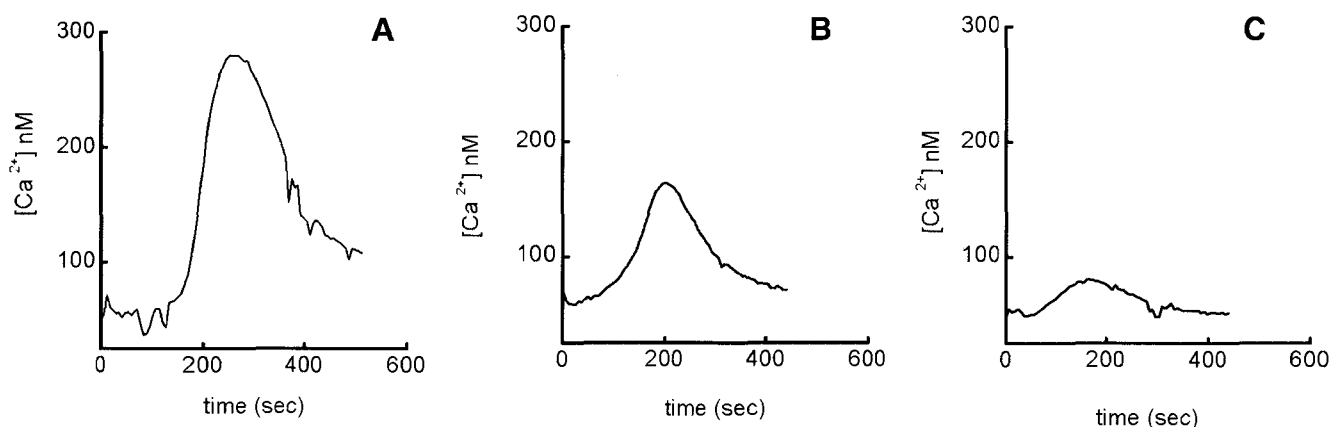


Fig. 5. Effect of TG on the $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ due to Ca^{2+} release from intracellular stores. The effect of TG at several doses was recorded in a Ca^{2+} -free HBSS medium. One micromolar TG (A) induces a maximal Ca^{2+} release from the ER ($n = 41$, $N = 3$), whereas 1 pM, ($n = 43$, $N = 3$) (B), and 1 nM ($n = 39$, $N = 3$) (C) TG induces a release corresponding to 45 and 22% of the maximal mobilization, respectively.

proportional to cell growth: when the Ca^{2+} content corresponded to $45 \pm 2\%$ (48 h of TG 1 μM ; $n = 28$; $N = 2$), $68 \pm 3\%$ (48 h of TG 1 nM, $n = 31$; $N = 2$), and $78 \pm 3\%$ (48 h of TG 1 pM, $n = 27$; $N = 2$) of the content in control conditions (see histograms in Fig. 6C), cell growth corresponded to $46 \pm 5\%$, $61 \pm 9\%$, and $87 \pm 7\%$ of control cell growth, respectively (see table in Fig. 6C). However, a high level of apoptosis (84%, detected with the Hoechst staining) was only detected in cells treated with 1 μM TG for 48 h, whereas a moderate level of apoptosis (4.6%) was detected in cells treated with 1 nM TG for 48 h and a normal level of apoptosis (1.4%) was detected in cells treated with 1 pM TG for 48 h (see table in Fig. 6C). Thus, whilst a sustained 55% reduction in Ca^{2+} store content led to both cell growth inhibition and apoptosis, a 32% reduction in calcium store content led to cell growth inhibition and a moderate induction of apoptosis and a 22% reduction in Ca^{2+} store content inhibited cell growth, but had no effect on apoptosis. To corroborate our results, apoptosis was measured with the TUNEL method and an analysis of the DNA ladder. A 48 h treatment with 1 μM , 1 nM, and 1 pM TG induced respectively 82.7, 4.2, and 1.6% TUNEL-positive nuclei compared to 1.5% TUNEL-positive nuclei observed under control conditions (Fig. 7A,B). Figure 7C shows an electrophoregram of the DNA fragments extracted from cells exposed to TG at different doses, compared to unexposed cells (control, line 3). DNA ladders are seen in lane 4, corresponding to a 48 h treatment with 1 μM TG, and correlates closely to the high level of apoptosis detected with the Hoescht and the TUNEL methods. In contrast, DNA ladders were absent from lanes 5 and 6, corresponding to a 48 h treatment with 1 nM and 1 pM TG, in which TG induced 4.2 and 1.6% positive TUNEL nuclei.

To further characterize the effect of Ca^{2+} store content modulation on cell growth and apoptosis, we investigated the effect of a transient application of TG on Ca^{2+} store content, cell growth, and apoptosis: cells were treated for 15 min with TG at several doses, then replaced in the control medium for 48 h (see histograms in Fig. 8). Our results clearly show that, even if TG

induced a transient mobilization of the stores (see Fig. 5), a 15-min application was insufficient to stably and statistically decrease the amount of Ca^{2+} within the ER. Indeed, after 48 h in the control medium, the resulting Ca^{2+} store content of cells transiently treated for 15 min with 1 μM , 1 nM, and 1 pM TG were $88 \pm 4\%$ ($n = 25$, $N = 2$), $90 \pm 5\%$ ($n = 29$, $N = 2$), and $109 \pm 17\%$ ($n = 27$, $N = 2$) of the content in control cells, respectively (see histograms in Fig. 8). Under these conditions, cell growth was unaffected (see table in Fig. 8), thus clearly showing that a sustained reduction in Ca^{2+} store content is required to affect cell growth. However, as in the case of cells treated with TG for 48 h, a high level of apoptosis also occurred in cells treated for 15 min with 1 μM TG and replaced in CTL medium for 48 h (82.5% of apoptosis, 48 h after the 15 min TG application) (see table in Fig. 8) and a moderate level of apoptosis occurred in cells treated for 15 min with 1 nM TG and replaced in CTL medium for 48 h (4.5%). To corroborate our results, apoptosis was measured with the TUNEL method and an analysis of the DNA ladder. A 15 min treatment with 1 μM , 1 nM, and 1 pM TG induced respectively 84, 4.2, and 2.3% TUNEL-positive nuclei compared to 1.5% TUNEL-positive nuclei observed under control conditions (Fig. 7A,B). Figure 7C shows an electrophoregram of the DNA fragments extracted from cells exposed to TG at different doses compared to unexposed cells (control, line 3). DNA ladders are seen in lane 7, corresponding to a 15 min treatment with 1 μM TG, and correlating closely to the high level of apoptosis detected with the Hoechst and the TUNEL methods. In contrast, DNA ladders were absent from lanes 8 and 9, corresponding to a 15 h treatment with 1 nM and 1 pM TG in which TG induced 4.2 and 2.3% positive TUNEL nuclei. These latter results show that both transient and stable decreases in Ca^{2+} store content may lead to apoptosis. However, since only TG 1 μM induced apoptosis, the amplitude of TG release appears to be an essential factor in inducing apoptosis. Thus, these results show that a sustained modulation of the store content is necessary to affect cell growth, whereas apoptosis is regulated by large-scale transient or

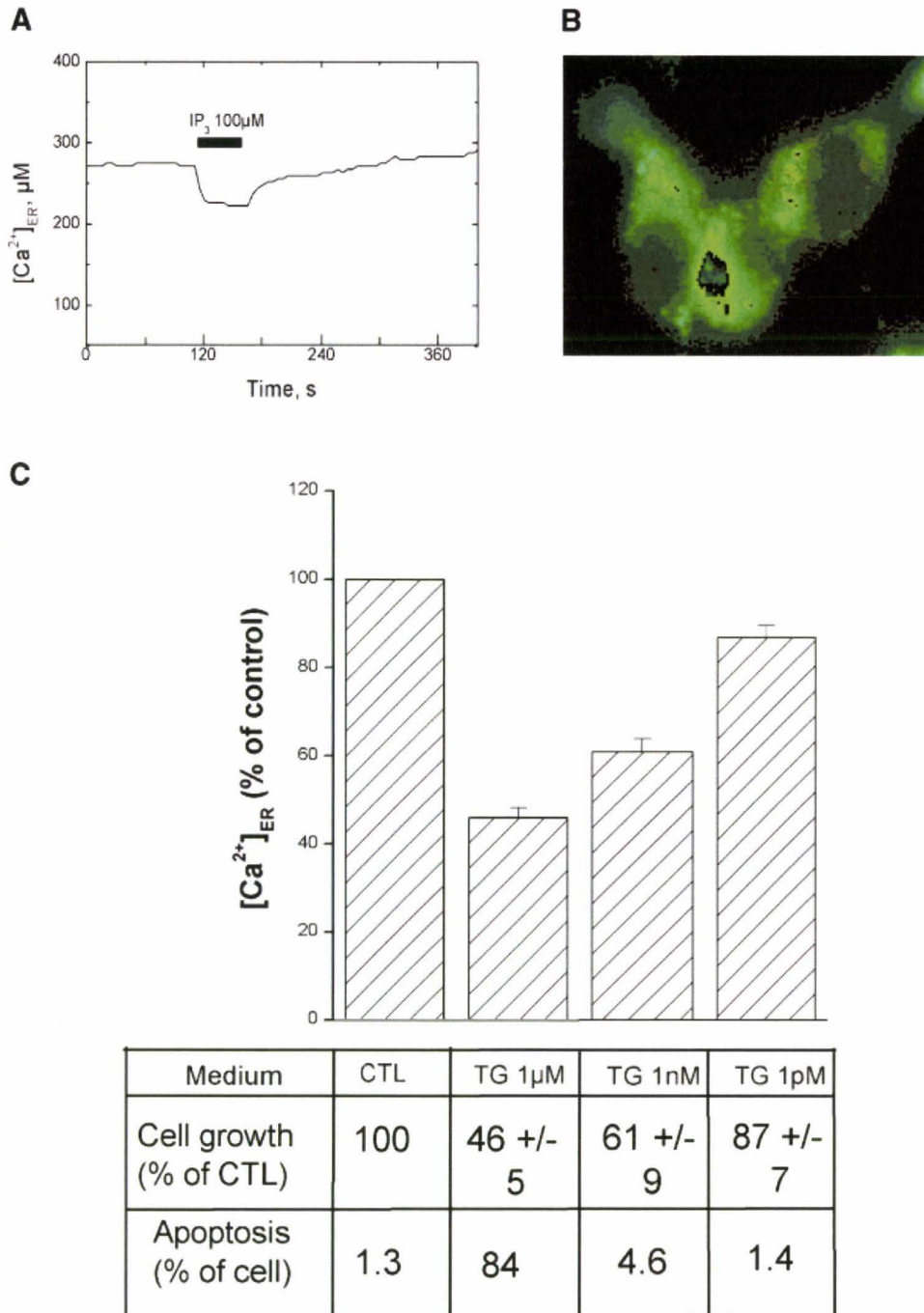


Fig. 6. Effect of stable ER Ca²⁺ content modulation on LNCaP cell growth and apoptosis. Cells were cultured in a media containing TG at indicated doses for 48 h before [Ca²⁺]_{ER} measurements, apoptosis measurement following Hoechst staining and 3 days before cell counting. **A:** Measurement of [Ca²⁺]_{ER} in response to 100 µM InsP₃. **B:** Image of prostate cells after permeabilization loaded with Mag

Fura-2AM showing localization of the dye in the ER. **C:** Histograms show the [Ca²⁺]_{ER} measured using Mag Fura-2 AM loaded cells, and the table shows the corresponding growth rate and apoptosis. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

sustained depletion in Ca²⁺ pool content. This study seems to indicate that Ca²⁺ pools are a checkpoint for cell growth and apoptosis in the LNCaP PC cell line. Furthermore, the cell cycle effects of modifications in the amount of calcium within the ER with TG were assessed. Figure 9 shows that treatments with 1 nM

TG or 1 µM TG for 48 h or 15 min do not significantly modify the parameters of the cell cycle, compared with non treated cells. In effect, the proportion of cells in the G₂M phase was 7.6, 5.6, 7.2, 6.4, and 6.4% for untreated cells, cells treated with 1 nM and 1 µM for 48 h and 1 nM and 1 pM for 15 min, respectively. In the same manner,

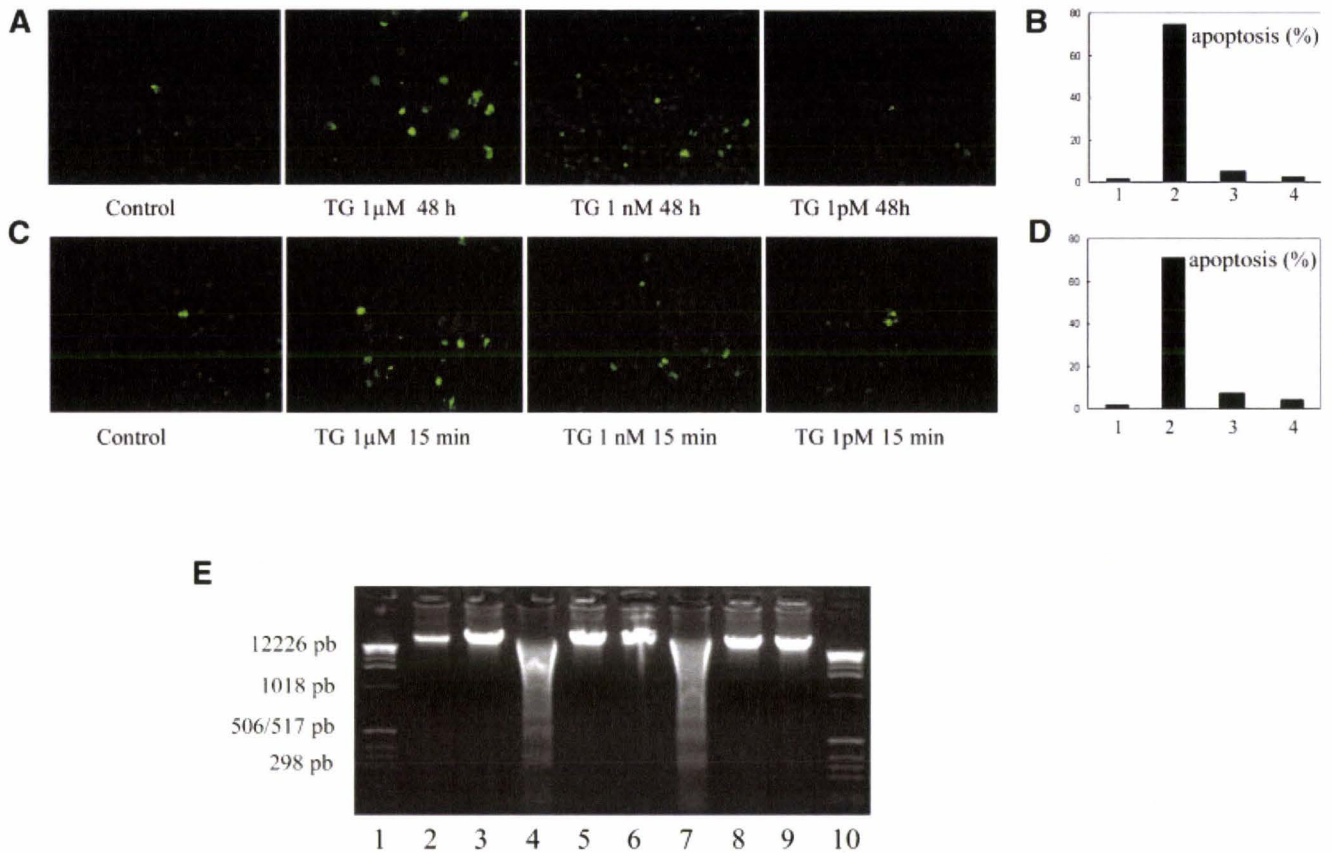


Fig. 7. Effect of stable and transient ER Ca^{2+} content modulation on LNCaP cell growth and apoptosis. Cells were cultured in a media containing TG at indicated doses and times indicated before apoptosis measurement using TUNEL assay and DNA-fragment extract electrophoresis. **A:** Illustration of the typical apoptotic features with the TUNEL technique of prostate cells treated for 48 h with TG at indicated doses. **B:** Histogram shows the apoptosis level detected with the TUNEL assay when cells were cultured in a culture media containing 1 μM TG (2), 1 nM TG (3), 1 pM TG (4) for 48 h compared to control (1). **C:** Illustration of the typical apoptotic features with the TUNEL technique of prostate cells, treated for 15 min with TG at incubated doses and replaced in control media for 48 h at indicated doses. **D:** Histogram shows the apoptosis level detected with the

TUNEL assay when cells were cultured in a media containing 1 μM TG (2), 1 nM TG (3), 1 pM TG (4) for 15 min and replaced in the control media for 48 h at indicated doses. (1) Control. **E:** DNA fragment extract electrophoresis, lane 1 and 10 DNA ladder markers; lane 2 cells cultured for 48 h with a culture medium containing 10% fetal calf serum; lane 3 cells cultured 48 h with a culture medium containing 2% fetal calf serum; lanes 4, 5, and 6 cells cultured 48 h with a culture medium containing 2% fetal calf serum and treated 48 h with 1 μM , 1 nM, and 1 pM TG respectively; lanes 7, 8, and 9 cells cultured 48 h with a culture medium containing 2% fetal calf serum and treated for 15 min with 1 μM , 1 nM, and 1 pM TG, respectively and replaced in the control media for 48 h. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

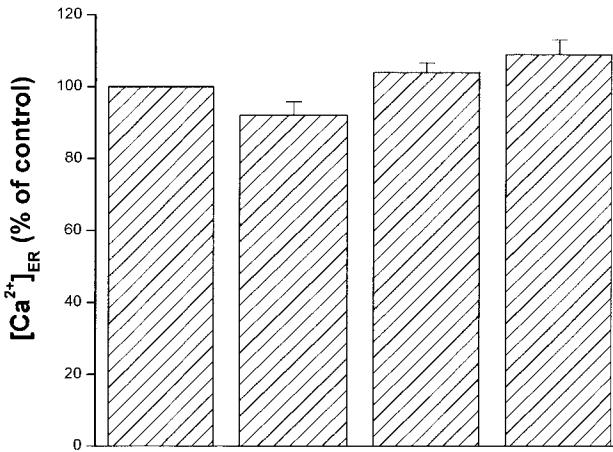
the proportion of cells in the S phase was not modified by treatments with 1 nM TG or 1 μM TG for 48 h or 15 min (see table in Fig. 9). In contrast, treatment with 1 μM TG for 48 h or 15 min induced a reduction in the number of cells in the G_1 phase and in the G_2/M phase correlated with an increase of the apoptosis (see table in Fig. 9).

DISCUSSION

It has been demonstrated that LNCaP cells express IGF receptors (IGF-R) (Kimura et al., 1996) and it is now well established that IGF1 is a major GF involved in PC development (Djavan et al., 2001). Our experiments, consistent with those reported by Iwamura et al. (1993), showed that IGF1 increases LNCaP cell growth in a dose-dependent manner. It has also been established that cytokines control the proliferation of numerous cell types (Sokoloff et al., 1996) and, in our experiments, TNFalpha inhibited cell growth in a dose dependant manner, with a maximal effect at a dose of 1 ng/ml. Thus,

IGF1 and TNFalpha are both physiological agents that control LNCaP cell growth.

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ is considered to play an important role in controlling cell growth. It has been clearly demonstrated that IGF1 (Poiraudau et al., 1997) and other GFs, such as EGF (Pandiella et al., 1987; Moccia et al., 2002; Zhang et al., 2002), fibroblast growth factor (Merle et al., 1997), transforming growth factor (Gizatullina et al., 2003), and TNFalpha (McLarnon et al., 2001) can induce an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ after a few minutes of application. However, our results failed to demonstrate any effect of either IGF1 or TNFalpha on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Our results are consistent with those described on thyroid FRTL-5 cells, where TNFalpha inhibits cell growth without modifying $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Tornquist et al., 1999). Furthermore, EGF did not increase $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in LNCaP cells (Legrand et al., 2001). Taken together, our results lead us to suggest that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ is not involved in cell growth controlled by GFs and cytokines in the LNCaP cell line.



Medium	CTL	TG 1µM	TG 1nM	TG 1pM
Cell growth (% of CTL)	100	92 +/- 14	104 +/- 7	109 +/- 17
Apoptosis (% of cell)	1.4	82.5	4.5	< 1

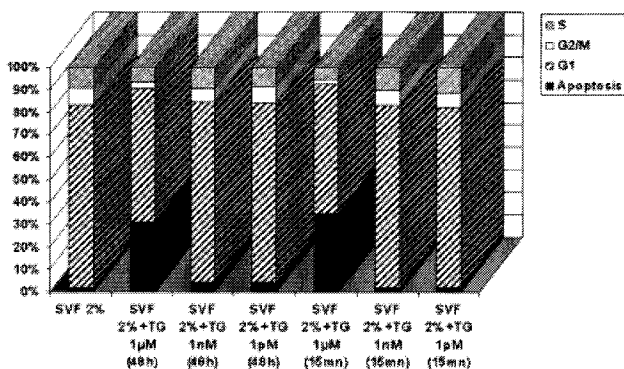
Fig. 8. Effect of transient ER Ca²⁺ content modulation on LNCaP cell growth and apoptosis. Cells were cultured in a media containing TG at indicated doses for 15 min and replaced in the control media for 48 h before [Ca²⁺]_{ER} measurements, apoptosis measurement following Hoechst and 3 days before cell counting. Histograms show the [Ca²⁺]_{ER} measured using Mag Fura-2 AM loaded cells, and the table shows the corresponding growth rate and apoptosis.

Ca²⁺ pools control numerous cell functions, including protein synthesis and cell proliferation. Our results show that both IGF1 and TNFalpha modulate Ca²⁺ store content. Indeed, a 4-day IGF1 treatment (5 ng/ml)

increased Ca²⁺ pool content, whereas TNFalpha treatment (1 ng/ml) decreased the amount of Ca²⁺ within the ER. Our results also provide evidence that both IGF1 and TNFalpha regulate the expression of SERCA2b proteins, responsible for Ca²⁺ uptake within the ER. This type of SERCA protein modulation by IGFs had only previously been described in muscle (Thelen et al., 1994). Our results thus provide the first direct evidence that IGF1 modulates SERCA expression in non-excitable cells. The downregulation of SERCA2b proteins by TNFalpha had not previously been reported, either. However, other cytokines, such as the leukemia inhibitory factor and interleukin-6, decrease SERCA protein levels in cardiac myocytes (Villegas et al., 2000). Our study thus demonstrates a new mechanism involved in cytokine control of PC. Indeed, the ability of TNFalpha to decrease LNCaP cell growth may be explained, at least in part, by its effect on SERCA proteins expression and the related ER Ca²⁺ load.

To study the incidence of a reduction in [Ca²⁺]_{ER}, we used picomolar to micromolar doses of TG to lower the Ca²⁺ store content artificially, thus showing that a reduction in Ca²⁺ store content leads to a proportional decrease in cell growth. This result is consistent with those obtained using androgen or serum deprived LNCaP cells, where a decreased growth rate was correlated with a decrease in Ca²⁺ store content (Legrand et al., 2001). Our results also show that a short application of TG (15 min) is unable to stably decrease the calcium content when cells are then kept in a control medium for 48 h. With this type of treatment calcium stores are depleted by the acute TG treatment, although this effect is transient because new SERCA can be expressed (Graber et al., 1997). Concerning cell growth, this was not affected in any of our experiments when Ca²⁺ stores were transiently depleted (when cells were exposed for 15 min to TG, then kept in control medium for 48 h). This provided a new element in our understanding of the mechanism linking Ca²⁺ pools and cell growth: only sustained modification of the Ca²⁺ pool content modified cell growth, whereas a transient decrease in Ca²⁺ pool content did not. This result is of great interest, as it demonstrates for the first time the dependence of cell growth on Ca²⁺ store depletion kinetics.

Our results demonstrate that the effect of EGF and IGF1 on cell growth, SERCA2b expression, and Ca²⁺ store content are inhibited by TNFalpha, and that neither EGF or IGF1 were able to protect cells from TNFalpha-induced apoptosis. These results are consistent with those of Kulik et al. (2001), which showed that EGF was unable to inhibit TNFalpha-induced apoptosis in LNCaP cells, as EGF was unable to inhibit the cytochrome C release induced by TNFalpha. Moreover, it has been reported that TNFalpha downregulates EGF-R expression in LNCaP cells (Djavan et al., 2001). Furthermore, in an osteogenic sarcoma cell line, TNFalpha induced a significant reduction in the levels of IGF1-R mRNA and protein and inhibited IGF1-R promoter activity (Shalita-Chesner et al., 2001). Thus, the inhibition of the effects of EGF and IGF1 by TNFalpha may be explained by its ability to reduce the amount of their respective receptors. Control of LNCaP cell growth by EGF, IGF1, and TNFalpha may thus



Phase (%)							
S	9.2	6.6	9.7	8.4	5.4	10.5	11.6
G2M	7.6	2.9	5.6	7.2	2.1	6.4	6.4
G1	82.2	59.5	80.7	80.4	57.5	81	80
Sub G1	2	31	4	4	35	2	2

Fig. 9. Effect of stable transient ER Ca²⁺ content modulation on LNCaP cell cycle. Cells were cultured in a media containing TG at indicated doses (i) for 48 h (ii) for 15 min and replaced in the control media for 48 h before cell cycle was measured by flow cytometry.

result from (i) the ability of GFs to regulate Ca^{2+} store content and (ii) the ability of TNF α to regulate GFs receptor expression.

TNF α increases apoptosis in LNCaP cells, but this does not explain the reduced cell growth we observed in LNCaP cells. Indeed, our experiments showed that, while TNF α inhibited 50% of cell growth after 4 days of treatment, it induced apoptosis in only 7% of cells. This suggests that the major phenomenon involved in the reduction of cell growth induced by TNF α in LNCaP cells is the inhibition of proliferation. One may also postulate that apoptosis may have been underestimated, as it was measured on adherent cells, which may therefore also explain the reduction in cell growth. As TNF α reduced cell growth, induced apoptosis and decreased the calcium store content, these results lead us to wonder if the decrease in Ca^{2+} store content is involved in TNF-induced apoptosis in LNCaP cells. Indeed, Ca^{2+} appears to be a major ion involved in apoptosis, and mobilization of Ca^{2+} stores may trigger apoptosis in several models, including our own (Skryma et al., 2000). However, in all previous studies, the role of Ca^{2+} pool content in apoptosis has been investigated by means of artificial, drastic depletion of Ca^{2+} stores using pharmacological agents like TG at micromolar doses. Using a range of doses of TG, from picomolar to micromolar, to reduce Ca^{2+} store content, we showed that, when 55% of the stores remained empty for 48 h, cells entered apoptosis, whereas a low level of apoptosis was detected when 32% of the stores were depleted and no apoptosis was detected when only 22% of the stores were depleted (Fig. 6). In our experiments, TNF induced a 32% reduction in the Ca^{2+} load within the ER (Fig. 3). Therefore, this modulation of Ca^{2+} pool content appears to be sufficient to induce a low level of apoptosis. Thus, TNF α induction of apoptosis in 7% of LNCaP cells was probably due the decrease of the store content and the current mechanisms involved in the TNF transduction pathway, such as caspase activation (Rath and Aggarwal, 1999).

Furthermore, our present results showed that a transient depletion of Ca^{2+} stores was sufficient to induce apoptosis without any need for a sustained reduction of calcium store (Fig. 8). In addition we have previously shown that TG-induced apoptosis occurred without any need for cytoplasmic Ca^{2+} elevation, since TG-induced apoptosis is also observed when cytoplasmic calcium increase is abolished (Skryma et al., 2000). Taken together, these results clearly show that both a transient decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ and a sustained reduction in Ca^{2+} store content are capable of inducing apoptosis, but only if the Ca^{2+} pool content is drastically depleted. Consequently, elevation of cytoplasmic calcium does not seem to play a significant role.

To conclude, we show that Ca^{2+} may control cell growth of androgen-independent and androgen-dependant PC cells by different mechanisms. Indeed, our study shows that ER Ca^{2+} content may control cell growth and apoptosis of LNCaP androgen-dependant PC cells. Moreover, our study provides the first direct evidence that, while Ca^{2+} pools may control both cell growth and apoptosis, the mechanisms involved in controlling these two essential phenomena are clearly different (see Fig. 8). Stable positive or negative modu-

lation of Ca^{2+} pool content led to positive or negative cell growth modulation, respectively, proportional to the amount of Ca^{2+} within the store, whereas transient mobilization of these stores did not modulate cell growth. On the other hand, apoptosis was induced by either a sustained or transient decrease in Ca^{2+} stores, but only by agents that induce a large-scale decrease in ER Ca^{2+} content (in our experiments, the crucial level of emptiness leading to apoptosis was between 68 and 45%). As our results indicate that SERCA proteins and the resulting Ca^{2+} pool content are a common targets for physiological stimuli and are involved in their control of cell growth, we therefore identify Ca^{2+} homeostasis within the ER as a crucial element in the signal transduction that controls the balance between cell life and death in LNCaP cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Nathalie Jouy for her technical assistance. Financial support to Guillaume Legrand came from ARC, and ARTP (Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate).

LITERATURE CITED

- Berridge MJ. 1995. Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays* 17:491–500.
- Djakiew D. 2000. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate* 42:150–160.
- Djavan B, Waldert M, Seitz C, Marberger M. 2001. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol* 19:225–233.
- Gizatullina ZZ, Grapengiesser E, Shabalina IG, Nedergaard J, Heldin CH, Aspenstrom P. 2003. Effect of transforming growth factor-beta on calcium homeostasis in prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 304:643–649.
- Graber MN, Alfonso A, Gill DL. 1997. Recovery of Ca^{2+} pools and growth in Ca^{2+} pool-depleted cells is mediated by specific epoxyeicosatrienoic acids derived from arachidonic acid. *J Biol Chem* 272:29546–29553.
- Hofer AM, Schulz I. 1996. Quantification of intraluminal free Ca^{2+} in the antagonist-sensitive internal calcium store using compartmentalized fluorescent indicators: Some considerations. *Cell Calcium* 20:235–242.
- Iwamura M, Sluss PM, Casamento JB, Cockett AT. 1993. Insulin-like growth factor I: Action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 22:243–252.
- Kimura G, Kasuya J, Giannini S, Honda Y, Mohan S, Kawachi M, Akimoto M, Fujita-Yamaguchi Y. 1996. Insulin-like growth factor (IGF) system components in human prostatic cancer cell-lines: LNCaP, DU145, and PC-3 cells. *Int J Urol* 3:39–46.
- Kulik G, Carson JP, Vomastek T, Overman K, Gooch BD, Srinivasula S, Alnemri E, Nunez G, Weber MJ. 2001. Tumor necrosis factor alpha induces BID cleavage and bypasses antiapoptotic signals in prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res* 61:2713–2719.
- Legrand G, Humez S, Slomianny C, Dewailly E, Abeele FV, Mariot P, Wuytack F, Prevarskaya N. 2001. Ca^{2+} pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca^{2+} -ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem* 276:47608–47614.
- McLarnon JG, Franciosi S, Wang X, Bae JH, Choi HB, Kim SU. 2001. Acute actions of tumor necrosis factor-alpha on intracellular Ca^{2+} and K^{+} currents in human microglia. *Neuroscience* 104:1175–1184.
- Merle PL, Usson Y, Robert-Nicoud M, Verdetti J. 1997. Basic FGF enhances calcium permeable channel openings in adult rat cardiac myocytes: Implication in the bFGF-induced increase of free Ca^{2+} content. *J Mol Cell Cardiol* 29:2687–2698.
- Michalak M, Mariani P, Opas M. 1998. Calreticulin, a multifunctional Ca^{2+} binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem Cell Biol* 76:779–785.
- Moccia F, Berra-Romani R, Tritto S, Signorelli S, Taglietti V, Tanzi F. 2002. Epidermal growth factor induces intracellular Ca^{2+} oscillations in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 194:139–150.

- Nakajima Y, DelliPizzi A, Mallouh C, Ferreri NR. 1995. Effect of tumor necrosis factor- α and interferon- γ on the growth of human prostate cancer cell lines. *Urol Res* 23:205–210.
- Pandiella A, Malgaroli A, Meldolesi J, Vicentini LM. 1987. EGF raises cytosolic Ca²⁺ in A431 and Swiss 3T3 cells by a dual mechanism. Redistribution from intracellular stores and stimulated influx. *Exp Cell Res* 170:175–185.
- Poiraudou S, Lieberherr M, Kergosie N, Corvol MT. 1997. Different mechanisms are involved in intracellular calcium increase by insulin-like growth factors 1 and 2 in articular chondrocytes: Voltage-gated calcium channels, and/or phospholipase C coupled to a pertussis-sensitive G-protein. *J Cell Biochem* 64:414–422.
- Preston GA, Barrett JC, Biermann JA, Murphy E. 1997. Effects of alterations in calcium homeostasis on apoptosis during neoplastic progression. *Cancer Res* 57:537–542.
- Rath PC, Aggarwal BB. 1999. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19:350–364.
- Shalita-Chesner M, Katz J, Shemer J, Werner H. 2001. Regulation of insulin-like growth factor-I receptor gene expression by tumor necrosis factor- α and interferon- γ . *Mol Cell Endocrinol* 176:1–12.
- Shi R, Berkel HJ, Yu H. 2001. Insulin-like growth factor-I and prostate cancer: A meta-analysis. *Br J Cancer* 85:991–996.
- Short AD, Bian J, Ghosh TK, Waldron RT, Rybak SL, Gill DL. 1993. Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4986–4990.
- Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Abeele FV, Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N. 2000. Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: Involvement in apoptosis. *J Physiol* 527:71–83.
- Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET. 2001. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:33–40.
- Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R, Taneja S, Pang S, deKernion JB, Belldegrun AS. 1996. In vitro modulation of tumor progression-associated properties of hormone refractory prostate carcinoma cell lines by cytokines. *Cancer* 77:1862–1872.
- Stokes DL, Wagenknecht T. 2000. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum. Structure and function of Ca²⁺-ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem* 267:5274–5279.
- Thelen MH, Muller A, Zuidwijk MJ, vanderLinden GC, Simonides WS, vanHardeveld C. 1994. Differential regulation of the expression of fast-type sarcoplasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase by thyroid hormone and insulin-like growth factor-I in the L6 muscle cell line. *Biochem J* 303:467–474.
- Tornquist K, Malm AM, Pasternack M, Kronqvist R, Bjorklund S, Tuominen R, Slotte JP. 1999. Tumor necrosis factor- α , sphingomyelinase, and ceramide inhibit store-operated calcium entry in thyroid FRTL-5 cells. *J Biol Chem* 274:9370–9377.
- van Moorselaar R, van Stratum P, Borm G, Debruyne FM, Schalken JA. 1991. Differential antiproliferative activities of alpha- and gamma-interferon and tumor necrosis factor alone or in combinations against two prostate cancer xenografts transplanted in nude mice. *Prostate* 18:331–344.
- Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomyanny C, Roudbaraki M, Mauroy B, Wuytack F, Prevarskaya N. 2002. Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer cell* 1:169–179.
- Villegas S, Villarreal FJ, Dillmann WH. 2000. Leukemia inhibitory factor and interleukin-6 downregulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 95:47–54.
- Waldron RT, Short AD, Meadows JJ, Ghosh TK, Gill DL. 1994. Endoplasmic reticulum calcium pump expression and control of cell growth. *J Biol Chem* 269:11927–11933.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Exp Med* 182:367–377.
- Zhang BX, Ma X, Yen CK, Lifschitz MD, Zhu MD, Katz MX. 2002. Epidermal growth factor-induced depletion of the intracellular Ca²⁺ store fails to activate capacitative Ca²⁺ entry in a human salivary cell line. *J Biol Chem* 277:48165–48171.

ARTICLE 2

L'EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR) INDUIT LA DIFFERENCIATION NEUROENDOCRINE ET LA RESISTANCE A L'APOPTOSE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES ANDROGENO-INDEPENDANTES HUMAINES DU145.

Dans cet article, nous avons étudié les mécanismes calciques impliqués dans le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes DU145. Le but était de comprendre le mécanisme par lequel ces cellules acquièrent une résistance à l'apoptose.

Nos résultats montrent clairement pour la première fois sur les cellules prostatiques cancéreuses humaines androgéno-indépendantes que la vidange des stocks intracellulaires n'est plus suffisante pour induire l'apoptose dans une majorité de cellules. En effet, l'amplitude et la durée de l'influx capacitif de Ca^{2+} sont des facteurs déterminant ce déclenchement.

En outre, nous montrons qu'un traitement de ces cellules par l'EGF protège les cellules DU145 de l'apoptose induite par la TG en induisant une différenciation neuroendocrine. Nous avons montré que ces facteurs de croissance en plus de modifier l'aspect morphologique et l'expression d'un marqueur neuroendocrine spécifique : la NSE (Neuron Specific Enolase), réduisent également la quantité de Ca^{2+} libérable des stocks calciques intracellulaires, ce qui provoque une réduction de l'amplitude de l'entrée capacitive correspondante, et donc de l'apoptose

Ainsi, les facteurs de croissance dont les récepteurs sont surexprimés dans les cellules androgéno-indépendantes, ont la capacité d'induire la différenciation neuroendocrine et de protéger ces cellules de l'apoptose. Sachant que la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques est corrélée à une évolution vers l'androgéno-indépendance, ce nouveau mode d'action des facteurs de croissance mis en évidence dans notre étude, participe sans doute au phénomène qui conduit la cellule cancéreuse prostatique vers l'androgéno-indépendance.

Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells

S Humez^{1,2,*}, M Monet^{1*}, G Legrand¹, G Lepage¹, P Delcourt¹ and N Prevarskaya¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM EMI 0228, USTL, Bat. SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

²Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, 62300 Lens, France

(Requests for offprints should be addressed to Shumez; Email: sandrine.humez@univ-lille1.fr)

*S Humez and M Monet contributed equally to this work

Abstract

Neuroendocrine differentiation (NED) has been implicated in prostate cancer progression and hormone-therapy failure. Neuroendocrine cells are non-proliferating and escape apoptotic cell death, although their origin and the causes of their apoptotic resistance have as yet been poorly elucidated. This study demonstrates a new mechanism involved in controlling NED. We report that epidermal growth factor (5–50 ng/ml) promotes neuroendocrine-like differentiation of androgen-independent DU145 prostate cancer cells. This differentiation is associated with an increase in the expression of Neuron Specific Enolase (NSE) and a reduction in cell proliferation and is blocked by inhibiting tyrosine kinase activity with genistein and with compound 56 (C56). An increase in the cAMP level, using dibutyl cAMP (db-cAMP) (1 mM) and isobutylmethylxanthine (100 μ M), does not promote NED by itself, but does increase the effect of EGF on NED. In addition, EGF-induced NED protects cells from apoptosis induced with thapsigargin (1 μ M) by reducing the thapsigargin-induced cytosolic calcium overload. In order to describe how EGF-induced NED protects cells against thapsigargin-induced calcium overload we investigated the spatiotemporal calcium signalling linked to apoptosis. By using thapsigargin in various conditions on DU145 cells and using micro-fluorimetric calcium measurements, we show that depletion of intracellular calcium store induces apoptosis and that the amplitude and duration of the capacitive calcium entry are two apoptosis-modulating parameters. We show that protection against thapsigargin-induced apoptosis conferred by NED is achieved by reducing the amount and the speed of calcium that can be released from calcium pools, as well as modulating the amplitude of the subsequent calcium entry.

Endocrine-Related Cancer (2006) 13 181–195

Introduction

Prostate cancer (PC) is the second greatest cause of cancer-related death in many countries and in northern Europe it has already taken the number one position as the main cause of male cancer-related death (Landis *et al.* 1998). Androgen ablation is initially beneficial to nearly all men with PC, since androgen-dependent PC undergoes apoptotic death by such treatment (Kyprianou *et al.*

1990). Unfortunately, androgen ablation is only palliative and patients relapse into androgen-independent PC, with dramatic consequences (Crawford 1989). Indeed, androgen-independent PC cells do not enter the programmed cell death pathway following androgen ablation (Denmeade *et al.* 1996). Neuroendocrine cells are one of the phenotypes of apoptosis-resistant cells. The frequency of neuroendocrine cells correlates with tumour malignancy, loss of androgen sensitivity and poor

prognosis (Cussenot *et al.* 1998, Jongsma *et al.* 1999). In addition, significant and clustered neuroendocrine differentiation (NED) in PC can lead to an increase in proliferation and earlier tumour progression (Grobholz *et al.* 2005). Tumours with an increased neuroendocrine cell population are often more aggressive and eventually become androgen-independent (Abrahamsson 1999). However the molecular and cellular mechanisms controlling NED and the apoptosis resistance of neuroendocrine cells are only partially understood and improvement in our understanding of the biological nature of neuroendocrine cells is urgently required (Vashchenko & Abrahamsson 2005).

According to the existing hypotheses, neuroendocrine cells are either derived from undifferentiated basal cells of the prostatic epithelium or have a neurogenic origin (Aumuller *et al.* 1999, Bonkhoff & Remberger 1996). It is also described that PC cells themselves have the ability to transdifferentiate into cells with a neuroendocrine-like phenotype. This transdifferentiation generally occurs from androgen-dependent PC cells and is induced when cells are cultured with pharmacological agents that increase the intracellular level of cAMP, in the presence of interleukin or in a steroid-free medium (Bang *et al.* 1994, Burchardt *et al.* 1999, Cox *et al.* 2000, Mori *et al.* 1999, Zelivianski *et al.* 2001). Neuroendocrine cells represent an androgen-insensitive cell phenotype in the prostate (Krijnen *et al.* 1993). So, one may postulate that neuroendocrine cells could originate from a population of androgen-independent cancer cells, but this hypothesis remains to be proved.

Over the last 20 years, the ever-expanding pool of knowledge of growth factor-regulated pathways and their role in the pathogenesis of PC has been translated into rationally designed drug therapy (Barton *et al.* 2001). Epidermal growth factor (EGF) is known to have anti-apoptotic properties in numerous cell types including prostate cells (Mimeault *et al.* 2003). In addition to the well-described effect of growth factors in PC cells, it has been recently shown that heparin-binding EGF-like growth factor was able to induce transdifferentiation in LNCaP cells (Kim *et al.* 2002).

In an effort to understand how neuroendocrine cells progressively emerge in prostate malignancies and their relationship to hormone-refractory prostate carcinoma, we studied the EGF effect on transdifferentiation of androgen-independent DU145 cells.

In this study we show that EGF mediates NED in androgen-independent PC cells. This differentiation is linked to an increase in Neuron Specific Enolase (NSE) expression, reduction in cell growth and to a resistance to apoptosis induced by thapsigargin (TG).

We also investigated the mechanisms involved in calcium-induced apoptosis in non-differentiated DU145 cells and we elucidated the mechanism by which EGF-induced NED renders neuroendocrine cells resistant to apoptosis induced by calcium overload. We show that in non-differentiated DU145 cells apoptosis may be induced by Ca^{2+} -pool depletion alone and is amplified by extracellular Ca^{2+} entry. Our observations also reveal that apoptosis resistance of EGF-differentiated PC cells following TG exposure occurs via a reduction of both the amount of Ca^{2+} that can be released from Ca^{2+} pools and the amplitude of the subsequent Ca^{2+} entry. Moreover, we show for the first time that EGF-induced differentiation of DU145 cells is a mechanism that can increase the number of apoptosis-resistant cells in PC. This latter result also strengthens the evidence for the existence of a common mechanism centred on a depression of the calcium signal linked to apoptotic resistance in PC.

Experimental procedures

Cell culture

The androgen-independent human PC cell line DU145, obtained from the American Type Culture Collection, was maintained in culture as previously described (Humez *et al.* 2004a). Prior to fluorescence measurements, the cells were trypsinized and transferred to glass coverslips. Cells were used 1-4 days after trypsinization.

Measurement of *in vitro* cell growth

Cells were seeded at an initial density of 500 cells/well in 96-well plates (Poly Labo, Strasbourg, France). After 48 h, cells were cultured in treatment media (day 0). From day 0, the treatment medium was changed daily for each condition. Cells were harvested on day 2. The CellTiter 96 Aqueous Non radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used to determine the number of viable cells (Humez *et al.* 2004a).

Apoptosis assays with Hoechst staining

The level of apoptosis was estimated from the number of apoptotic bodies visualized by Hoechst staining. The percentage of apoptotic cells was determined by counting at least 500 cells in random fields. The detailed procedure has been described previously (Humez *et al.* 2004b). The percentages of apoptotic cells presented in Figs 4 and 5 (see below) are representative of three independent experiments.

Analysis of cell cycle and apoptosis

Flow cytometry was used to analyse the cell cycle and apoptosis, as previously described (Zamzami *et al.* 1995). Cells were fixed overnight at 4°C with 70% ice-cold ethanol/PBS followed by propidium iodide (50 µg/ml) staining and analysed in a Coulter xL cytofluorometer. Cell-cycle compartments were deconvoluted from a single-parameter DNA histogram of 30 000 events using the WINCYCLE 32 program (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA) after the exclusion of cell doublets. The results were expressed as percentages of the cell population. A significant proportion of apoptotic cells were lost due to the repeated washing procedures, so the apoptosis measured with flow cytometry was therefore underestimated.

Ca²⁺ measurements

For cytosolic calcium measurement, fluorescence measurements were conducted on fura 2 acetoxy-methyl ester (fura 2/AM; 5 µM)-loaded (45 min) DU145 cells using a photomultiplier-based system (Photon Technologies, Princeton, NJ, USA) and a double-wavelength (340 and 380 nm) excitation protocol to quantify the absolute value of calcium concentration (Grynkiewicz *et al.* 1985). Direct quantification of Ca²⁺ within the endoplasmic reticulum (ER) [Ca²⁺]_{ER}, was conducted in DU145 cells loaded (45 min) with the AM-ester derivative of Mag-fura 2 (2 µM) as previously described (Humez *et al.* 2004b).

Western blotting

Western-blot analysis of protein expression was carried out as previously described (Humez *et al.* 2004b). Anti-NSE antibody was from Dako, Trappes, France. Anti-actin antibody was from Sigma, France.

Data analysis

Results were expressed as means ± s.e.m. except when indicated in the figure legend. Plots were produced using Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA). Each experiment was repeated at least three times. The Tukey–Kramer test was used for statistical comparison among means and differences and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

EGF induces NED of DU145 cells

The effect of EGF on DU145 cell morphology was examined. When DU145 cells were cultured in a

medium containing 10 or 2% foetal calf serum (FCS), their growth plate, by forming colonies in which cells were rounded, was in close association and did not exhibit any processes (Fig. 1a and b). From time to time, isolated cells showing short processes and oval cell bodies, which look like differentiated cells, were observed and represented about 5% of the cells. Following treatment with EGF for 3 days (5 ng/ml), morphological changes appeared. Figure 1c shows that treatment of DU145 with EGF resulted in a significant level of morphological differentiation as shown by the appearance of neuritic-like extensions that often possessed growth cone-like structures. In addition, EGF-treated DU145 cells are individualized and did not form clusters, as is usually observed (Fig. 1a and b). These morphological changes were similar to descriptions of PC cells undergoing differentiation towards neuroendocrine phenotypes (Bang *et al.* 1994). The proportion of neuroendocrine-like cells observed after a 3-day EGF treatment was $35 \pm 4.7\%$ ($n = 3$).

To evaluate NED more objectively, expression of NSE was examined by western blotting. This marker has been used previously to assess the extent of differentiation in LNCaP cells (Mori *et al.* 1999, Vanoverberghe *et al.* 2004). As shown by Fig. 1d, NSE expression dramatically increased when cells were treated with EGF as compared with cells cultured with 2% FCS. In addition Fig. 1d also shows that NSE expression was higher when cells were cultured with 10% FCS rather than when they were cultured with 2% FCS. As depicted in Fig. 1f, morphological differentiation was time- and dose-dependent. The morphological differentiation induced by EGF (5 ng/ml), estimated by counting morphologically differentiated cells, increased with time and reached a plateau after 3 days of culture. Increasing the dose of EGF significantly increased the level of morphological differentiation in a dose-dependent manner that reached 63% of the cell population when 50 ng/ml EGF was applied. In addition, increasing doses of EGF also augmented NSE expression (Fig. 1g).

A direct correlation has previously been demonstrated between NED of LNCaP cells and inhibition of mitotic activity (Burchardt *et al.* 1999). We therefore used a cell-proliferation assay to determine the number of viable cells and to measure mitotic activity of DU145 cells treated with EGF. Relative to untreated cells, the mitotic activity of EGF-treated cells was significantly reduced with maximum mitotic activity reduction of about 20%, when cells were treated with EGF from 1.6 to 6.2 ng/ml (Fig. 1e). When EGF was used at higher concentrations (up to 12.5 ng/ml) it had no significant effect on cell growth. In addition,

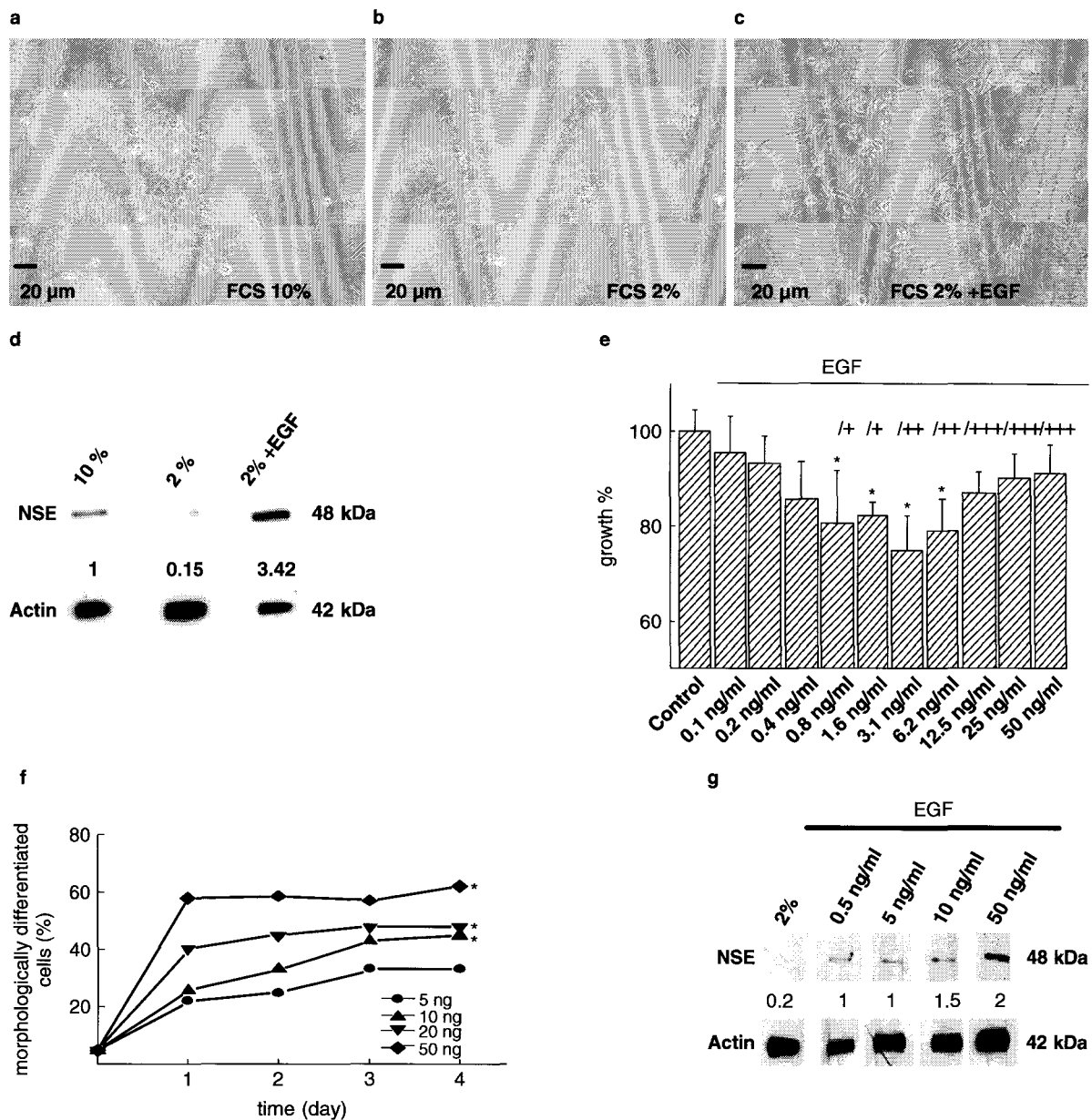


Figure 1 EGF effects on cell morphology and on expression of NSE in human PC DU145 cells. Cells were cultured in media supplemented with 10% FCS. On the following day, the medium was replaced by a medium containing 2% serum supplemented with EGF. Cells were treated for 3 days in these conditions. The medium was renewed daily. (a–d) EGF induces morphological differentiation of DU145 cells. DU145 cells were maintained for 72 h in a medium containing (a) 10% FCS, (b) 2% FCS, (c) 2% FCS and 5 ng/ml EGF. (d) EGF increases the expression of the neuroendocrine marker, NSE. Semi-quantitative Western blot after 30 µg per well of total protein extraction for the conditions presented in (a–c). Actin expression was used as a control to compare NSE expression between different experimental conditions. (e) EGF reduces cell growth. Cell growth measured after 3 days of treatment with EGF from 0.1 to 50 ng/ml compared with non-treated cells (control). Morphological differentiation: 10–30% (+); 30–40% (++); ≤ 40% (+++). Results are expressed as means ± s.d. (f) EGF induces morphological differentiation of DU145 cells in a time- and dose-dependent manner. Cells were cultured from 1 to 4 days with 5, 10, 20 or 50 ng/ml EGF. Morphological differentiation was determined after counting morphologically differentiated cells. (g) Semi-quantitative western blot after 30 µg per well of total protein extraction for the conditions presented after 72 h incubation with increasing doses of EGF.

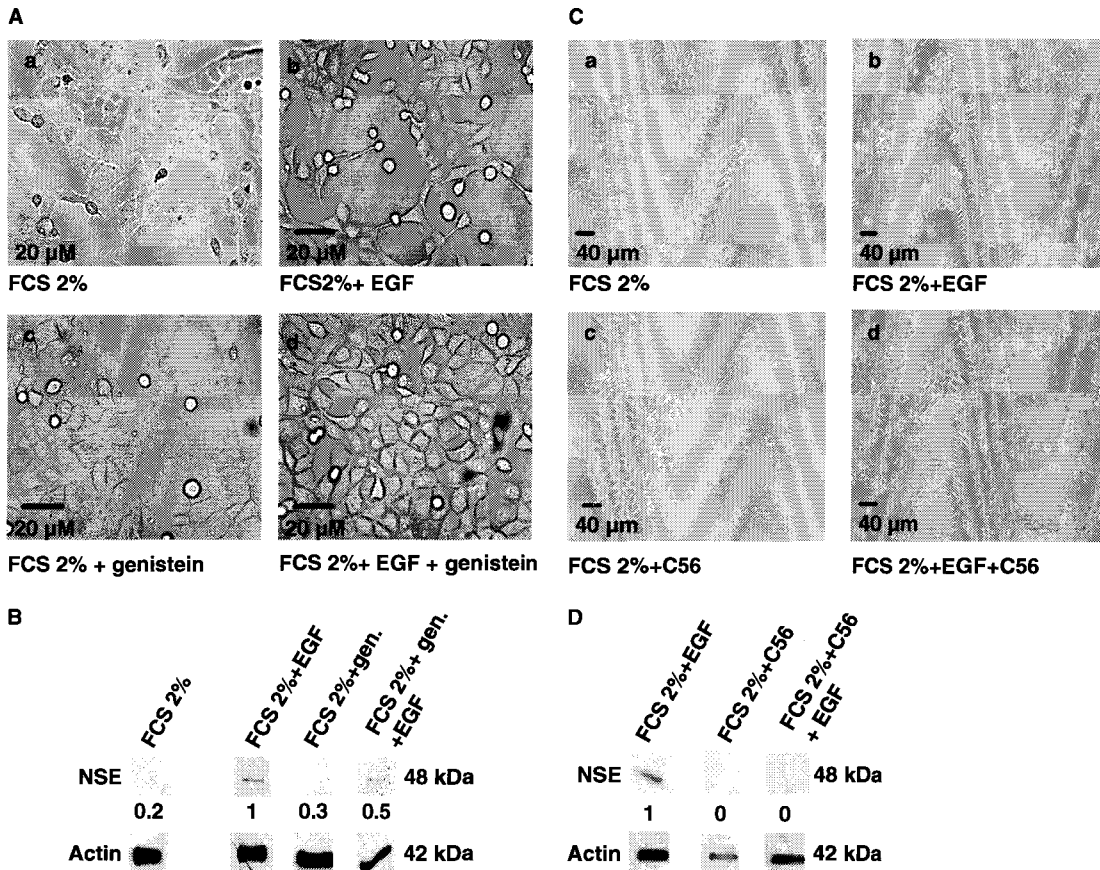


Figure 2 Morphological differentiation induced by EGF was reduced following inhibition of tyrosine kinase activity with genistein (gen) and following inhibition of EGF receptors with C56. (A) Cells were cultured in media supplemented with 10% FCS. On the following day, the medium was replaced by a medium containing (a) 2% serum supplemented with (b) 5 ng/ml, (c) 10 μM genistein or (d) both. Cells were treated with for 3 days in these conditions. The medium was renewed daily. (B) Semi-quantitative Western blot after 30 μg per well of total protein extraction for the conditions in (A). (C) Cells were cultured in media supplemented with 10% FCS. On the following day, the medium was replaced by a medium containing (a) 2% serum supplemented with (b) 5 ng/ml EGF, (c) 15 pM C56 or (d) both. Cells were treated with for 3 days in these conditions. The medium was renewed daily. (D) Semi-quantitative Western blot after 30 μg per well of total protein extraction for the conditions presented from (C). Actin expression was assessed to compare NSE expression to that of actin between different experimental conditions.

treatment of DU145 cells with EGF from 0.8 to 50 ng/ml lead to morphological differentiation in a dose-dependent manner.

As depicted by Fig. 2A and B, the differentiation induced by EGF was blocked when cells were treated with genistein, a specific inhibitor of tyrosine autophosphorylation of the EGF receptor. When cells were cultured with EGF (5 ng/ml) and genistein (10 μM), the rate of differentiation was 2-fold less than the rate of differentiation observed when cells were treated with EGF alone. In effect, the rate of differentiation was $31.4 \pm 4\%$ ($n = 6$) when cells were treated with EGF whereas it was 15.8 ± 5.3 ($n = 6$) when EGF was added with genistein. In addition, the NSE expression was reduced. The differentiation induced by EGF was also

blocked when cells were treated with C56, a specific inhibitor of the EGF receptor (Fig. 2C and D). When cells were cultured with EGF (5 ng/ml) and C56 (15 pM) the rate of differentiation was 50% less than that observed when cells were treated with EGF alone and NSE expression was inhibited.

Increase in cAMP level enhances EGF-induced NED of DU145 cells

It has been well described that cAMP-dependent protein kinase (PKA) plays a central role in the acquisition of NED observed in LNCaP cells (Burchardt *et al.* 1999, Cox *et al.* 2000, Mariot *et al.* 2002). It has also been clearly described that activation of cAMP-dependent

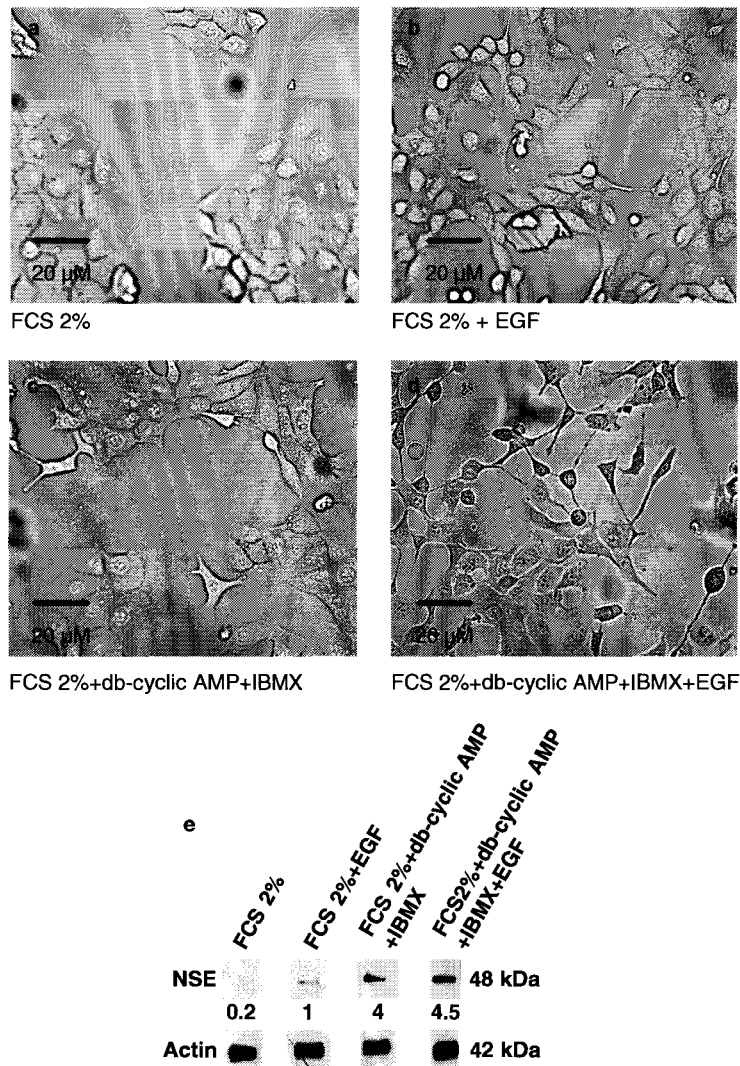


Figure 3 Increase in intracellular cAMP does not cause morphological differentiation but enhances morphological differentiation induced by EGF. Cells were cultured in media supplemented with 10% FCS. On the following day, the medium was replaced by a medium containing (a) 2% serum supplemented with (b) 5 ng/ml EGF, (c) 1 mM db-cAMP and 100 μM IBMX or (d) db-cAMP, IBMX and EGF. Cells were treated for 3 days in these conditions. The medium was renewed daily. (e) Semi-quantitative western blot after 30 μg per well of total protein extraction for the conditions in (a–e). Actin expression was assessed as a control to compare NSE expression between different experimental conditions.

protein kinase is both necessary and sufficient for stimulation of certain neuroendocrine characteristics by adenylate cyclase activators (Cox *et al.* 2000). Thus, we first tested the effect of increasing cAMP level on DU145 cell morphology (Fig. 3a–d). When DU145 cells were treated with dibutyl cAMP (db-cAMP; 1 mM) and isobutylmethylxanthine (IBMX; 100 μM), only a few cells acquired a neuroendocrine morphology. In effect, the amount of cells that had a neuroendocrine phenotype was $5.0 \pm 3.0\%$ ($n = 6$) in the presence of agents that increase the cAMP level and was $2.0 \pm 3.2\%$

($n = 6$) in control conditions (Fig. 3a and c). However, treatment with db-cAMP and IBMX significantly increased the rate of morphologically observed NED induced by EGF (5 ng/ml). The rate of NED observed when cells were treated with EGF (5 ng/ml) was $31.0 \pm 3.1\%$ ($n = 6$) compared with $44.2 \pm 3.2\%$ ($n = 6$) when db-cAMP and IBMX were added to EGF (Fig. 3b and d). Interestingly, when DU145 cells were treated with db-cAMP (1 mM) and IBMX (100 μM), NSE expression was significantly raised compared with untreated cells. Furthermore, the

addition of EGF on cells treated with db-AMP and IBMX was not able to increase NSE expression compared with that observed with db-cAMP and IBMX alone. These latter results indicate (i) that db-cAMP and IBMX promote NSE expression without achieving morphological differentiation, (ii) that EGF is able to enhance NED following db-cAMP and IBMX exposure and (iii) that EGF is able to promote NSE expression and morphological differentiation.

EGF-induced NED protects DU145 cells from the TG-induced apoptosis

As it has been established that NED protects LNCaP cells from apoptosis (Vanoverberghe *et al.* 2004), we went on to investigate the effect of EGF on apoptosis induced by calcium overload. For this we used TG, which causes a strong calcium increase, and induces apoptosis in DU145 cells (He *et al.* 2002). Our experiments show that 72-h pretreatment with 5 ng/ml EGF before a 48-h treatment with 1 μ M TG reduced the level of TG-induced apoptosis (assessed by Hoechst staining) by 50%. Indeed, in these conditions, the apoptosis level of neuroendocrine-differentiated cells was 6% whereas it reached 12% when cells were kept in a non-differentiated state (Fig. 4A). The resistance of apoptosis conferred by NED was also detected by flow cytometry (Fig. 4B).

We then investigated whether EGF-induced NED was able to affect the TG-induced calcium overload. Our experiments demonstrate that NED stably reduced the basal intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) measured after a 48 h TG exposure (Fig. 4C). Indeed, when cells were exposed to TG for 48 h, $[Ca^{2+}]_i$ reached 206 ± 12 nM ($n = 113$). However, in neuroendocrine-differentiated cells $[Ca^{2+}]_i$ rose to 88 ± 3 nM ($n = 73$; Fig. 4C). In addition, as depicted in Fig. 4D the protection from the calcium overload induced by NED was abolished when the EGF receptors were blocked with C56 (15 pM).

Mechanisms of Ca^{2+} homeostasis involved in apoptosis induction in androgen-independent PC DU145 cells

To understand the mechanisms that lead EGF to induce a protective effect from calcium-induced apoptosis we studied the spatiotemporal calcium signalling leading to apoptosis in DU145 cells. With this aim, we treated cells with 1 μ M TG in various extracellular conditions (Fig. 5). Sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibition by TG generally results in a biphasic increase in $[Ca^{2+}]_i$, reflecting a passive Ca^{2+} release through endoplasmic reticulum leak channels,

followed by a capacitative Ca^{2+} entry through plasma membrane Ca^{2+} channels activated by store depletion. In a Ca^{2+} -free medium, a 48-h treatment by TG (1 μ M) induced only a short, transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ (at the time of TG application) due to Ca^{2+} store mobilization (see trace in Fig. 5a). Such a treatment induces apoptosis in 5.2% of cells in 48 h. In cells treated with the Ca^{2+} chelator 50 μ M BAPTA-AM (bis-(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)) in a Ca^{2+} -free medium (Fig. 5b), TG induced the emptying of Ca^{2+} stores, but without any increase in free $[Ca^{2+}]_i$. In these conditions, TG also induced apoptosis in 5% of cells. Note that a 48-h treatment in a Ca^{2+} -free medium supplemented with 50 μ M BAPTA-AM alone (without TG) did not induce apoptosis (data not shown). Thus, independently of the cytosolic Ca^{2+} level, the mobilization of Ca^{2+} stores induced apoptosis in $5 \pm 1\%$ ($n = 3$) of DU145 cells.

In order to evaluate the role of cytosolic increase in Ca^{2+} in the induction of apoptosis in these cells, apoptosis was measured after treating DU145 cells in a medium which contained 2 mM Ca^{2+} . Indeed, readmitting 2 mM Ca^{2+} into the extracellular medium after the transient increase in Ca^{2+} -free medium caused by TG (1 μ M), induced capacitative calcium entry (see trace in Fig. 5c), causing in sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$ (see the table in Fig. 5c, after 24 and 48 h of treatment). In these conditions, when Ca^{2+} is stably raised for 48 h, apoptosis is induced in 10.5% of cells. Thus, even if by emptying the Ca^{2+} stores TG induces apoptosis in 5% of cells, our results clearly show that when TG induces a sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$ it doubles the apoptosis level, pointing to capacitative Ca^{2+} entry as one of the Ca^{2+} events in apoptosis induction by TG in DU145 cells.

To further investigate the role of capacitative Ca^{2+} entry in apoptosis induction in DU145 cells, we studied the role of the amplitude of the capacitative Ca^{2+} influx in this phenomenon. For this, we lowered the capacitative calcium entry by readmission of 200 μ M Ca^{2+} into the extracellular medium (instead of 2 mM) after TG treatment made in a calcium-free medium (see Fig. 5d with 200 μ M Ca^{2+} , as compared with Fig. 5c with 2 mM Ca^{2+}). A decrease in the amplitude of the sustained (24 and 48 h) Ca^{2+} increase was also observed (see the table in Fig. 5d as compared with the table in Fig. 5c). This treatment for 48 h induced apoptosis in 6.8% of cells. As reducing the extracellular calcium concentration reduces TG-induced apoptosis by about 30%, it is clear that in androgen-independent DU145 PC cells the level of apoptosis induced by TG depends on the amplitude of the Ca^{2+} increase due to the capacitative Ca^{2+} influx.

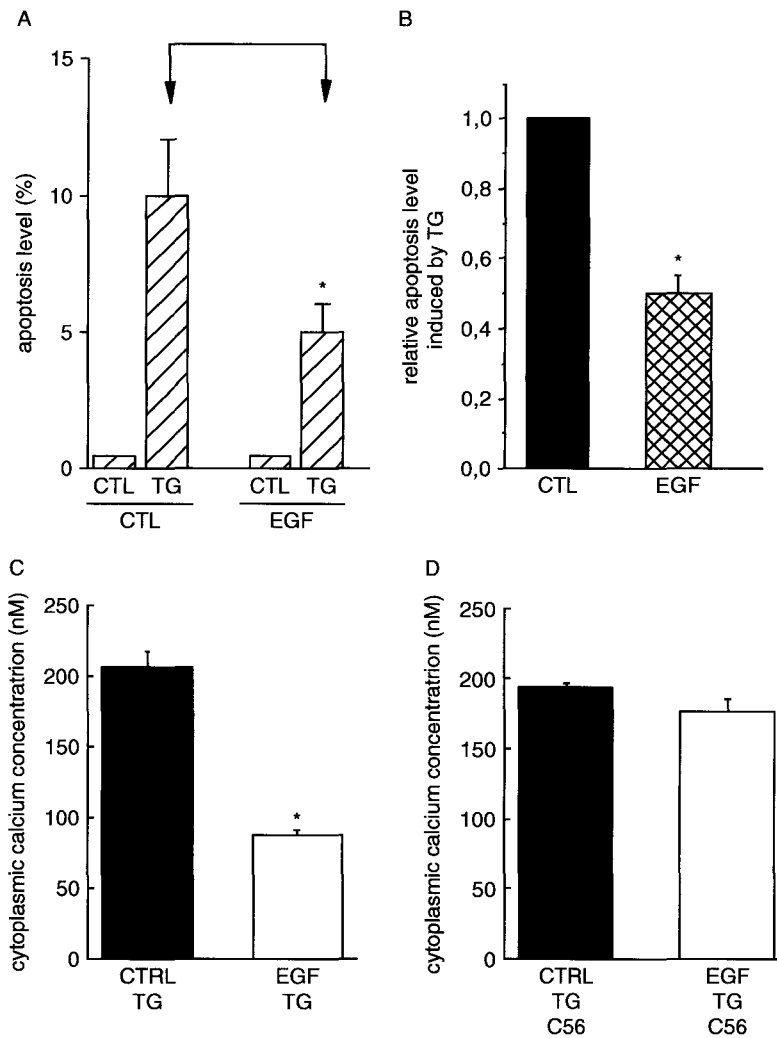


Figure 4 EGF protects DU145 cells from the TG-induced apoptosis and from the long-term cytotoxic Ca^{2+} overload induced by TG. Cells were pretreated with 5 ng/ml EGF for 72 h prior the 48 h 1 μM TG treatment (combined with EGF). (a) Apoptosis was labelled using the Hoechst staining method, as indicated in the Experimental procedures section. (b) Apoptosis was measured using flow cytometry. Results represent the relative level of apoptosis. Apoptosis observed in control (CTL) conditions is labelled as 1. (c) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured after a 48-h TG (1 μM) treatment in a culture medium containing 2 mM Ca^{2+} . Experiments were performed on control cells cultured with 2% FCS and on cells treated by 5 ng/ml EGF 48 h before the TG treatment. Note that EGF was maintained during the TG treatment. (d) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured after a 48-h TG (1 μM) treatment in a culture medium containing 2 mM Ca^{2+} . Experiments were performed with C56 (15 pM) on control cells cultured with 2% FCS, and on cells treated with 5 ng/ml EGF 48 h before TG treatment. Note that EGF was maintained during TG treatment.

Finally, we studied the role of the duration of the capacitive Ca^{2+} entry in apoptosis induction in DU145 cells. As shown in Fig. 5c, readmission of 2 mM Ca^{2+} into extracellular media after the transient increase caused by TG in a Ca^{2+} -free medium induced a sustained (see Fig. 5c) capacitive Ca^{2+} entry and apoptosis in 10% of cells within 48 h. By removing extracellular Ca^{2+} at a specific time after the beginning of the capacitive Ca^{2+} influx (represented by T on

Fig. 5e), Ca^{2+} returned to its basal level (see Fig. 5e). In these conditions, by labelling the apoptosis level 48 h after the return to basal conditions, the effect of the duration of capacitive Ca^{2+} influx was studied. The table on Fig. 5e shows that whereas a 5- or 30-min capacitive Ca^{2+} influx is insufficient to increase apoptosis, as compared with calcium store mobilization alone after 48 h (see Fig. 5a and b), a 2-h Ca^{2+} influx induces apoptosis in 9.7% of cells after 48 h.

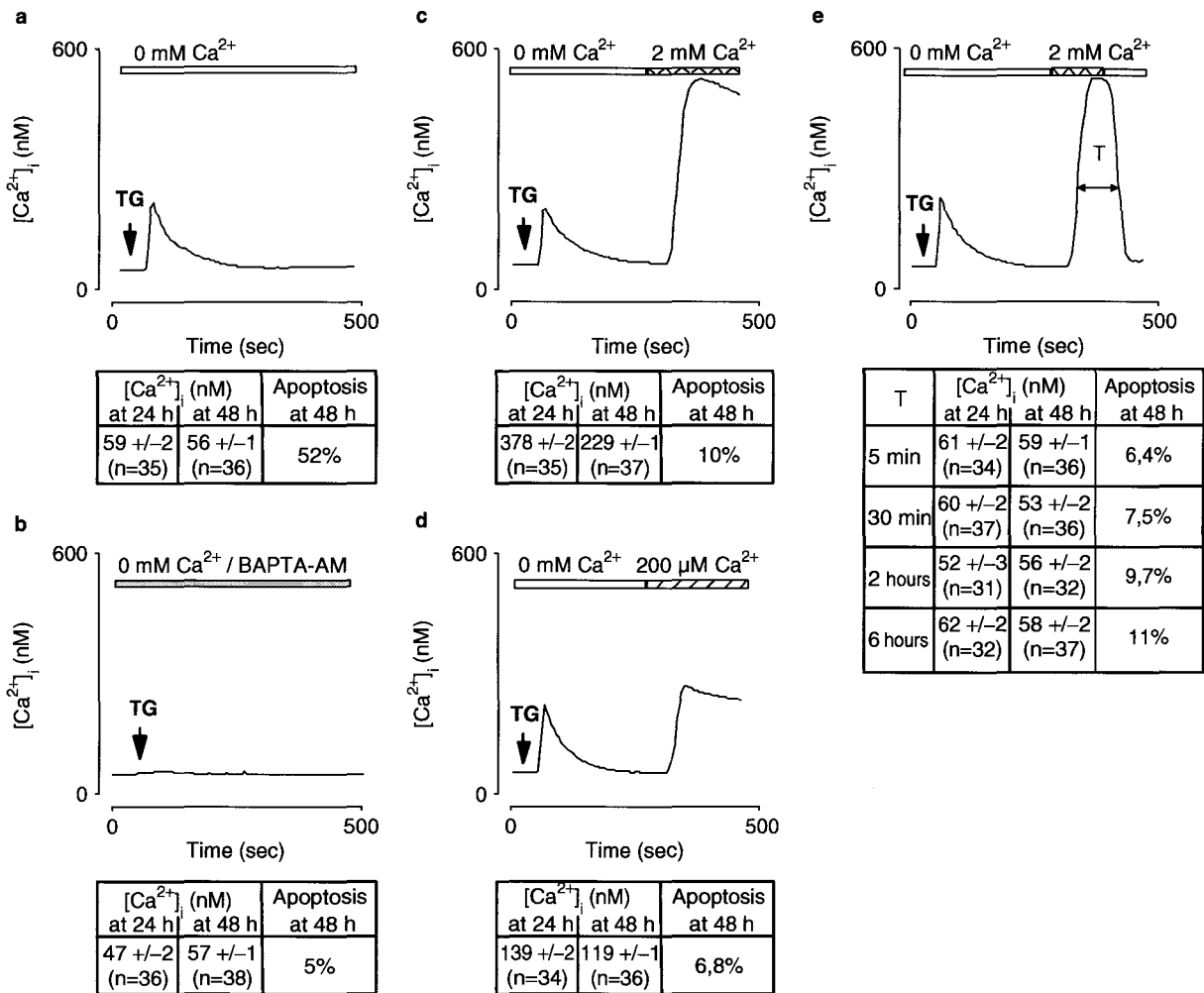


Figure 5 Characterization of the role of Ca²⁺ homeostasis perturbation in apoptosis induction in DU145 cells. Cells were cultured in media supplemented with 10% FCS. On the following day the medium was replaced by medium containing 2% serum supplemented with the indicated doses of Ca²⁺ and BAPTA-AM. Cells were treated with 1 μM TG for 48 h in these conditions. Traces show the short-lived modifications in [Ca²⁺]_i induced by TG treatment, whereas the tables illustrate the long-lasting (24 and 48 h) effects of these treatments on [Ca²⁺]_i, as well as apoptosis level at 48 h. (a, b) Role of Ca²⁺-store mobilization in TG-induced apoptosis. (a) Effects of TG application in a Ca²⁺-free medium, on [Ca²⁺]_i and apoptosis: in a Ca²⁺-free medium a 48-h TG treatment induced only a short-lived increase in [Ca²⁺]_i due to Ca²⁺-store mobilization without any sustained modification of [Ca²⁺]_i (see table). (b) Role of transient [Ca²⁺]_i increase due to Ca²⁺-store mobilization in TG-induced apoptosis: the trace shows the effect of TG application in a Ca²⁺-free medium supplemented with BAPTA-AM (50 μM). In these conditions the emptying of the stores induced by TG did not modify [Ca²⁺]_i. However, after 48 h apoptosis was induced at a similar level to that in (a). (c–e) Role of capacitive calcium entry in TG-induced apoptosis. (c) Effect of capacitive calcium entry induced by TG on [Ca²⁺]_i and apoptosis: the emptying of the store induced by TG activated a sustained capacitive calcium influx measurable by readmitting 2 mM extracellular calcium. Apoptosis was measured after a 48-h treatment in these conditions, and the apoptosis level increased as compared with cells exposed to calcium-store mobilization alone (a and b). (d) Role of the amplitude of capacitive calcium influx in TG-induced apoptosis: by reducing the extracellular calcium concentration to 200 μM, both the amplitude of the sustained capacitive calcium influx and apoptosis level induced by TG were reduced (as compared with c, in 2 mM extracellular Ca²⁺). (e) Role of the duration of the capacitive calcium influx in apoptosis induction: by removing extracellular calcium at a determined time after the beginning of the capacitive calcium influx (represented by T), calcium stably returned to the basal level. The role of the duration of capacitive calcium influx was studied by labelling apoptosis level in these conditions, 48 h after the return in basal cytosolic calcium concentrations.

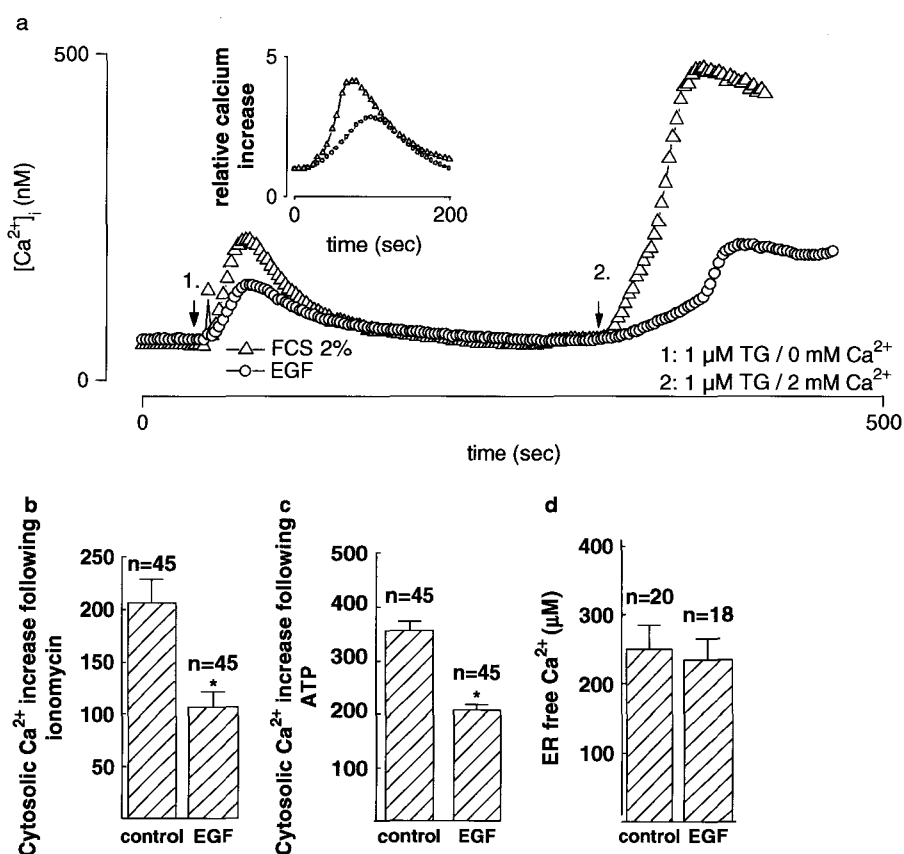


Figure 6 EGF reduced the amount and the speed of the calcium that could be released from internal stores. (a) TG was used to study the amount of Ca^{2+} that is releasable from the stores, as well as the corresponding capacitative Ca^{2+} entry. Experiments were performed on control cells (OT), as well as on cells pretreated for 48 h with 5 ng/ml EGF (OC). Insert: Typical traces showing decrease in the speed of cytosolic calcium. Calcium increase was obtained in a calcium-free medium using TG. (b) Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) was used to study the amount of Ca^{2+} releasable from the stores in a calcium-free medium. (c) ATP ($100 \mu\text{M}$) was used to study the amount of Ca^{2+} that is releasable from the stores in a calcium-free medium. (d) Quantification of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ measured in digitonin-permeabilized cells based on Mag-fura 2 fluorescence.

Moreover, a 6-h Ca^{2+} influx is sufficient to induce maximal apoptosis levels after 48 h (as compared with the apoptosis induced by the 48-h sustained capacitative Ca^{2+} influx shown in Fig. 5c). Finally we showed that NED by itself is not linked to a variation in the basal cytoplasmic calcium since the amount of the resting cytoplasmic calcium measured in non-treated cells was not significantly modified following NED and was $54 \pm 9 \text{ nM}$ ($n = 85$).

Taken together, these results show that in androgen-independent DU145 PC cells the depletion of intracellular Ca^{2+} store may induce apoptosis, and that apoptosis is increased in cells where capacitative Ca^{2+} entry is induced, pointing to capacitative Ca^{2+} influx as one of the events in the phenomenon of apoptosis induction. Moreover, our results provide the first evidence that in androgen-independent PC cells the

amplitude and the duration of capacitative Ca^{2+} entry are two parameters that control apoptosis.

NED of androgen-independent prostatic cells reduces the Ca^{2+} released from intracellular pools and the following capacitative Ca^{2+} entry

As our results demonstrated how the Ca^{2+} signal induces apoptosis in DU145 cells, we investigated the effect of NED on DU145 Ca^{2+} homeostasis. ER Ca^{2+} release was thus estimated by measuring the difference between basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and Ca^{2+} peaks induced by TG in a Ca^{2+} -free medium. Our results show that NED is associated with a reduction in the amount of Ca^{2+} that can be released from the ER (Fig. 6). Indeed, in control conditions, the release induced by $1 \mu\text{M}$ TG application

reached 210 ± 5 nM ($n = 54$), whereas this release reached 159 ± 10 nM ($n = 32$) in neuroendocrine-differentiated cells, corresponding to 76% of the amount released in control conditions (Fig. 6a). The speed of the calcium release induced by TG also decreased. In effect, calcium release induced by TG was 0.12 ± 0.01 nM/s ($n = 90$) when cells were differentiated with EGF while it was 0.53 ± 0.08 nM/s ($n = 90$) in control conditions.

To confirm the reduction in the amount of calcium that can be released from internal stores we measured the calcium release induced by ionomycin ($1 \mu\text{M}$) or by activating purinergic receptors with ATP ($100 \mu\text{M}$) as already described in DU145 cells (Fang *et al.* 1992). As depicted in Fig. 6b and c, the calcium that can be released by ionomycin or by ATP was reduced in neuroendocrine-differentiated cells. Indeed the calcium release was reduced by 49 and 41% when cells were challenged with ionomycin and ATP respectively. In comparison the level of free $[\text{Ca}^{2+}]$ in the reticulum and measured with Mag-fura 2 was not modified after NED (Fig. 6d).

Our results also show that NED affects the capacitative Ca^{2+} entry observed after readmitting extracellular Ca^{2+} . Indeed, the amplitude of capacitative Ca^{2+} entry induced by $1 \mu\text{M}$ TG application in control conditions reached 477 ± 12 nM ($n = 54$), whereas it reached 235 ± 22 nM ($n = 32$) in neuroendocrine-differentiated cells. Thus, NED is correlated with a reduction of the amplitude of Ca^{2+} entry and the amplitude of entry corresponded to 49% of the control Ca^{2+} entry.

The results presented in this study demonstrate for the first time the ability of androgen-independent cells to undergo NED following a growth factor treatment. In addition, we demonstrate the role of the calcium-signal amplitude and duration in the induction of apoptosis in androgen-independent cell line. Furthermore, we show that a depression in calcium homeostasis confers apoptosis resistance on the neuroendocrine-differentiated DU145 cells.

Discussion

EGF treatment induced NED in androgen-independent prostate cancerous cell line

To date, the mechanism leading to the development of the neuroendocrine cell population in advanced tumours is poorly understood. It has been described that androgen-sensitive cell lines have the ability to transdifferentiate into cells with a neuroendocrine-like phenotype. It has been also demonstrated that

neuroendocrine cells lack nuclear androgen receptor and thus represent an androgen-insensitive cell phenotype in the prostate (Krijnen *et al.* 1993). This absence of androgen receptor in neuroendocrine tumour cells suggests that these cells may represent a population that could initially be androgen-independent and therefore refractory to androgen-deprivation therapy. Here we show, for the first time, that androgen-independent DU145 cells have the ability to transdifferentiate. After this treatment, differentiated DU145 exhibit a significant level of morphological changes that were similar to descriptions in the literature of PC cells undergoing differentiation towards neuroendocrine phenotypes (Bang *et al.* 1994). Furthermore, we show that expression of NSE increases when cells are treated with EGF. Increase in NSE expression is a marker that has been used previously to assess differentiation of LNCaP cells (Mori *et al.* 1999). Taken together our results demonstrate that EGF has the ability to induce NED of DU145 cells.

It has been previously established that NED of prostate cells, including androgen-independent ones, can be induced by agents that increase cAMP (Zelivianski *et al.* 2001). Here, we show that these agents (db-cAMP and IBMX) were ineffective by themselves to promote NED of androgen-independent DU145 cells. However, db-cAMP and IBMX increased the efficiency of EGF in inducing NED.

The NED process has itself been suggested to induce cell-cycle arrest (Mori *et al.* 1999, Blutt *et al.* 1997). Here we show that NED induced by EGF (between 1.6 and 6.2 ng/ml) is correlated with a reduction in cell proliferation. This reduction of the proliferation rate was moderate (20%). This decrease in cell growth observed with EGF is surprising, since exogenous EGF has already been described as having little effect on cell growth when they are cultured at high densities, because the amount of EGF being secreted by DU145 is sufficient for optimal stimulation by EGF (Connolly & Rose 1991). In this study one may consider the fact that the additional doses of EGF considerably increase the level of EGF in our culture conditions at a doses rendering EGF able to reduce cell growth.

It has been demonstrated that the micro-environment is likely to play a critical role in growth and to control phenotypic properties of prostatic tumours (Cunha 1994, Chung 1995). Here we show that NED of androgen-independent cells is specifically induced by EGF, which is a growth factor that has been frequently been implicated in PC progression (Barton *et al.* 2001). This function of EGF in PC cells was unexpected. Such an

effect of EGF is mediated by EGF activation of a tyrosine kinase pathway since this was not observed when genistein was used. Activation of EGFR by heparin-binding EGF-like growth factor has been demonstrated to stimulate NED in LNCaP cells linked to STAT3 phosphorylation (Kim *et al.* 2002). Nevertheless, to date no effect of EGF on NED in LNCaP cells has been reported.

In this study, we identify an unrecognized function for EGF in androgen-independent DU145 cells, as a mediator of NED. We suggest that this growth factor could be a key signal linked to NED in androgen-independent prostate cell.

NED induced by EGF protects DU145 cells from the TG-induced apoptosis

Our data show that TG induces apoptosis in about 10% of androgen-independent DU145 PC cells. This result is in accordance with studies demonstrating that an increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by TG induced apoptosis (Orrenius *et al.* 2003). Nevertheless, levels of apoptosis observed in our study are significantly lower than the ones previously observed in the same cell type by other authors (He *et al.* 2002). However, this low apoptosis level, observed in our experimental conditions, reflects the fact that androgen-independent cells are resistant to apoptosis when compared with androgen-dependent ones (Prevarskaya *et al.* 2004). Our experiments also show that pre-treatment with EGF before a 48 h treatment by 1 μ M TG reduces the level of the TG-induced apoptosis by 48%. Indeed, we demonstrate that NED of androgen-independent cells is a mechanism by which prostate cells can escape apoptosis. Our results are in accordance with those describing how neuroendocrine tumour cells escape apoptotic cell death (Fixemer *et al.* 2002, Vanoverberghe *et al.* 2004) and that EGF protects several cell types, including prostate cells, from apoptosis (Mimeault *et al.* 2003).

Calcium signalling and induction of apoptosis in DU145 cells

To understand how the NED of androgen-independent human PC cells protects them from apoptosis due to calcium overload we first investigated the role of Ca^{2+} homeostasis in the apoptotic regulation of DU145 cell. At that time, two hypotheses were proposed about the role of Ca^{2+} in apoptosis induction. The first assumed that apoptosis may be triggered by ER Ca^{2+} -pool depletion without any requirement for cytosolic Ca^{2+} elevation due to store-operated Ca^{2+} entry (Bian *et al.* 1997, He *et al.* 1997). The second hypothesis, on the

contrary, assumed that a sustained elevation of cytosolic Ca^{2+} to a critical level is the initiator of apoptosis (Dowd *et al.* 1992, Wang *et al.* 1999). In prostate cells, these two opposing hypotheses have already been reported (Prevarskaya *et al.* 2004). Indeed, studies performed in our laboratory demonstrate that in human androgen-dependent LNCaP PC cells the depletion of intracellular Ca^{2+} stores may trigger apoptosis without any requirement for a sustained Ca^{2+} entry (Skryma *et al.* 2000). On the other hand, Ca^{2+} pool depletion appears insufficient to initiate apoptosis in rat androgen-independent PC cells. Indeed, Furuya *et al.* (1994) reported that in rat androgen-independent PC AT3 cells programmed cell death is critically dependent on an adequate (i.e. 3-4 fold) sustained (>1 h) elevation in $[Ca^{2+}]_i$ and not on depletion of the ER Ca^{2+} pools.

We show that in DU145 cells apoptosis can be induced by ER Ca^{2+} pool depletion alone, without any requirement for a cytosolic $[Ca^{2+}]$ increase. Furthermore, our data clearly demonstrate that when Ca^{2+} depletion is followed by a Ca^{2+} entry from extracellular medium apoptosis is amplified. Our results further demonstrate that the level of apoptosis is proportional to the level and the duration of the Ca^{2+} increase. Thus the amplitude and kinetics of the Ca^{2+} signal appear to be crucial regulators of apoptosis in DU145 PC cells. This result is of a great interest since it points out a fundamental difference between Ca^{2+} regulation of apoptosis in two major PC cell lines: androgen-dependent LNCaP PC cells and androgen-independent DU145 PC cells. Indeed, in our previous study, we showed that in an androgen-dependent PC cell line a decrease in the ER Ca^{2+} pool is a major factor in apoptosis induction, and that the following Ca^{2+} influx is not needed for the apoptosis phenomenon to occur (Skryma *et al.* 2000). Our results show that independently of the Ca^{2+} level the depletion of Ca^{2+} stores may induce apoptosis in DU145 cells. This result is not surprising, since the maintenance of sufficient levels of Ca^{2+} within the ER is essential not only for Ca^{2+} signal transduction, but also for protein synthesis and processing, and cell proliferation (Koch 1990, Sambrook 1990, Jiang & Julian 1998). Moreover, mechanisms by which ER depletion might contribute to apoptosis without any $[Ca^{2+}]_i$ increase have been reported by He *et al.* (2002): (i) depletion of the ER Ca^{2+} pools might destabilize the Ca^{2+} -protein gel and its associated membrane, leading to vesiculation and the formation of apoptotic blebs, (ii) disruption of protein processing and transport within the ER may contribute to TG-induced apoptosis and (iii) TG-induced ER Ca^{2+} pools

depletion releases an endonuclease into the nucleus responsible for DNA fragmentation. Moreover, alternative mechanisms include the activation of caspase 12 which can be directly stimulated by depletion of the ER Ca^{2+} pool (McConkey & Nutt 2001).

Our results are the first which describe calcium-dependent apoptosis in androgen-independent PC cells. In effect, it has been recently demonstrated the TSU-PR1 cell line originally described as human androgen-independent PC cells and requiring Ca^{2+} entry for apoptosis in fact derives from T24 bladder carcinoma cells (van Bokhoven *et al.* 2001).

Apoptosis resistance of neuroendocrine-differentiated DU145 cells is conferred by modifications in the calcium homeostasis

Since we demonstrated the involvement of Ca^{2+} homeostasis perturbation in apoptosis induction in DU145 cells, we investigated the effect of NED on Ca^{2+} homeostasis. Our results failed to demonstrate any effect of NED on basal cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ or on the level of endoplasmic free calcium. By contrast, a reduction in the amount of calcium that can be released from the ER was observed following NED as well as capacitative calcium entry. This result clearly explains how neuroendocrine-differentiated cells become resistant to apoptosis, since we demonstrated that in DU145 cells the apoptosis level is proportionally dependent on the amplitude of Ca^{2+} increase induced by apoptotic signal. Thus the reduction of both the amount of Ca^{2+} that can be released from the stores and the subsequent Ca^{2+} entry into neuroendocrine-differentiated cells can account for the apoptosis resistance of neuroendocrine-differentiated cells. Such a prevention of apoptosis by a control calcium homeostasis has already been reported in mesangial cells, where a sustained increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that triggers apoptosis was thwarted by platelet-derived growth factor (Saleh *et al.* 2000). More recently, reduction of the expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in cisplatin-resistant cells has also been demonstrated, pointing out that regulation of the calcium signalplex is important to cancer progression and resistance to treatments (Tsunoda *et al.* 2005). In addition, a reduction in the calcium signalling (i.e. reduction of the calcium release and the calcium influx) has also been described as the mechanism leading to apoptosis resistance of PC cells (Prevarskaya *et al.* 2004, Vanoverberghe *et al.* 2004). In effect, apoptosis resistance conferred by NED in LNCaP cells was accompanied by a reduction in both calcium release and calcium entry (Vanoverberghe

et al. 2004). Thus, the reduction in the calcium signal caused by neuroendocrine-differentiated PC cells is a common mechanism that leads to the apoptosis resistance of PC cells besides an increase in survivin and clusterin (Xing *et al.* 2001, July *et al.* 2002).

These results highlight a new emergence path for neuroendocrine cells in prostate malignancy by demonstrating the neuroendocrine differentiating effect of EGF. Furthermore, we describe the reduction in the calcium signalling as being a common way inducing apoptosis resistance in neuroendocrine-differentiated PC cells. Our results suggest that targeting EGF and its receptor as well as calcium homeostasis in an attempt to enhance the proapoptotic potential of malignant cells may be a useful strategy in the treatment of advanced PC.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) and ARTP (Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate). The authors would like to thank Etienne Dewailly and Phillippe Marchetti for their technical assistance. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Abrahamsson PA 1999 Neuroendocrine cells in tumor growth of the prostate. *Endocrine Related Cancer* **6** 503–519.
- Aumuller G, Leonhardt M, Janssen M, Konrad L, Bjartell A & Abrahamsson PA 1999 Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* **53** 1041–1048.
- Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha MJ, Tsokos M, Sheahan MD & Nguyen P 1994 Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *PNAS* **91** 5330–5334.
- Barton J, Blackledge G & Wakeling A 2001 Growth factors and their receptors: new targets for prostate cancer therapy. *Urology* **58** 114–122.
- Bian X, Hughes FM Jr, Huang Y, Cidlowski JA & Putney JW 1997 Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **272** C1241–C1249.
- Blutt SE, Allegretto EA, Pike JW & Weigel NL 1997 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G1. *Endocrinology* **138** 1491–1497.

- Bonkhoff H & Remberger K 1996 Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* **28** 98–106.
- Burchardt T, Burchardt M, Chen MW, Cao Y, de la Taille A, Shabsigh A, Hayek O, Dorai T & Buttyan R 1999 Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *Journal of Urology* **162** 1800–1805.
- Chung LW 1995 The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surveys* **23** 33–42.
- Connolly JM & Rose DP 1991 Autocrine regulation of DU145 human prostate cancer cell growth by epidermal growth factor-related polypeptides. *Prostate* **19** 173–180.
- Cox ME, Deeble PD, Bissonette EA & Parsons SJ 2000 Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *Journal of Biological Chemistry* **275** 13812–13818.
- Crawford ED 1989 Combined androgen blockade. *Urology* **34** 22–26.
- Cunha GR 1994 Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer* **74** 1030–1044.
- Cussenot O, Villette JM, Cochand-Priollet B & Berthon P 1998 Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Supplement* **8** 43–51.
- Denmeade SR, Lin XS & Isaacs JT 1996 Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* **28** 251–265.
- Dowd DR, MacDonald PN, Komm BS, Haussler MR & Miesfeld RL 1992 Stable expression of the calbindin-D28K complementary DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Molecular Endocrinology* **6** 1843–1848.
- Fang WG, Pirnia F, Bang YJ, Myers CE & Trepel JB 1992 P2-purinergic receptor agonists inhibit the growth of androgen-independent prostate carcinoma cells. *Journal of Clinical Investigation* **89** 191–196.
- Fixemer T, Remberger K & Bonkhoff H 2002 Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* **53** 118–123.
- Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL & Isaacs JT 1994 The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Research* **54** 6167–6175.
- Grobholz R, Griebe M, Sauer CG, Michel MS, Trojan L & Bleyl U 2005 Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Human Pathology* **36** 562–570.
- Gryniewicz R, Poenie M & Tsien RY 1985 A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260** 3440–3450.
- He H, Lam M, McCormick TS & Distelhorst CW 1997 Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *Journal of Cell Biology* **138** 1219–1228.
- He Q, Lee DI, Rong R, Yu M, Luo X, Klein M, El-Deiry WS, Huang Y, Hussain A & Sheikh MS 2002 Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene* **21** 2623–2633.
- Humez S, Monet M, van Coppenolle F, Delcourt P & Prevarskaya N 2004a The role of intracellular pH in cell growth arrest induced by ATP. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **287** C1733–C1746.
- Humez S, Legrand G, Vanden-Abeeel F, Monet M, Marchetti P, Lepage G, Crepin A, Dewailly E, Wuytack F & Prevarskaya N 2004b Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNF α . *Journal of Cellular Physiology* **201** 201–213.
- Jiang Y & Julian FJ 1998 Effects of isoflurane on [Ca²⁺]_i, SR Ca²⁺ content, and twitch force in intact trabeculae. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* **275** H1360–H1369.
- Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, Van Weerden WM, Martens GJ, van der Kwast TH, Schroder FH & van Steenbrugge GJ 1999 Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *American Journal of Pathology* **154** 543–551.
- July LV, Akbari M, Zellweger T, Jones EC, Goldenberg SL & Gleave ME 2002 Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy. *Prostate* **50** 179–188.
- Kim J, Adam RM & Freeman MR 2002 Activation of the Erk mitogen-activated protein kinase pathway stimulates neuroendocrine differentiation in LNCaP cells independently of cell cycle withdrawal and STAT3 phosphorylation. *Cancer Research* **62** 1549–1554.
- Koch GL 1990 The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioessays* **12** 527–531.
- Krijnen JL, Janssen PJ, Ruizeveld de Winter JA, van Krimpen H, Schroder FH & van der Kwast TH 1993 Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry* **100** 393–398.
- Kyprianou N, English HF & Isaacs J 1990 Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Research* **50** 3748–3753.
- Landis SH, Murray T, Bolden S & Wingo PA 1998 Cancer statistics. *CA A Cancer Journal for Clinicians* **48** 6–29.
- Mariot P, Vanoverberghe K, Lalevee N, Rossier MF & Prevarskaya N 2002 Overexpression of an α 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **277** 10824–10833.
- McConkey DJ & Nutt LK 2001 Calcium flux measurements in apoptosis. *Methods in Cell Biology* **66** 229–246.

- Mimeault M, Pommery N & Henichart JP 2003 New advances on prostate carcinogenesis and therapies: involvement of EGF-EGFR transduction system. *Growth Factors* **21** 1–14.
- Mori S, Murakami-Mori K & Bonavida B 1999 Interleukin-6 induces G1 arrest through induction of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, and neuron-like morphology in LNCaP prostate tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257** 609–664.
- Orrenius S, Zhivotovsky B & Nicotera P 2003 Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4** 552–565.
- Prevarskaya N, Skryma R & Shuba Y 2004 Ca^{2+} homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322** 1326–1335.
- Saleh H, Schlatter E, Lang D, Pauels HG & Heidenreich S 2000 Regulation of mesangial cell apoptosis and proliferation by intracellular Ca^{2+} signals. *Kidney International* **58** 1876–1884.
- Sambrook JF 1990 The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell* **61** 197–199.
- Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Abeele FV, Legrand G, Humez S, Boilly B & Prevarskaya N 2000 Store depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *Journal of Physiology* **527** 71–83.
- Tsunoda T, Koga H, Yokomizo A, Tatsugami K, Eto M, Inokuchi J, Hirata A, Masuda K, Okumura K & Naito S 2005 Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor type1 (IP_3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene* **24** 1396–1402.
- van Bokhoven A, Varela-Garcia M, Korch C & Miller GJ 2001 TSU-Pr1 and JCA-1 cells are derivatives of T24 bladder carcinoma cells and are not of prostatic origin. *Cancer Research* **61** 6340–6344.
- Vanoverberghe K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R & Prevarskaya N 2004 Ca^{2+} homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine differentiated prostate cancer cells. *Cell Death and Differentiation* **11** 321–330.
- Vashchenko N & Abrahamsson PA 2005 Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *European Urology* **47** 147–155.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF & Reed JC 1999 Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284** 339–343.
- Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E & Young CY 2001 Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate* **48** 7–15.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B & Kroemer G 1995 Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Journal of Experimental Medicine* **182** 367–377.
- Zelivianski S, Verni M, Moore C, Kondrikov D, Taylor R & Lin MF 2001 Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta* **1539** 28–43.

CHAPITRE 2

ARTICLE 3

PI3-KINASE FAVORISE L'ACTIVITE TRPV2 INDEPENDAMMENT DE LA TRANSLOCATION DU CANAL A LA MEMBRANE PLASMIQUE

Dans cet article, nous avons étudié l'activation et la régulation du canal mTRPV2 (TRPV2 murin) en insérant son gène dans des modèles de surexpression. Le but était de caractériser le canal mTRPV2, jusqu'alors mal connu.

Nous montrons que la surexpression transitoire de mTRPV2 dans les HEK293 peut induire une altération morphologique ainsi qu'une cytotoxicité directement liée à l'activité du canal. La mutation du pore du canal ou la diminution de la concentration en calcium extracellulaire permet d'empêcher cette cytotoxicité.

Nous montrons également que la surexpression du canal mTRPV2 dans des clones stables CHO permet de générer un courant rectificant entrant enregistrable à tous les potentiels. De plus, nous avons également observé que cette surexpression stable induisait une activation constitutive du canal mTRPV2 entraînant une augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique. Cette augmentation peut être inhibée par une privation en sérum.

En mesurant la cytotoxicité et en quantifiant l'expression du canal mTRPV2 à la surface des cellules, nous avons prouvé que l'inhibition de la voie PI3-kinase diminuait l'activité du canal sans affecter sa translocation vers la membrane plasmique.

En conclusion, la voie PI3-kinase induit ou module l'activité des canaux mTRPV2 surexprimés, contrairement à ce qui a été précédemment décrit, et l'activation des canaux mTRPV2 par la voie PI3-kinase n'est pas dû à la translocation de canal vers la membrane plasmique.

PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane

Aubin Penna^a, Véronique Juvin^a, Jean Chemin^b, Vincent Compan^a,
Michael Monet^c, François-A. Rassendren^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Institut de Génétique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, Université Montpellier I, Université Montpellier II, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex, France

^b Department of Physiology, Institut de Génétique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, Université Montpellier I, Université Montpellier II, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex, France

^c Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 9 August 2005; received in revised form 12 January 2006; accepted 30 January 2006
Available online 14 March 2006

Abstract

Cellular or chemical activators for most transient receptor potential channels of the vanilloid subfamily (TRPV) have been identified in recent years. A remarkable exception to this is TRPV2, for which cellular events leading to channel activation are still a matter of debate. Diverse stimuli such as extreme heat or phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-kinase) regulated membrane insertion have been shown to promote TRPV2 channel activity. However, some of these results have proved difficult to reproduce and may underlie different gating mechanisms depending on the cell type in which TRPV2 channels are expressed. Here, we show that expression of recombinant TRPV2 can induce cytotoxicity that is directly related to channel activity since it can be prevented by introducing a charge substitution in the pore-forming domain of the channel, or by reducing extracellular calcium. In stably transfected cells, TRPV2 expression results in an outwardly rectifying current that can be recorded at all potentials, and in an increase of resting intracellular calcium concentration that can be partly prevented by serum starvation. Using cytotoxicity as a read-out of channel activity and direct measurements of cell surface expression of TRPV2, we show that inhibition of the PI3-kinase decreases TRPV2 channel activity but does not affect the trafficking of the channel to the plasma membrane. It is concluded that PI3-kinase induces or modulates the activity of recombinant TRPV2 channels; in contrast to the previously proposed mechanism, activation of TRPV2 channels by PI3-kinase is not due to channel translocation to the plasma membrane.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: PI3-kinase; TRPV2; Cytotoxicity; Translocation

1. Introduction

Extracellular calcium influx initiates essential intracellular signaling events leading to diverse functions such as secretion, gene expression, cell proliferation and differentiation or cell death [1]. In non-excitabile cells, calcium influx is mostly mediated by ion channels that are gated by various intracellular second messengers or activated following depletion of intracellular calcium stores [2]. The molecular

identity of most of these ion channels has been established in human as well as in different model organisms including *C. elegans*, *Drosophila* and mouse. These channels have been named TRP channels, since they are encoded by a large family of genes which codes for proteins that display strong structural homologies with the *Drosophila* TRP protein. Based on sequence homology, mammalian TRP genes have been further subdivided into seven classes including three main subfamilies called TRPC, TRPV and TRPM. Subsequent physiological studies have shown that TRP channels within the same subfamily also display functional homologies, based on their involvement in second messenger induced

* Corresponding author. Tel.: +33 499 61 99 78; fax: +33 499 61 99 01.
E-mail address: far@igh.cnrs.fr (François-A. Rassendren).

calcium influx, and in calcium signals implicating store-operated channels [3].

All members of the TRP superfamily share the same membrane topology as voltage-gated potassium channels; they have six hydrophobic domains thought to span the plasma membrane and an additional P-loop structure between the fifth and the sixth transmembrane segments that participates in the pore-forming domain of the channel [4]. To date, all TRP channels that have been functionally expressed display cationic selectivity with calcium permeabilities ranging from high (TRPV6) to null (TRPM4 and TRPM5) [5].

The precise cellular functions of most TRP channels remain unresolved, due to the lack of specific pharmacological tools and also due to their complex mode of gating. Only in the case of TRPV proteins, have pharmacological agonists and cellular events leading to channel opening been characterized in some detail [6,7].

Although TRPV1, TRPV3 and TRPV4 channels act unambiguously as cellular temperature sensors, the gating of endogenous TRPV2 by noxious heat is still a matter of debate. If TRPV2 is expressed in large diameter dorsal root ganglion neurons that also express capsaicin-insensitive heat activated channels [8], it is also present in numerous other tissues, especially in immune cells [9] where a primary physiological role as thermal sensor remains questionable. In non-neuronal cell lines such as pancreatic MIN6 or CHO cells, it has been proposed that TRPV2 channel activity might be regulated by growth factor signaling [10]. Growth factors present in serum appear to induce a dynamic and transient translocation of the TRPV2 channel from intracellular compartments to the plasma membrane through a phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-kinase)-dependent pathway [10,11]. Other TRPV2 activation mechanisms have also been proposed. In myocytes, TRPV2 channels behave as mechano- and osmo-gated channels and could be involved in the regulation of vascular tone or in myocyte degeneration [12,13].

Our initial aim in this study was to further investigate growth factor-induced translocation of TRPV2 after transient expression in immortalized cell lines. To our surprise, we found that expression of mouse TRPV2 channels (mTRPV2) in HEK-293 cells induced morphological alterations and cell death. These events could be prevented by reducing extracellular calcium concentration or when a mutant mTRPV2 channel carrying a charge substitution (Glu⁵⁹⁴ to Lys⁵⁹⁴) in the pore-forming domain was expressed in HEK cells, indicating that cellular toxicity was directly linked to mTRPV2 channel activity. TRPV2-mediated cytotoxicity could also be prevented by inhibition of PI3-kinase with chemical inhibitors or following serum deprivation. In stably transfected CHO cells, we found that mTRPV2 but not the pore mutant channels displayed a constitutive activity that resulted in increased resting calcium levels, events that could also be prevented by serum starvation. Finally, using different experimental approaches we show that surface expression of TRPV2 is not regulated

by PI3-kinase. Our data suggest that PI3-kinase regulates TRPV2 gating but has no role in the trafficking of the channel to the plasma membrane.

2. Material and methods

2.1. Reagents and antibodies

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich except for protease inhibitors that were from Roche. Culture media and reagents were obtained from Invitrogen.

Anti-flag biotinylated M2 monoclonal antibody (1:1000), anti-flag M2 agarose beads and anti-flag HRP conjugated (WB: 1:8000; ELISA: 1:6000) were obtained from Sigma–Aldrich. Anti-HA 12CA5 monoclonal antibody (1:150) was from Roche. Anti-VRL-1 polyclonal antibody (1:100) was from Oncogene. Streptavidin–Texas Red (1:1000) was from Amersham. Cy3-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch (anti-rabbit, 1:1000; anti-mouse 1:2000). Streptavidin–HRP (1:50,000) was from Pierce.

2.2. cDNA cloning, epitope tagging and site-directed mutagenesis

Human TRPV2 cDNA was isolated from a CF-PAC1 pancreatic cell line library by high stringency screening using the human EST clone BG765155 as a probe. Two independent full-length clones were isolated and sequenced. Mouse TRPV2 was cloned by RT-PCR from thymus single strand cDNA. All clones were analyzed by sequencing.

Flag tag sequence (DYKDDDDK) or HA tag sequence (YPYDVPDYA) were introduced in frame by overlapping PCR as described previously [14]. Flag tags were inserted either at the N-termini of mouse and human TRPV2 channels or in the first extracellular loop of the mouse TRPV2 channel between residues S⁴²⁰ and K⁴²¹. HA tag was inserted at a similar position in an N-terminally flag-tagged human TRPV2 channel (between residues A⁴¹⁹ and A⁴²⁰). Amino acid substitutions were generated by using oligonucleotide-directed mutagenesis as previously described [15]. All constructs were verified by DNA sequencing.

2.3. Cell culture and transfection

Human embryonic kidney cells (HEK-293) and Chinese hamster ovary cells (CHO) were grown in DMEM/Hepes and F12 (HAM) nutrient mixture, respectively. All culture media were supplemented with 1% Glutamax-I, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% fetal calf serum. DNA transfections were performed by using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) for HEK cells, or jetPEI (Qbiogene) for CHO, according to instructions provided by the manufacturers. When indicated, cells were co-transfected with an EGFP-encoding plasmid and the channel-encoding

plasmid at a ratio of 1/10, and the total amount of DNA was 1 μ g. For stable cell line generation, CHO cells were transfected with mouse TRPV2 cDNA subcloned into pcDNA3 vector. After neomycin selection, monoclonal stable cells were isolated.

2.4. Immunocytochemistry

Cells were seeded, 12 h after transfection, on polyornithine-coated 25 mm glass coverslips and cultured for 24–36 h in the conditioned medium indicated in the figure legends. For classical indirect immunofluorescence microscopy, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, washed with a solution of 0.1 M glycine and then permeabilized using 0.05% Triton-X100 for 5 min. Blocking of non-specific binding sites was performed by incubating cells with PBS containing 0.5% BSA for 30 min. Cells were incubated with the primary antibody overnight at 4 °C. After PBS washes, fluorescent secondary antibody was added for 30 min at 37 °C. To visualize all the cells present on coverslips, cell nuclei were stained with Hoechst (1:1000, Sigma) for 1 min at room temperature. After extensive washing, coverslips were mounted and viewed with a Leica DMRA2 fluorescent microscope. For deconvolution and image reconstruction, images of fixed cells were processed with the Huygens Professional Software from Scientific Volume Imaging BV using MLE algorithms.

For *in vivo* labelling, extracellular HA-tagged hTRPV2 transfected cells were starved for 12 h in a medium containing 0.5% FCS and then for an additional 3 h in the complete absence of serum. When indicated, 10% FCS was added for a further 15 min. Membrane expression of the channel was revealed by incubating cells with the anti-HA 12CA5 monoclonal antibody directly into the conditioned culture medium for 45 min at 37 °C. Cells were then washed with culture medium and PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, washed with a solution of 0.1 M glycine, blocked with PBS containing 0.5% BSA for 30 min and then incubated with fluorescent secondary antibody as described previously. After washes, coverslips were mounted and viewed through an oil immersion 100 \times objective on a Leica DMRA2 fluorescent microscope.

2.5. Cell counting and statistical analysis

For quantitative analysis of GFP and double GFP/flag expression, cells were independently scored in five random fields through a 40 \times oil objective. All results were normalized to the total number of cells in the five fields (Hoechst positive cells). Because there is good evidence that P2X2 does not induce cytotoxic changes [16,17] results were normalized to the number of GFP fluorescent cells in GFP–P2X2 co-transfected cells.

Statistical analysis was performed with unpaired Student's *t*-test using GraphPad Prism, (GraphPad software, San Diego, CA) except for Fig. 4A for which a one-way ANOVA test

was used. In all figures, the number *n* indicates independent experiments.

2.6. Cytotoxicity assay

Transfected living cells plated on glass coverslips were washed with PBS and stained for cell death with the Annexin-V-FLUOS staining kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Images were collected directly through a 20 \times dry objective on a Leica DMRA2 fluorescent microscope. For positive controls of cell death, P2X7 transfected cells were stimulated for 10 min with 300 μ M ATP at 37 °C in the presence of propidium iodide.

2.7. Intracellular calcium measurements

For Fluo-4 calcium measurements, parental and stable expressing CHO cells were plated in poly-ornithine coated 96-well plates at a density of 10⁵ cells per well. Plates were washed three times in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 10 mM Hepes and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of this solution were adjusted to 310 mOsm and 7.4, respectively. Cells were then incubated in HBSS supplemented with 2.5 mM probenecid (Sigma), 100 μ g/ml pluronic acid (Molecular Probes) and 1 μ M Fluo4-AM (Molecular Probes) for 1 h at 37 °C. Following the incubation, cells were washed twice with HBSS and kept in 50 μ l of HBSS. Intracellular calcium measurements were performed on a fluid handling integrated fluorescence plate reader (FlexStation II, Molecular Devices). The fluo4 fluorescence was read at excitation and emission wavelengths of 494 and 525 nm, respectively, from the bottom of the plate at 0.5 Hz for 2 min. All experiments were performed at 30 °C. Each condition was performed in triplicate; for each well, fluorescence was integrated over a 1-min period, expressed as a single value and the values for three wells of the same condition were averaged. Results were normalized to fluorescence values obtained in parental CHO cells under control conditions.

For Ca²⁺ measurements using Fura-2 AM, CHO culture medium was replaced by an HBSS solution. When a Ca²⁺ free medium was required, CaCl₂ was omitted and replaced by equimolar MgCl₂. Dye loading was achieved by transferring the cells into a standard HBSS solution containing 1 mM Fura-2 AM (Calbiochem) for 40 min at 37 °C, then rinsing them three times with dye free solution. Intracellular Ca²⁺ was measured by an imaging system (Princeton). The glass coverslip was mounted in a chamber on an Olympus microscope equipped for fluorescence. Fura-2 fluorescence was excited at 340 and 380 nm and the emitted fluorescence was measured at 510 nm. The [Ca²⁺]_{cyt} concentration was derived from the ratio of the fluorescence intensities for each of the excitation wavelengths (F_{340}/F_{380}), and from the Grynkiewicz equation ($K_d = 224$ nM, $R_{min} = 0.18$ and $R_{max} = 1.7$). All recordings were made at 37 °C. The

cells were continuously perfused with HBSS solution via a whole-chamber perfusion system. The flow rate of the whole-chamber perfusion system was set to 1 ml/min and the chamber volume was 500 μ l. Results were expressed as mean \pm S.E.M. Plots were produced using Origin 5.0 (Microcal Software). Each experiment was repeated at least three times. The Tukey–Kramer test was used for statistical comparison of means and differences, *** $P < 0.001$.

2.8. Electrophysiological recordings

For electrophysiological analysis, cells were plated at the density of 2×10^5 cells per 35 mm culture dish. One to two days after plating, whole-cell currents were recorded at room temperature. The extracellular solution contained (in mM) 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ and 10 Hepes (pH adjusted to 7.35 with NaOH, 330 mOsm). Pipettes had a resistance of 1.5–3 M when filled with a solution containing (in mM): 140 CsCl, 10 EGTA, 10 Hepes, 3 Mg-ATP, 2 CaCl₂ and 0.6 GTP-Na (pH adjusted to 7.2 with CsOH, 315 mOsm). Recordings were performed using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). Holding potential was -60 mV. Currents were recorded in response to 900 ms voltage ramps from -100 to $+100$ mV applied every 5 s. The sampling frequency for acquisition was 10 kHz and data were filtered at 2 kHz. Data were analyzed using pClamp9 (Molecular Devices) and Prism4 (GraphPad) software.

2.9. Cell surface expression assay

Cells were transfected in 35 mm dishes and 6 h after transfection, the contents of each dish were divided into 4 wells of a 12-well plate. Assays were carried out 48 h after culture in the conditioned media indicated in the figure legend. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min and either permeabilized using 0.1% Triton-X100 or not. Cells were incubated in blocking solution (PBS/1% fetal calf serum) for 30 min and then with an anti-flag M2 antibody directly coupled with HRP for 1 h at room temperature. Luminescence was measured using Supersignal ELISA femto Maximum sensitivity substrate (Pierce) and quantified in a Victor 2 luminometer (Perkin-Elmer). Surface expression was calculated as the ratio of the signal obtained for non-permeabilized cells (representing the amount of protein at the cell surface), and the signal obtained for permeabilized cells (which represents the total cellular amount of proteins).

2.10. Plasma membrane protein biotinylation, immunoprecipitation and Western blotting

Following the same serum starvation and/or stimulation as for in vivo labelling, transfected HEK-293 cells grown on polyornithine coated dishes were washed twice in ice-cold PBS containing 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ (PBS-CM). Cell surface expressed proteins were labelled using 1 mg/ml sulfo-NHS-Biotin (Pierce) for 30 min at 4 °C in biotinylation

buffer (10 mM TEA, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 9). Cells were washed twice with PBS-CM containing 0.1% BSA (5 min) and once with PBS. Lysis was performed by scraping cells in 500 μ l of lysis buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton-X100, 2 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml bestatin, 2 μ g/ml leupeptin, 0.5 μ g/ml aprotinin and 30 μ M Pefabloc) and passed five times through a 26G needle. After 30 min of solubilization at 4 °C under agitation, lysates were centrifuged (16,000 $\times g$, 10 min, 4 °C) and the supernatant was collected. Equal amounts of protein (500–750 μ g) were incubated with 40 μ l of anti-flag-conjugated agarose beads (Sigma) overnight at 4 °C on a rotating wheel. Beads were washed three times (5 min at 4 °C) in 20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol and 0.1% Triton-X100. Proteins were eluted by incubation with 20 μ l of 200 mM glycine, pH 2.2, neutralized with 4 μ l of 1 M Tris-HCl, pH 8.5, and diluted in Laemmli buffer. Proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and visualized using either streptavidin-HRP or anti-flag-HRP, and ECL+ detection kit (Amersham).

In each experiment, a flag-tagged intracellular protein was expressed as permeabilization control during the labelling procedure and immuno-depletion of all samples was checked by SDS-PAGE on protein of the flow-through.

3. Results

3.1. Transient expression of mTRPV2 results in morphological alterations and cytotoxicity

To monitor membrane expression of TRPV2 channels, HEK cells were transfected with plasmids encoding either mTRPV2 channel or the ATP-gated channel P2X2, the latter being used as a control. Both channels carried an extracellular flag epitope to detect proteins expressed at the plasma membrane [15]. As illustrated in Fig. 1A, cells transfected with mTRPV2, identified following anti-flag immunostaining, presented marked morphological alterations. Typically, mTRPV2 transfected cells displayed a spread out morphology with vacuolated cytoplasm and numerous filopodia. In contrast, P2X2 transfected and non-transfected cells displayed almost round morphology, compact cytoplasm and occasionally one or two cellular processes. These morphological characteristics of mTRPV2-expressing cells are typical of cellular necrosis, and suggested that expression of TRPV2 could have cytotoxic effects. We therefore determined whether the number of mTRPV2-transfected cells was reduced 48 h after transfection compared to control P2X2-flag transfected cells. In all experiments an EGFP plasmid was co-expressed either with P2X2-flag or mTRPV2-flag cDNAs. Protein expression was visualized using flag immunoreactivity and GFP fluorescence. Because P2X2 receptors have no known cytotoxic effect, all results were normalized to the number of GFP fluorescent cells counted among GFP-P2X2-flag transfected cells. As shown in

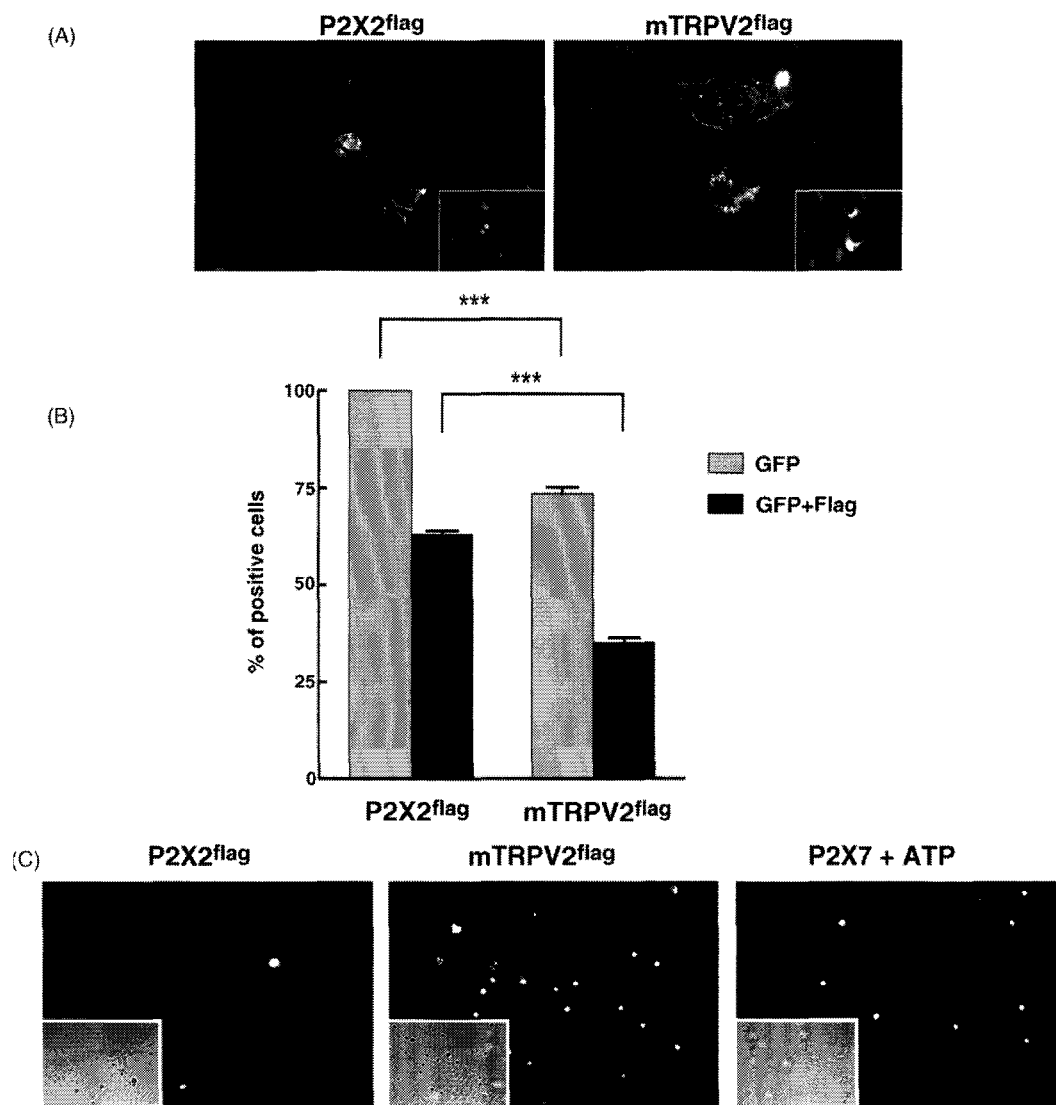


Fig. 1. mTRPV2 induces morphological alterations and cytotoxicity in HEK transfected cells. (A) HEK cells were co-transfected with an EGFP encoding plasmid and either P2X2-flag or mTRPV2-flag constructs, the epitope being extracellularly localized. Immunostaining was performed on fixed and permeabilized cells using a biotinylated anti-flag antibody and streptavidin–Texas Red conjugate. *Insets* show GFP fluorescence used as transfection control. Note the difference in cell morphology between P2X2-flag and mTRPV2-flag transfected cells. (B) Quantification of cell number. Cells were co-transfected as in (A) and their numbers estimated by counting. Number of GFP expressing cells (GFP, grey bars) and double GFP/flag positive cells (GFP + flag, black bars) were normalized as described in Section 2. Results are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 7$); *** $p < 0.001$, Student's *t*-test. When mTRPV2 was co-transfected with GFP, a strong reduction of the number of both GFP expressing cells and GFP/mTRPV2 double positive cells was observed as compared to cells co-transfected with P2X2 and GFP. Note that the proportion of cells expressing GFP was always higher than double positive cells, indicating a higher efficiency of transfection with GFP. (C) Cytotoxicity was assessed by PI staining on HEK cells transfected either with mTRPV2-flag, P2X2-flag (negative control) or with P2X7 and stimulated with 300 μ M ATP (positive control). *Insets* show phase contrast pictures used to assess the total number of cells in each field. PI staining was observed only in mTRPV2-flag and in ATP-stimulated P2X7 expressing cells, indicating that mTRPV2 induces cell death.

Fig. 1B, when HEK cells were co-transfected with P2X2-flag and GFP, $62.9 \pm 2.8\%$ ($n = 7$) of cells showed flag immunostaining as compared to cells expressing GFP, indicating a higher transfection efficiency for GFP plasmids than for P2X2 cDNA. However, when cells were co-transfected with mTRPV2-flag and GFP, both the number of flag and GFP positive cells were reduced to $35.1 \pm 3.5\%$ ($n = 6$) and $73.5 \pm 4.2\%$ ($n = 7$), respectively. The decrease of both mTRPV2 and GFP positive cells suggested that mTRPV2 expression might have a cytotoxic effect. Alternatively, co-

expression of mTRPV2 and GFP could have lower efficiency. To test between these two hypotheses, we performed a cytotoxicity assay based on propidium iodide (PI) staining. HEK cells were transfected either with mTRPV2-flag, P2X2-flag as negative control or with P2X7 as positive control; P2X7 has indeed been shown to induce cell death following its activation with extracellular ATP [18]. As shown in Fig. 1C, 48 h after transfection no apparent cell necrosis could be visualized in HEK cells expressing P2X2-flag receptors. However, cells expressing mTRPV2-flag displayed strong PI stain-

ing similar to that obtained in P2X7 expressing cells after stimulation with 300 μ M ATP. These results indicate that expression of mTRPV2 channel in HEK cells induces cell death, presumably through necrosis, since no evidence for apoptosis was detected (not shown).

3.2. An mTRPV2 permeation mutant prevents cell death

Different causes such as constitutive activity leading to intracellular calcium overload, plasmid poisoning or improper protein folding, might be responsible for mTRPV2-

induced cytotoxicity. To test whether cell death could be a consequence of channel activity, we introduced a charge substitution, Glu to Lys at position 594, in the pore-forming domain of mTRPV2-flag channels. In TRPV1, an identical substitution [E636K] in the permeation pathway leads to non-functional channels presumably by affecting cation permeation through the pore [19]. As shown in Fig. 2A, mTRPV2-flag[E594K] showed normal membrane localization when expressed in HEK cells and no difference in cell morphology was observed between P2X2-flag and mTRPV2-flag[E594K] transfected cells. The number of GFP positive

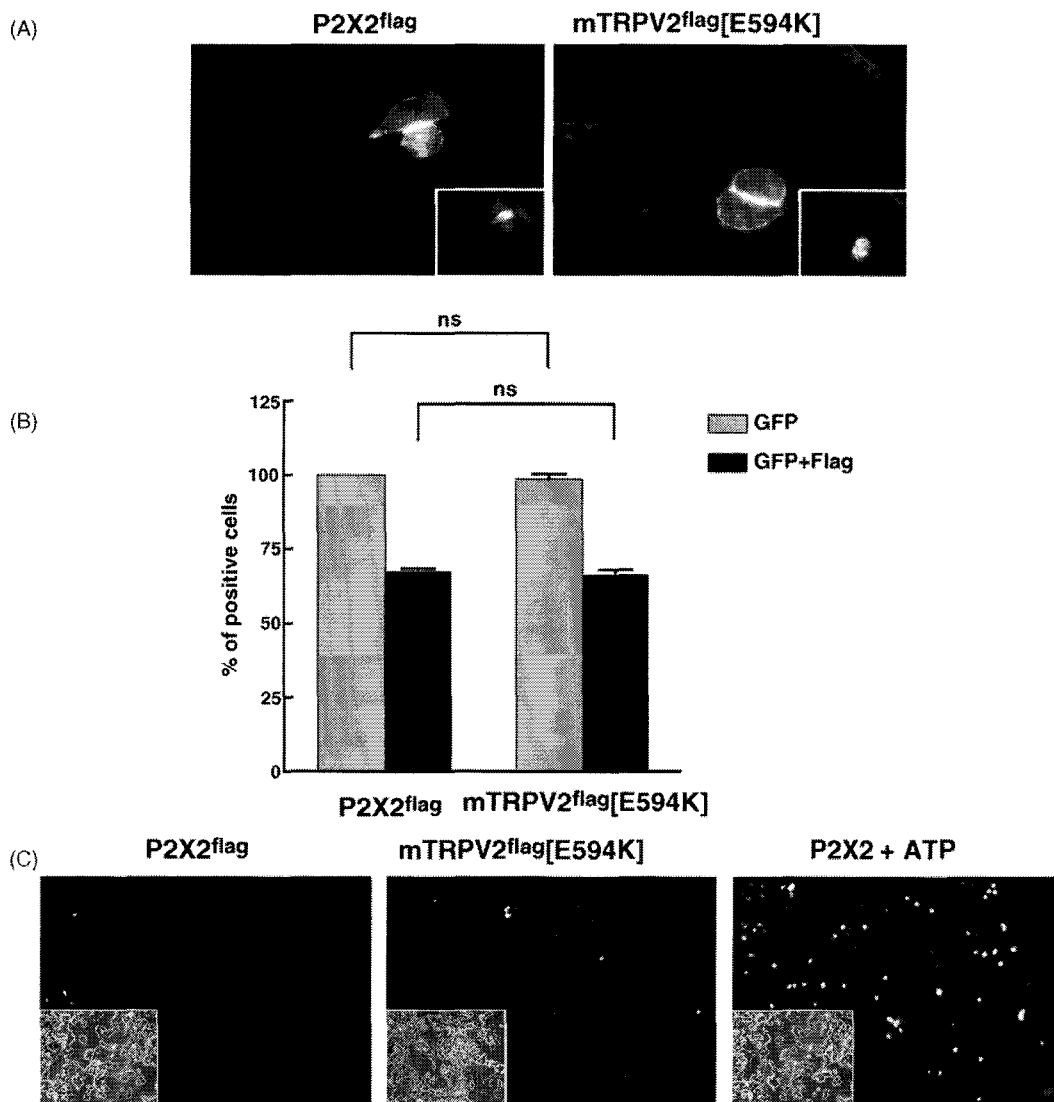


Fig. 2. mTRPV2 permeation mutant [E594K] is not cytotoxic in transfected HEK cells. HEK cells were co-transfected with an EGFP encoding plasmid and either P2X2-flag or the mTRPV2-flag[E594K] pore mutant constructs; experiments were performed as described for Fig. 1. (A) Immunostaining of HEK cells expressing mTRPV2[E594K] or P2X2 channels. No difference in cell morphology was observed between cells transfected with mTRPV2-flag[E594K] or P2X2-flag. *Insets* show GFP fluorescence used as transfection control. (B) Quantification of the number of cells: GFP positive (GFP, grey bars) and double positive for GFP and flag (GFP + flag, black bars). Note that in these experiments, 70% of cells co-expressed GFP and either channel. The numbers of cells expressing mTRPV2-flag[E594K] or P2X2-flag were not significantly different. Results are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 9$); ns, $p > 0.05$, Student's *t*-test. (C) The cytotoxic effect of mTRPV2-flag[E594K], P2X2-flag (negative control) and P2X7 in cells stimulated with 300 μ M ATP (positive control) was assessed by PI staining in transfected HEK cells. *Insets* show phase contrast pictures used to determine the total number of cells in each field. PI staining is almost absent in P2X2-flag and mTRPV2-flag[E594K] transfected cells whereas present in HEK cells expressing P2X7 after ATP stimulation, suggesting that mTRPV2-induced cytotoxicity is due to its constitutive activity.

cells expressing mutant TRPV2 channels or P2X2 receptors were not statistically different: 67.1 ± 3.7 and $66.1 \pm 5.3\%$ ($n=9$), respectively. Importantly, the total number of GFP positive cells were not different, indicating an equal efficiency of transfection of the mTRPV2-flag[E594K] and P2X2-flag cDNAs. To confirm the lack of cytotoxicity of the mTRPV2-flag[E594K] mutant, PI staining was performed 48 h after transfection, as described above. Fig. 2C clearly shows that no significant PI signal occurred in P2X2-flag or mTRPV2-flag[E594K] transfected cells, whereas ATP-stimulated P2X7 expressing cells display strong staining. Taken together these results strongly suggest that mTRPV2-induced cell death is linked to channel activity rather than to non-specific toxicity.

3.3. Cellular toxicity is linked to mTRPV2 channel activity and intracellular calcium overload

Although cellular mechanisms leading to TRPV2 channel gating are still controversial, one hypothesis is that TRPV2 channel activity is controlled by growth factors through a PI3-kinase-dependent signaling pathway [10]. We therefore tested whether inhibition of PI3-kinase either by serum starvation or by chemical inhibitors could reduce mTRPV2-induced cytotoxicity. In these experiments, cells were co-transfected with EGFP and either P2X2-flag, mTRPV2-flag or mTRPV2-flag[E594K]. Culture media were conditioned as described (see legend of Fig. 3). Forty-eight hours after transfection, flag immunostaining was performed and the number of GFP and double GFP/flag positive cells was independently quantified (see legend of Fig. 1). In normal culture conditions (Fig. 3A), the number of mTRPV2-transfected cells positive for both GFP and flag was reduced to $35.2 \pm 4.1\%$ ($n=6$) compared to $62.4 \pm 3.3\%$ ($n=6$) and $64.1 \pm 5.4\%$ ($n=6$) for P2X2-flag and mTRPV2-flag[E594K], respectively. Cells transfected with wild-type mTRPV2 also showed a significant reduction of GFP expressing cells, to $74.3 \pm 4.9\%$ ($n=6$), further demonstrating that mTRPV2 expression is directly linked to cytotoxicity. However, reducing the serum to 0.5%, or adding 25 μM LY294002 protected mTRPV2-flag expressing cells from death (Fig. 3B and C); the proportions of GFP/flag positive cells were $70.9 \pm 7.6\%$ ($n=3$) in 0.5% serum and $55.8 \pm 1.9\%$ ($n=3$) in complete medium supplemented with 25 μM LY294002. In these conditions, the numbers of cells expressing wild-type mTRPV2 were not significantly different from those of cells expressing either mTRPV2-flag[E594K] or P2X2-flag (see Fig. 3B and C).

These data suggest that serum factors, through a PI3-kinase pathway, may promote a constitutive activity of TRPV2 channels that results in a sustained calcium entry through the channel, intracellular calcium overload and cell death. To test this hypothesis, calcium concentration in the culture medium was reduced to a submillimolar range by addition of 1.5 mM EGTA to normal culture medium; mTRPV2 cytotoxicity was assayed as previously described.

As shown in Fig. 3D, reduction of extracellular calcium protected cells from mTRPV2-induced cytotoxicity; the proportion of cells expressing mTRPV2 ($54.6 \pm 5.2\%$, $n=3$) was not significantly different from that of cells expressing mTRPV2-flag[E594K] ($60.7 \pm 8.5\%$, $n=3$) or P2X2-flag ($65.7 \pm 4.3\%$, $n=3$), cultured in similar conditions. Reduction of extracellular calcium did not affect the relative proportion of cells expressing mTRPV2-flag[E594K] or P2X2-flag as compared to control conditions (compare Fig. 3A and D). These results show that mTRPV2-induced cell death is likely due to a constitutive channel activity and calcium overload.

3.4. mTRPV2 channels are constitutively activated in CHO cells

To further confirm that mTRPV2 channels are constitutively activated and responsible for a sustained calcium influx, electrophysiological recordings and intracellular calcium measurements were performed in CHO cells stably expressing the channel. In these cells, no apparent cytotoxicity of mTRPV2 was observed, conceivably because of a lower level of expression of the channel compared to levels achieved by transient transfection. In addition, the expected lack of activity of the mTRPV2[E594K] mutant was investigated. Currents were recorded in the whole cell configuration by applying voltage ramps from -100 to $+100$ mV, either in parental or stably transfected CHO cells. As shown in Fig. 4A, in such conditions, parental cells display almost no current at negative potentials and a small conductance for very depolarized potentials, whereas in stably transfected mTRPV2 cells, an outwardly rectifying conductance that reversed near -5 mV was consistently recorded (Fig. 4B). Current densities at -50 mV for parental and TRPV2 expressing cells were, respectively, 0.9 ± 0.5 pA/pF ($n=21$) and 4.9 ± 1.5 pA/pF ($n=10$), clearly indicating that mTRPV2 expression leads to a significant functional activity at resting membrane potential ($p < 0.01$, Student's *t*-test) (Fig. 4D and E). Furthermore, 2-aminoethoxydiphenyl borane (2-APB) and Ruthenium Red (RR), molecules that, respectively, activate or inhibit mTRPV2 channel function [20], did not alter the endogenous currents recorded in parental CHO cells. In contrast, currents recorded in TRPV2 expressing cells were strongly potentiated by 100 μM 2-APB whereas 10 μM Ruthenium Red completely inhibited both basal and 2-APB-stimulated currents; these currents thus showed all the hallmarks of TRPV2 channels. These results also demonstrate that at the resting membrane potential, TRPV2 channels are likely to be open. When the same analysis was performed using CHO cells transfected with the mTRPV2[E594K] mutant, current densities at -50 mV were 1.76 ± 1.5 pA/pF, $n=18$ and not statistically different from those of parental cells ($p=0.29$, Student's *t*-test). This was equally true in the presence of 100 μM 2-APB, although a small current could still be observed (Fig. 4C). This indicates that the charge substitution introduced in the pore-forming loop had indeed silenced mTRPV2 channels.

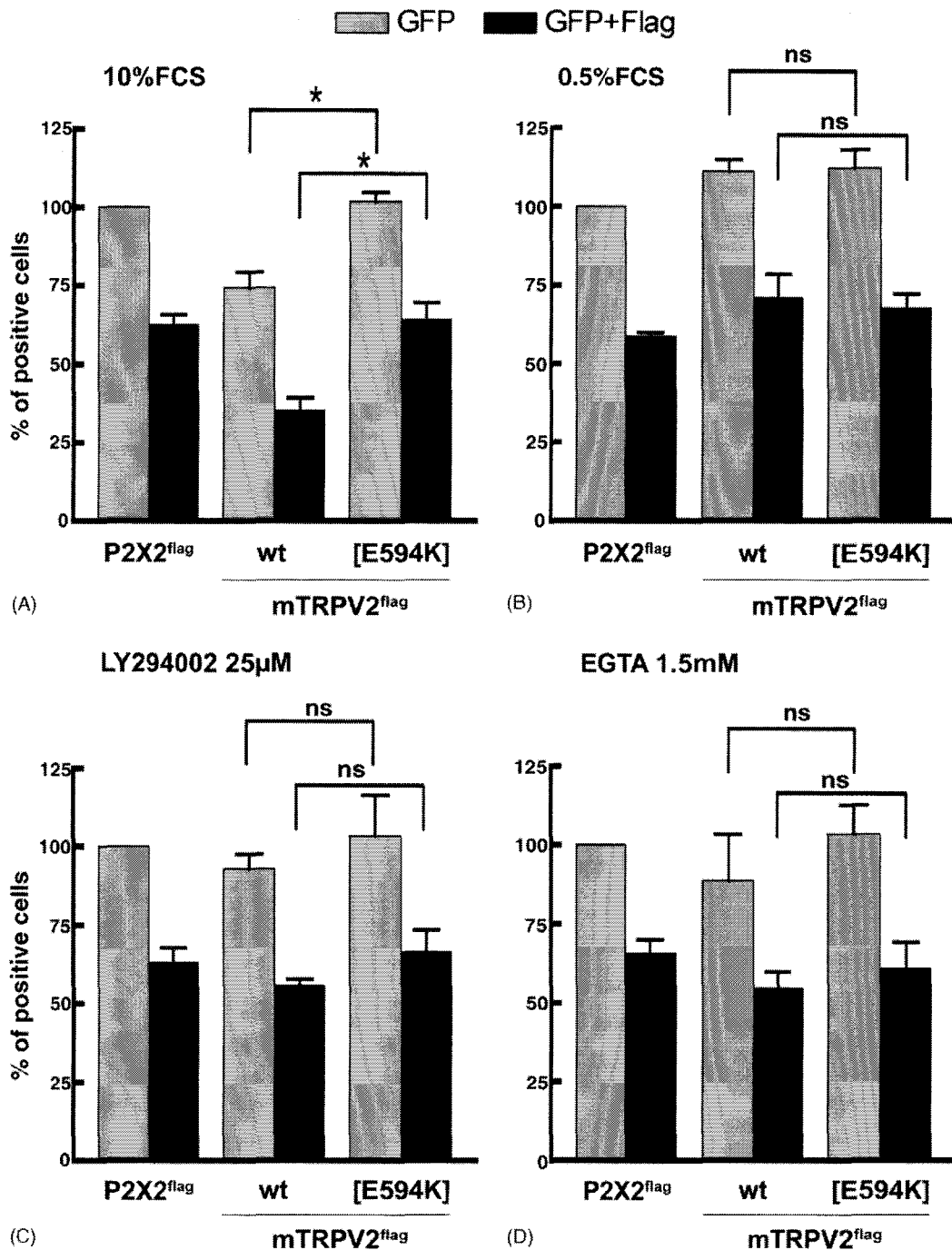


Fig. 3. mTRPV2 cytotoxicity is dependent on channel activity. HEK cells were co-transfected with EGFP and either P2X2-flag, mTRPV2-flag or mTRPV2-flag[E594K] encoding plasmids. Twelve hours after transfection, cells were grown for an additional 36 h in conditioned medium (10% FCS (A), 0.5% FCS (B), 10% FCS supplemented with 25 μ M LY294002 (C) and 10% FCS supplemented with 1.5 mM EGTA (D)). Immunostaining and cell quantification were performed as indicated (see legend of Fig. 1). Results are displayed as in Fig. 1: the number of GFP positive cells (grey bars) and double positive cells for GFP and flag (black bars) are normalized to the number of GFP positive cells in batches co-transfected with P2X2-flag and GFP; results are expressed as mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments; ns, $p > 0.05$; * $p < 0.05$, Student's *t*-test. Irrespective of growth condition, the number of P2X2-flag or mTRPV2-flag[E594K] expressing cells was not statistically different. In contrast, the number of mTRPV2-flag expressing cells in normal culture conditions (10% FCS) was significantly reduced compared to mTRPV2-flag[E594K] transfected cells (compare with Fig. 1). Note that in this case the number of GFP positive cells is also reduced (A). When serum was reduced to 0.5% (B), or when normal culture medium was supplemented with LY294002 (C) or EGTA (D), the numbers of cells expressing WT or the [E594K] mutant mTRPV2 channels are not significantly different, indicating a reduction in mTRPV2 activity.

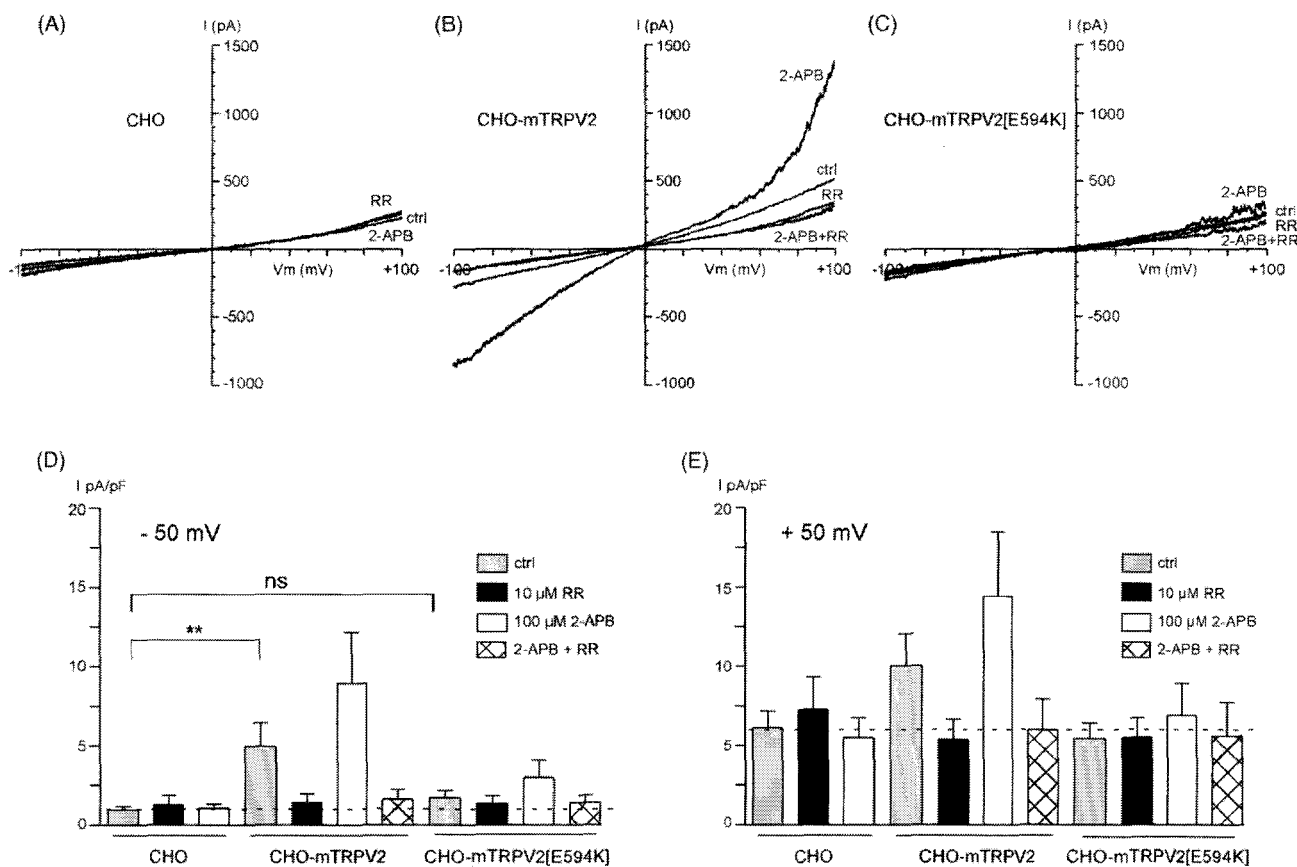


Fig. 4. mTRPV2 shows constitutive activity that is impaired by charge substitution introduced in the p-loop region. Whole cell recordings were performed in CHO cells either non-transfected, stably expressing mTRPV2 or transiently transfected with the mTRPV2[E594K] mutant. Cells were held at -60 mV and voltage ramps from -100 to $+100$ mV (900 ms, every 5 s) were applied to evoke currents. (B) CHO-mTRPV2 cells express an outwardly rectifying current that is enhanced by 100 μ M 2-APB and inhibited by 10 μ M Ruthenium Red (RR). This conductance is not present in parental cells (A) nor in cells expressing the mTRPV2[E594K] mutant (C). Current density analyses (D and E) show that TRPV2 channels are likely to be open at the resting membrane potential and suggest that CHO-mTRPV2 cells express either a limited number of channels or that the conductance of mTRPV2 is small. Results are mean \pm S.E.M.; ** $p < 0.01$; ns, $p > 0.05$, Student's t -test.

Because mTRPV2 channels are open at the resting membrane potential we investigated whether this constitutive activity had any effect on resting intracellular calcium concentration. Using the calcium indicator Fura-2, intracellular calcium levels were measured in CHO cells stably expressing mTRPV2 and parental cells. CHO-mTRPV2 cells displayed a significantly higher resting calcium concentration (135.1 ± 2.6 nM) compared to parental cells (100.1 ± 1.6 nM) ($p < 0.001$, Student's t -test). When cells were incubated in the absence of extracellular calcium, intracellular calcium levels of CHO-mTRPV2 cells were not different from parental cells indicating that, in resting conditions, mTRPV2 constitutive activity induces sustained calcium influx. We next evaluated whether the enhanced resting intracellular calcium levels in CHO-mTRPV2 cells could be modulated by serum starvation. These experiments were performed in a 96-well plate assay as described in Section 2. In control conditions, CHO-mTRPV2 cells displayed a significant increase in basal fluorescence compared to parental cells ($391.8 \pm 31.7\%$, $n = 6$ and 2 experiments, $p < 0.001$, Student's t -test). This increase was reduced to $179.6 \pm 9\%$ ($n = 6$ and

2 experiments) upon overnight serum starvation ($p < 0.05$, Student's t -test, compared to CHO-mTRPV2 cells in control conditions). No difference in the basal fluorescence of control cells was observed in parental CHO cells between control and starved conditions, indicating that serum starvation had no effect on dye loading. Taken together, these results clearly indicate that in resting conditions mTRPV2 channels display a constitutive activity that results in increased intracellular calcium levels. In addition, they also support the proposal that serum factors promote mTRPV2 channel activity.

3.5. TRPV2 channels are not dynamically translocated to the plasma membrane

Previous work on the mechanism of TRPV2 channel activation has provided evidence that these channels are constitutively active upon insertion in the plasma membrane, an event induced by a dynamic translocation of the channel from intracellular compartments to the membrane, triggered by growth factors through a PI3-kinase-dependent pathway

[10]. We therefore evaluated whether the lack of cytotoxicity observed following serum starvation or inhibition of PI3-kinase activity was due to a reduction of the number of TRPV2 channels in the plasma membrane. We took advantage of the presence of an extracellular tag in the mTRPV2 protein to directly quantify the amount of channels present at the cell surface, using a cellular based assay [15,21]. HEK cells were transfected with either mTRPV2-flag or P2X2-flag and kept in various conditioned media (10% serum, 0.5% serum, 10% serum and 100 nM wortmannin) as described in

Fig. 3. Forty-eight hours after transfection, cells were vigorously washed to remove cellular debris and dead cells before quantification of channel expression at the cell surface. As shown in Fig. 5A, in control conditions (10% serum), 72.2 ± 4% (*n* = 7) of mTRPV2 is expressed at the cell surface, similarly to P2X2 (69.7 ± 5.4%, *n* = 3). When PI3-kinase activity was reduced, the amount of TRPV2 expressed at the plasma membrane was not statistically affected, since it represented 74.1 ± 4.1% (*n* = 3) and 60.4 ± 2% (*n* = 3) in 0.5% serum or 100 nM wortmannin, respectively. The total

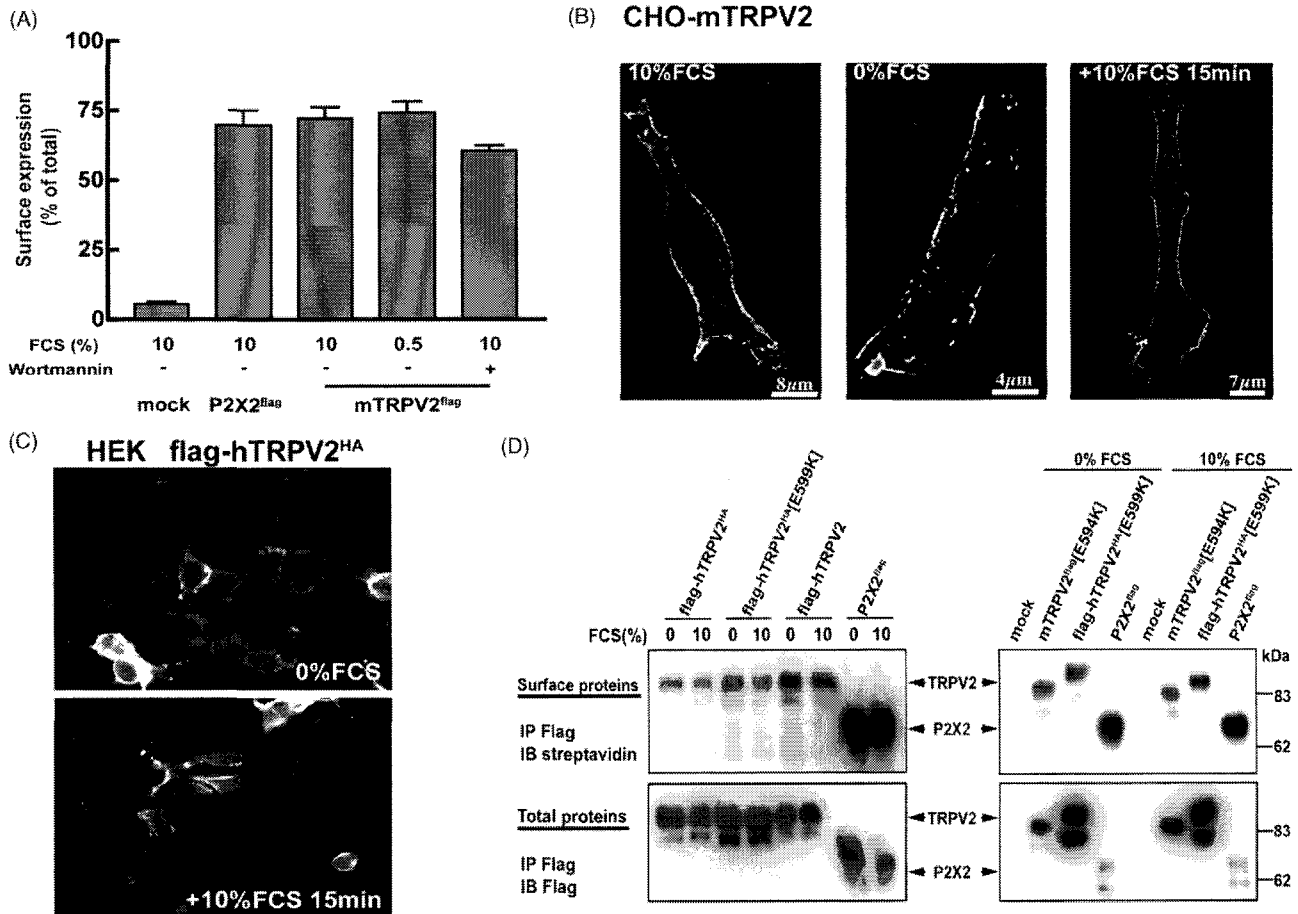


Fig. 5. Serum factors and PI3-kinase are not required for TRPV2 trafficking to the plasma membrane. (A) Direct quantification of TRPV2 surface expression by cellular ELISA. HEK cells were transfected with P2X2 or mTRPV2 constructs carrying an extracellular flag epitope. After 48 h of culture in a conditioned medium containing 10, 0.5 or 10% FCS and 100 nM wortmannin, chemiluminescence assay was directly performed on fixed cells as described in Section 2. Results are expressed as mean ± S.E.M. of the ratio of signals from non-permeabilized and permeabilized cells, giving a direct reading of the proportion of total cellular protein expressed at the plasma membrane. The same proportion of mTRPV2 channels was expressed at the cell surface regardless of the serum concentration or the presence of an inhibitor of PI3-kinase. Note that P2X2 and TRPV2 channels showed similar plasma membrane expression levels. (B) CHO cells stably expressing wild-type mTRPV2 channel were serum starved, or not, for a total of 15 h as described in Section 2; cells were then stimulated with 10% FCS for 15 min. mTRPV2 immunostaining was performed on fixed and permeabilized cells using an anti-VRIL specific polyclonal antibody and Cy3-conjugated anti-rabbit antibody. Digital image restoration was performed as described in Section 2; images presented are representative slices through the middle of the cell. No difference in the membrane localization of mTRPV2 was observed between the different serum conditions. (C) Serum factors do not induce dynamic translocation of the TRPV2 channel at the plasma membrane of living HEK cells. After 36 h of culture, flag-hTRPV2-HA HEK transfected cells were serum starved for a total of 15 h; cells were then stimulated with 10% FCS for 15 min. Plasma membrane expression of the flag-hTRPV2-HA channel was visualized by *in vivo* labeling using an anti-HA 12CA5 monoclonal antibody as described in Section 2. As observed for mTRPV2 expressed in CHO cells, flag-hTRPV2-HA expressed in HEK cells was always present at the plasma membrane, even after 15 h serum starvation. (D) HEK cells were transfected with different tagged TRPV2 or P2X2 constructs (as indicated) and subjected to the same serum starvation/stimulation paradigm as in (B). Membrane proteins were biotinylated; after flag immunoprecipitation, biotinylated proteins and total immunoprecipitated proteins were revealed with streptavidin-HRP or with an anti-flag-HRP antibody, respectively. Irrespective of epitope position, pore mutation, or serum starvation/stimulation, TRPV2 channels were consistently expressed at the plasma membrane.

amount of protein did not vary between the different experimental conditions (data not shown). This strongly suggests that PI3-kinase is not involved in the regulated trafficking of TRPV2 to the plasma membrane. Additional experiments were also performed on untagged mTRPV2 using CHO cells stably expressing mTRPV2 channels, in conditions as close as possible to previously published conditions [10]. Cells were kept either in normal cell culture conditions or serum starved for 12 h; in the latter case a 15 min serum stimulation was performed prior to cell fixation. Membrane expression of mTRPV2 channels was examined using immunofluorescent staining confocal microscopy and image deconvolution. As shown in Fig. 5B, in normal culture conditions, mTRPV2 is predominantly expressed at the plasma membrane; a similar pattern of expression is observed after serum starvation or after starvation and serum re-introduction. These results indicate that (i) the extracellularly located flag epitope is not responsible for a constitutive membrane localization of mTRPV2 channels and (ii) serum starvation does not affect the subcellular expression of mTRPV2 channels, as previously proposed [10].

Because TRPV2-mediated cell death is observed only in around 50% of the total TRPV2 transfected cell population (see Fig. 1B), we investigated whether, in the remaining TRPV2-transfected cells, serum was responsible for surface expression of TRPV2 channels. In this case, to look for possible species differences, we used an extracellular HA-tagged human TRPV2 channel (flag-hTRPV2-HA) expressed in HEK cells. Membrane expression of the channel was monitored following *in vivo* immunostaining. Thirty-six hours after transfection cells were serum-starved overnight, then stimulated with or without 10% serum for 15 min, the anti-HA antibody being incubated in the culture medium prior to cell fixing. As shown in Fig. 5C, in both culture conditions flag-hTRPV2-HA channels were present at the plasma membrane without any noticeable difference. Similar observations were made following growth factor (IGF-1) stimulation (data not shown). To further confirm these results, we performed membrane protein biotinylation in HEK cells. To verify that the extracellular tag did not impair protein translocation, different human and mouse TRPV2 constructs were used: double flag/HA-tagged hTRPV2 with or without the [E599K] mutation (homologous position of E594 in mTRPV2), N-terminal flag-hTRPV2 and mTRPV2-flag[E594K]. The P2X2-flag construct was used as positive control of biotinylation. Effects of serum were tested after 16 h of serum deprivation and 15 min re-introduction. As shown in Fig. 5D, almost identical levels of biotinylated TRPV2 proteins were observed in serum-starved and serum-stimulated conditions. This was true for all constructs tested, indicating that neither extracellular tags nor pore mutations interfered with the trafficking of the channels to the plasma membrane. Altogether, our results show that PI3-kinase is not involved in a dynamic insertion of the TRPV2 channels in the plasma membrane of transfected cells.

4. Discussion

Among the six TRPV channels, the cellular mechanisms leading to TRPV2 gating still remain poorly characterized. Different reports have shown that heat above 52 °C, hypo-osmolarity, membrane stretch or PI3-kinase regulated membrane insertion of the channel could be implicated in the regulation of TRPV2 activity [10,12,13,22]. However, some of these observations have proved difficult to reproduce. For example, translocation of recombinant TRPV2 channels in HEK cells has been questioned [23]. Similarly, in TRPV2 transfected CHO cells, we have been unable to observe any increase in intracellular calcium concentration or channel activity following a hypo-osmotic challenge (unpublished observation) or membrane stretch (Dr. E. Honoré, personal communication), as reported [12,13]. In this study, we found that transient expression of TRPV2 channels in immortalized cell lines did result in cell death. It could be argued that the flag insertion in TRPV2 we have used here may have impaired channel trafficking. This is however unlikely for different reasons. First, we did not observe any differences in the membrane localization of untagged TRPV2 and flag-tagged channels (compare Fig. 5B and C). Second, we chose to use the flag insertion site in the first extracellular loop (between the first and the second transmembrane domains), based on immunofluorescence and biochemical data showing no differences compared with the untagged channel (see Fig. 5). Third, an extracellular HA epitope has been introduced at a similar location in the TRPV1 channel [24] without affecting its trafficking nor its biophysical properties. Fourth, functional analysis of TRPV2-flag channels shows no difference in response to 2-APB stimulation as compared to untagged channels (data not shown). Altogether, this strongly argues against an impaired trafficking of TRPV2-flag channels. Instead, several lines of evidence strongly suggest that the cytotoxicity observed in TRPV2-expressing cells is directly linked to channel activity. The most compelling argument comes from the fact that cytotoxicity and channel activity were both inhibited when a single amino acid substitution (glutamate to lysine) was introduced in the pore-forming region of the channel, despite a clear localization of mutant channels at the plasma membrane.

Activity-dependent cytotoxic effects of TRPV2 channels are also supported by a pharmacological approach. Inhibition of PI3-kinase activity by serum deprivation or chemically with LY294002 or wortmannin reduced mTRPV2-mediated cell death. Because these two pharmacological treatments are well known pro-apoptotic signals [25], it is therefore unlikely that they might induce cell survival *per se*. The most straightforward explanation is that the activity of TRPV2 channels is linked to growth factor signaling and PI3-kinase pathways, as previously proposed [10].

Our results suggest that in normal culture conditions (10% serum), serum factors promote a basal activity of TRPV2 that results in intracellular calcium overload and cell death. Indeed, chelating extracellular calcium with EGTA promotes

survival of TRPV2-expressing cells, and CHO cells stably expressing mTRPV2 show a higher resting intracellular calcium concentration that returns to normal levels upon serum starvation. Calcium overload with subsequent cell death mediated by TRP channel activation has been reported for other members of this superfamily. Sustained activation of TRPV1 by capsaicin results in apoptotic death of sensory neurons or thymocytes [26,27]. Similarly, enhanced activity of TRPM2 or TRPL channels in relation to cellular dysfunctions are associated with cell death and retinal degeneration, respectively [28,29]. It is therefore conceivable that in pathophysiological situations, constitutive activation of TRPV2 could result in calcium-mediated cell damage.

TRPV2-mediated cell death might be due to the loss of a negative regulatory mechanism, such as internalization or phosphorylation, which could turn off channel activation. Alternatively, over-expression of TRPV2 channels may overcome endogenous regulatory mechanisms, resulting in constitutive channel activity. In this case, only cells with high levels of expressed channels would be expected to show a cytotoxic phenotype; this may explain the residual viability of TRPV2-expressing cells that we observed. Such a differential regulation of recombinant TRP channels as a function of the expression levels has been demonstrated in the case of the TRPV6 channel which is not activated by active store depletion at high levels of expression [30]. Interestingly, cytotoxicity was not observed in cells expressing the calcium permeable ATP-gated P2X2 channel. In culture, extracellular ATP constitutively released from cells can reach concentrations sufficient to activate P2X receptors [31]. Even though P2X receptors are expressed at very high levels, their constitutive activation is not cytotoxic because their desensitization occurs during prolonged activation [32]. This further supports the hypothesis that in transfected cells, TRPV2-mediated cytotoxicity results from constitutive channel activity due to the absence of a regulatory component of the channel.

Early studies of the regulation of TRPV2 activity suggested that the channel has a constitutive activity and that a PI3-kinase-dependent plasma membrane insertion of the protein, and its subsequent removal is the main mechanism by which cells regulate channel activity [10]. However, this membrane translocation of recombinant TRPV2 channel has been mainly illustrated in CHO cells. In this regard, one possible cause of TRPV2-mediated cytotoxicity could be that this regulated trafficking of TRPV2 channel is impaired in our cell lines either because of an enhanced forward trafficking or because of a lack of internalization, resulting in intracellular calcium overload and cell death. This is unlikely for two main reasons. First, we have investigated in three different cell lines HEK, CHO and COS (data not shown), a possible serum or PI3-kinase-dependent trafficking of TRPV2 channels, but we were unable to visualize any change in the membrane expression of the channel. The probability is very low that each of these three different cell lines lacks the appropriate regulatory component necessary for a regulated trafficking of TRPV2 channels. In addition, TRPV2-mediated

cell death could be reduced by serum starvation or by pharmacological inhibition of PI3-kinase activity, without any change in surface expression of TRPV2 channels. One can argue that PI3-kinase-dependent translocation only occurs in a subset of cells that will subsequently die because of this enhanced surface expression of the channel. However, in stably TRPV2-transfected CHO cells, where cytotoxicity was absent presumably because of a lower expression level of the channels or reduced PI3-kinase activity, we could not detect any change in the membrane expression of the channel after serum starvation (see Fig. 5B). Secondly, membrane expression of TRPV2 was monitored using different experimental approaches such as direct luminometric quantification, membrane protein biotinylation or immunofluorescence on fixed and living cells. In all these experiments, we clearly demonstrate that PI3-kinase is not involved in the regulation of the trafficking of TRPV2 channels to the plasma membrane, whereas in identical conditions, PI3-kinase activity is directly correlated to cytotoxicity. Taken together, these results clearly show that PI3-kinase is not involved in the trafficking of TRPV2 channels, but rather regulates channel gating. TRPV2 insertion at the plasma membrane might be regulated by other mechanisms. Incidentally, it has been proposed that calcium could be involved in such a dynamic regulation of TRPV2 channels [11]; by promoting TRPV2 channel activity and therefore calcium influx PI3-kinase could thus indirectly promote channel trafficking to the plasma membrane. In addition, a TRPV2 partner called RGA, has recently been identified by an interaction trap screening. Interaction of RGA with TRPV2 promotes its surface expression, in a protein kinase A-dependent way [9]. This suggests that other intracellular pathways might regulate surface expression of TRPV2 channels. Dynamic trafficking of TRPV2 channels is therefore likely to be of physiological relevance, but further studies will be necessary to fully decipher the pathways involved.

In summary, our results demonstrate that activity of TRPV2 channels is dependent upon growth factor stimulation through a PI3-kinase pathway. However, our results do not support the hypothesis that this pathway functions by dynamic insertion of TRPV2 channel proteins into the plasma membrane. Rather, we propose that PI3-kinase promotes a constitutive TRPV2 channel activity that is normally under negative regulation, either by association with unknown partners or by distinct signaling crosstalk associated with the PI3-kinase cascade. The loss of a regulatory mechanism leading to a constitutive and cytotoxic activity of TRPV2 channel is supported by the report that in myotubes from BIO 14.6 hamsters that are deficient in δ -sarcoglycan, TRPV2 activity is increased and leads to myocyte degeneration [13]. As observed for other TRP channels [33], TRPV2 certainly belongs to signaling complexes of which certain components directly influence channel activity or trafficking. These modulations are likely to be important in immune cells where TRPV2 is highly expressed and where signaling complexes are known to be crucial for appropriate immune responses. The availability of cell lines endoge-

nously expressing TRPV2 channels and of specific TRPV2 antagonists would clearly be useful tools to investigate normal gating and regulation of this channel.

Acknowledgments

We wish to thank Isabel Lefevre, Annmarie Surprenant and Jean-Philippe Pin for a critical review of the manuscript and Dr. Séverine Chaumont for her advice during the course of this study. A.P., V.J. and V.C. were supported by a studentship from Ministère de la Recherche et de la Technologie. A.P. was also supported by Association de la Recherche contre le Cancer. This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale.

References

- [1] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 (2003) 517–529.
- [2] A.B. Parekh, R. Penner, Store depletion and calcium influx, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 901–930.
- [3] D.E. Clapham, L.W. Runnels, C. Strubing, The TRP ion channel family, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 387–396.
- [4] T. Voets, B. Nilius, The pore of TRP channels: trivial or neglected? *Cell Calcium* 33 (2003) 299–302.
- [5] N.D. Ullrich, T. Voets, J. Prenen, et al., Comparison of functional properties of the Ca(2+)-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice, *Cell Calcium* 37 (2005) 267–278.
- [6] M.J. Gunthorpe, C.D. Benham, A. Randall, J.B. Davis, The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 183–191.
- [7] B. Nilius, J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, T. Voets, TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2004) C195–C205.
- [8] S. Tamura, Y. Morikawa, E. Senba, TRPV2, a capsaicin receptor homologue, is expressed predominantly in the neurotrophin-3-dependent subpopulation of primary sensory neurons, *Neuroscience* 130 (2005) 223–228.
- [9] A.J. Stokes, C. Wakano, K.A. Del Carmen, M. Koblan-Huberson, H. Turner, Formation of a physiological complex between TRPV2 and RGA protein promotes cell surface expression of TRPV2, *J. Cell Biochem.* (2004).
- [10] M. Kanzaki, Y.Q. Zhang, H. Mashima, L. Li, H. Shibata, I. Kojima, Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 165–170.
- [11] K. Boels, G. Glassmeier, D. Herrmann, et al., The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca(2+)-permeable channel GRC, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 3599–3606.
- [12] K. Muraki, Y. Iwata, Y. Katanosaka, et al., TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes, *Circ. Res.* 93 (2003) 829–838.
- [13] Y. Iwata, Y. Katanosaka, Y. Arai, K. Komamura, K. Miyatake, M. Shigekawa, A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel, *J. Cell Biol.* 161 (2003) 957–967.
- [14] R. Stoop, S. Thomas, F. Rassendren, et al., Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C, *Mol. Pharmacol.* 56 (1999) 973–981.
- [15] S. Chaumont, L.H. Jiang, A. Penna, R.A. North, F. Rassendren, Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 29628–29638.
- [16] C. Virginio, A. MacKenzie, F.A. Rassendren, R.A. North, A. Surprenant, Pore dilation of neuronal P2X receptor channels, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 315–321.
- [17] A. MacKenzie, H.L. Wilson, E. Kiss-Toth, S.K. Dower, R.A. North, A. Surprenant, Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding, *Immunity* 15 (2001) 825–835.
- [18] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. North, G. Buell, The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7), *Science* 272 (1996) 735–738.
- [19] C. Garcia-Martinez, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J.M. Merino, A. Ferrer-Montiel, Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32552–32558.
- [20] H.Z. Hu, Q. Gu, C. Wang, et al., 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 35741–35748.
- [21] D. Ma, N. Zerangue, Y.F. Lin, et al., Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers, *Science* 291 (2001) 316–319.
- [22] M.J. Caterina, T.A. Rosen, M. Tominaga, A.J. Brake, D. Julius, A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat, *Nature* 398 (1999) 436–441.
- [23] V.J. Bezzerides, I.S. Ramsey, S. Kotecha, A. Greka, D.E. Clapham, Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 709–720.
- [24] N. Garcia-Sanz, A. Fernandez-Carvajal, C. Morenilla-Palao, et al., Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor, *J. Neurosci.* 24 (2004) 5307–5314.
- [25] M.P. Wymann, M. Zvelebil, M. Laffargue, Phosphoinositide 3-kinase signalling—which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 24 (2003) 366–376.
- [26] C. Amantini, M. Mosca, R. Lucciarini, et al., Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 1342–1356.
- [27] P.S. Chard, D. Bleakman, J.R. Savidge, R.J. Miller, Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases, *Neuroscience* 65 (1995) 1099–1108.
- [28] D. McHugh, R. Flemming, S.Z. Xu, A.L. Perraud, D.J. Beech, Critical intracellular Ca²⁺ dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11002–11006.
- [29] B. Minke, The TRP calcium channel and retinal degeneration, *Adv. Exp. Med. Biol.* 514 (2002) 601–622.
- [30] L. Yue, J.B. Peng, M.A. Hediger, D.E. Clapham, CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel, *Nature* 410 (2001) 705–709.
- [31] G. Buell, A.D. Michel, C. Lewis, G. Collo, P.P. Humphrey, A. Surprenant, P2X1 receptor activation in HL60 cells, *Blood* 87 (1996) 2659–2664.
- [32] J. Rettinger, G. Schmalzing, Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X1 receptor, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6426–6433.
- [33] C. Montell, Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels, *Sci. STKE* 2001 (2001) RE1.

ARTICLE 4

LPC ET LPI SONT INDUISENT L'ACTIVATION ET LA TRANSLOCATIOPN DES DIFFERENTES FORMES DU CANAL TRPV2.

Dans cet article, nous avons étudié l'activation et la régulation des différentes formes du canal TRPV2 (humaine, souris) des activateurs physiologiques : les lysophospholipides. Le but était de trouver un agoniste physiologique jusqu'alors inconnu du canal TRPV2 capable d'activer aussi bien la forme humaine du canal que la forme murine.

Dans un premier temps, nous montrons que le canal mTRPV2 surexprimé dans les CHO peut être activé par le LPC (lysophosphatidylcholine) et par le LPI (lysophosphatidylinositol). Cette activation se traduit par une entrée élevée de calcium depuis le milieu extracellulaire via le canal mTRPV2. Nous montrons également que le canal hTRPV2 surexprimé dans les HEK293 peut aussi être activé par le LPC (lysophosphatidylcholine) et par le LPI (lysophosphatidylinositol). Cette activation se traduit encore une fois par une entrée élevée de calcium depuis le milieu extracellulaire via le canal hTRPV2.

Dans les deux cas, nous montrons en utilisant des inhibiteurs de diverses voies intracellulaires que cette activation du canal TRPV2 par les lysophospholipides s'effectue via la voie des protéines G et via la voie PI3-kinase. De plus, en mesurant l'expression de TRPV2 au niveau de la membrane plasmique par la technique de biotinylation dans le cas du canal humain comme dans le cas du canal murin, nous montrons que les lysophospholipides permettent d'induire la translocation du canal TRPV2 vers la membrane plasmique.

Enfin, nous montrons que les lysophospholipides permettent d'activer le canal TRPV2 exprimé de manière endogène dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes PC3.

En conclusion, les lysophospholipides sont des agonistes physiologiques du canal TRPV2 en induisant d'une part la translocation et d'autre part l'activation des canaux humains et de souris. Sachant que jusqu'à présent, aucun agoniste physiologique de TRPV2 n'était capable d'activer les formes humaine et murine du canal, ce nouveau mode d'action participe sans doute à la régulation de l'activation du canal TRPV2 dans les différents organismes l'exprimant.

LYSOPHOSPHOLIPIDS SENSING BY TRPV2 CALCIUM CHANNEL

Michaël Monet^{1,2}, Dimitra Gkika^{1,2}, Albin Pourtier³, V'yacheslav Lehen'kyi^{1,2}, Gabriel Bidaux^{1,2}, Véronique Juvin⁴, François Rassendren⁴, Sandrine Humez^{1,2,5}, Natalia Prevarsakaya^{1,2}.

¹INSERM U800, Equipe labellisée par la Ligue nationale Contre le Cancer, Villeneuve d'Ascq, France. ²Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France. ³UMR 8161 Institut de Biologie de Lille CNRS/Université Université Lille 1 et 2/Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, Lille, France. ⁴Département de Pharmacologie, Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, Université Montpellier I, Université Montpellier II, 141 rue de la Cardonille, Montpellier, France. ⁵Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, Lens, France.

Abstract

Transient Receptor Potential Vanilloid member 2 (TRPV2) remains one of the most intriguing members of the TRPV channel family since the mechanisms of activation and the identity of the endogenous channel regulators are still a matter of debate. It has been demonstrated that TRPV2, except in human, is activated by high temperatures (>52 °C) and 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). Here we show that human and mouse TRPV2 are strongly stimulated by the lysophospholipids, lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidylinositol (LPI). Activation showed dependence on side-chain length and the chemical head-group. TRPV2 activation by LPC and LPI is dependent on G-protein and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) signalling and is related to the translocation of TRPV2 towards the plasma

membrane. In conclusion, our data revealed a previously unknown lysophospholipid-sensing ability of TRPV2 channel and identified for the first time a common physiological stimulus for the murine and human TRPV2 homologs.

Introduction

Extracellular calcium (Ca^{2+}) influx initiates essential intracellular signalling and constitutes a common mechanism to various of signal transduction pathways regulating a wide range of cell phenomena like proliferation, apoptosis or migration (Berridge et al., 2003). In non-excitabile cells Ca^{2+} influx is mainly mediated by the transient receptor potential (TRP) channels. The molecular identity of most TRP channels has been established in human as well as in different model organisms including *C. elegans*, *Drosophila* and mouse. TRP channels constitute a superfamily of proteins encoded by more than 20 different gene products. These proteins can be classified into seven related subfamilies: TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPN, TRPA and TRPML (Alexander et al., 2007; Ferrer-Montiel et al., 2004; Venkatachalam and Montell, 2007). It is clear that subsets of TRP channels are involved in sensory transduction (Clapham, 2003). More specifically heat or cold activate TRPV1-4, TRPM8 or TRPA1 proteins (Tominaga and Caterina, 2004). In addition to temperature, several endogenous substances and pharmacologically active molecules stimulate TRP channels. Recently, it has been showed that TRPC5 and TRPM8, could be activated by lysophospholipids (Flemming et al., 2006; Vanden Abeele et al., 2006). Moreover, TRPV1, 3 and 4 are gated by bioactive lipids such as PIP_2 and fatty acid derivatives (Benham et al., 2002). Although other TRPV members such as, TRPV1, 3 and 4, act unambiguously as cellular thermosensors and are regulated by lipids, however the gating and the thermosensing of TRPV2 (initially named VRL-1) are still a matter of debate. TRPV2 is expressed in sensory neurons and, it was initially described that this channel was detected in the digestive tractus and prostate (Bang et al., 2007; Kowase et al., 2002). Temperature threshold for TRPV2 activation ($> 53^\circ\text{C}$) (Caterina et al., 1999) is well above physiological range,

and this channel has not been demonstrated to be sensitive to lipids. Moreover, in non-neuronal cells, other mechanisms have been reported to activate TRPV2, such as dynamic insertion in the plasma membrane induced by growth factors (Kanzaki et al., 1999), regulation by a phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) dependent pathway (Penna et al., 2006) or mechano- and osmotic stimuli (Iwata et al., 2003; Muraki et al., 2003). Recently, it has been proposed that 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borane) (Hu et al., 2004) and noxious heat ($>52^{\circ}\text{C}$) can only activate rat and mouse TRPV2 (r, mTRPV2), whereas neither of these stimuli activate the human homolog of TRPV2 (hTRPV2) (Juvin et al., 2007; Neeper et al., 2007). At present, there is no physiological stimulus common for the different TRPV2 homologs. In an effort to further understand TRPV2 function and its activation, we screened various lysophospholipids for their effect on the channel's activity.

In this study we tested various lysophospholipids and we demonstrate that only lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidylinositol (LPI) stimulated mTRPV2, as well as hTRPV2. More precisely, LPC and LPI generated a Ca^{2+} entry by inducing the translocation of TRPV2 protein to the plasma membrane. Moreover, we showed that activation and translocation of TRPV2 by lysophospholipids are carried out by the G protein and the PI3K pathways.

Experimental procedures

Chemicals and Lipid Preparation

LPCs, palmitoleic acid, and LPI (L- α -lysophosphatidylinositol were dissolved into methanol). The final bath solvent concentration was $\leq 0.1\%$ and was present in the control period prior to application of the lipid molecule. No effects of solvents were evident (e.g. see Fig. 1I and Fig 2G). L- α -caproyl lysophosphatidylcholine (LPC C6:0), L- α -lauroyl lysophosphatidylcholine (LPC C12:0), 3-*sn*-1-myristoyl-lysophosphatidylcholine (LPC C14:0), L- α -palmitoyl lysophosphatidylcholine (LPC C16:0), 3-*sn*-1-oleoyl-lysophosphatidylcholine (LPC C18:0), LPI (soybean), palmitoleic acid, choline (2-hydroxyethyl)trimethylammonium hydroxide), arachidonic acid, pertussis toxin (PTX), wortmannin, LY294002 and fatty acid- free bovine serum albumin were purchased at Sigma or Avanti Lipids.

Cell Culture.

Human Embryonic Kidney cells (HEK293) and PC3 (Prostate Carcinoma) were cultured as described previously (Bidaux et al., 2007; Thebault et al., 2005a). Chinese Hamster Ovary cells (CHO-K1) and stable CHO cell lines expressing mouse TRPV2 (clone IIE11) and were cultured as described previously (Juvin et al., 2007).

Generation of shTRPV2 vectors.

Hybridized oligonucleotides were cloned in p*Silencer* 4.1-CMV puro (Ambion, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions and were defined as shTRPV2-1 (sense 5'-GGTAAGACGTGCCTGATGA-3') and shTRPV2-2 (sense 5' TAAGAGTCAACCTCAACTA-3'). Silencing efficiency was checked by western-blot and PCR.

Nucleofection

Transfection of HEK293 or PC3 cells with hTRPV2-GFP or with shTRPV2-1 and -2 was carried out using Nucleofector as recommended by the manufacturer (Amaxa GmbH, Köln, Germany). 3µg of vector were transfected in 2 million of trypsinized cells which were then seeded into a T75 flask and in glass slips for 72h. For HEK293, cells are always co-nucleofected with plasmid encoding two shRNA TRPV2 (HEKhTRPV2-shV2 I or II) used for abolish hTRPV2 channel expression or with pSilencer used like negative control (HEKhTRPV2).

Reverse Transcription-PCR.

Total RNAs were isolated from PC3 cells followed by PCR as previously described (Thebault et al., 2005a). Primers used are listed in Table 1 (supplementary data).

Immunodetection.

HEK293 and CHO cells were fixed with 4% formaldehyde-1X PBS (Phosphate Buffer Saline) for 15 min, washed three times, then permeabilized in PBS-gelatin 1.2%) complemented with 0.01% Tween 20 and 100mM glycine for 30 minutes at 37°C. 2). Subsequently cells were incubated with primary antibodies: (1/250) rabbit polyclonal anti-hTRPV2 antibody for HEK293 and (1/250) rabbit polyclonal anti-mTRPV2 antibody for CHO cells, (1/25) in PBS-gelatin at 37°C for 1.5 hours. After thorough washes, the slides were treated with the corresponding anti-rabbit or anti-mouse IgG, coupled with either Alexa fluor 488-labeled (Molecular probes, dilution: 1/2,000) diluted in PBS-gelatin for 1 hour at room temperature. After two washes, the slides were mounted with Mowiol®. Fluorescence analysis was carried out using a Zeiss LSM 510 confocal microscope and analysis software (AIM 3.2, Zeiss), as previously

described (Thebault et al., 2005a).

Ca²⁺ measurements using Fura-2 AM.

Prior to fluorescence measurements the cells were trypsinized and transferred to glass slips. Cells were used 3 days after trypsinization. The medium was replaced every 48 h. The culture medium was replaced by an HBSS solution containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of this solution were adjusted to 310 mOsm.l⁻¹ and 7.4, respectively. When a Ca²⁺ free medium was required, CaCl₂ was omitted and replaced by equimolar MgCl₂. Dye loading was achieved by transferring the cells into a standard HBSS solution containing 1 mM Fura-2 AM (Calbiochem, Meudon, France) as described previously (Humez et al., 2006).

Immunoblot

Following treatments, cells were rinsed with a NaCl solution (150 mM) and lysed in an ice-cold homogenizing buffer (pH 7.2) containing 20 mM PO₄Na₂K, 1% Triton X100, 1% sodium desoxycholate, 5mM EDTA and a protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma) for 30 min at 4°C. Homogenates were cleared by a centrifugation at 16000 g for 10 min and the protein content in the supernatants was determined using the BCA method (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL). 4 µg of total proteins was analyzed on a 10 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After transfer into a PVDF membrane using a semi-dry electroblotter, the membrane was cut into thin strips that were further processed for immunodetection. The strips were blocked in 5% non-fat dry milk in TBST (15 mM Tris buffer (pH8), 140 mM NaCl, 0.05% Tween

20), washed three times, then incubated with polyclonal antibody anti-mTRPV2 (rabbit, 1/250), or with polyclonal anti-hTRPV2 (rabbit, 1/250) as previously described (Juvin et al., 2007), or with polyclonal anti-GFP (rabbit, 1/500 catalog no. AB3080P; Chemicon). After washing, blots were incubated for 1h with the corresponding horseradish peroxidase-linked secondary antibody and processed for chemoluminescent substrate (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). Membranes were re-blotted twice with monoclonal antibody anti-actin (mouse, 1/500 catalog no. MS-1295-P; Neomarkers), or with monoclonal antibody anti-calnexin (mouse, 1/2000 catalog no. MAB 3126; Chemicon).

Biotinylation assay.

TRPV2 cell surface expression was analyzed in HEK293 cells transiently transfected (72h) with hTRPV2-GFP and in the stable cell line CHO mTRPV2. After treatment with LPC or LPI (data not shown) for 15min, cells were washed twice with ice-cold PBS containing 1 mM MgCl₂ and 0.5 mM CaCl₂ (PBS-CM) and subjected to cell surface biotinylation as described previously (Gkika et al., 2006). Biotinylated proteins were precipitated using neutravidin-agarose beads (Pierce, Rockford, IL, USA) and eluted with SDS-PAGE loading buffer. TRPV2 expression analysis was analyzed by immunoblot with antibody anti-mTRPV2 or anti-hTRPV2 as described in Immunoblot

Data analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Plots were produced using origin 5.0 (Microcal Software, Inc). Each experiment was repeated at least three times. Turkey-

Kramer test was used for statistical comparison among means and differences and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

TRPV2 Ca²⁺ Signals show Sensitivity to Phospholipid

We previously reported that transient transfection of TRPV2 cDNA result in high levels of protein expression leading to cellular toxicity (Penna et al., 2006). To avoid this problem, we used a stable CHO cell line expressing mTRPV2 channel (Juvin et al., 2007; Penna et al., 2006; Vanden Abeele et al., 2006). mTRPV2 protein expression was detected by immunoblot (Fig 1A) in CHOmTRPV2 cells but not in control CHO cells (Fig 1 A). Moreover, mTRPV2 localises to the plasma membrane as observed in immunofluorescence experiment (Fig 1B, C and D).

The channel's activity was measured by the microscopy-based single-cell imaging technique using the ratiometric Ca²⁺ indicator dye fura-2. mTRPV2 was constitutively activated in CHOmTRPV2 cells (Fig 1E) showing an increased rate of [Ca²⁺]_{cyt} (155nM± 5nM) compared to control CHO cells (115nM± 6nM). To activate mTRPV2 channel we raised the solution temperature or we used 2-APB (Hu et al., 2004; Juvin et al., 2007; Neeper et al., 2007). We show that high temperatures induce [Ca²⁺]_{cyt} raise in CHOmTRPV2 (Fig 1E). Moreover, we demonstrate that 300µM 2-APB is able to induce [Ca²⁺]_{cyt} increase in CHOmTRPV2 cells while the respective raise in CHO control cells remains very weak (Fig 1F).

Subsequently, we studied the effect of lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidylinositol (LPI) on CHOmTRPV2 cells. Application of 10µM of LPC with 18 carbons unsaturated (C18:0) and 10µM of LPI induce Ca²⁺ signalling with sustained [Ca²⁺]_{cyt} increase after few minutes in CHO mTRPV2 cells (Fig 1G and H). Indeed, LPC C18:0 and LPI application in CHOmTRPV2 cells induce a [Ca²⁺]_{cyt} increase of 810nM ±35nM and 646nM ±31nM respectively (Fig 1I, n=90). LPC C18:0 and LPI solvent (MeOH) has no effect on the cells (Fig 1I, n=90).

Thus, here we show that beside 2-APB and high temperature, LPC C18:0 and LPI activate the mTRPV2 channel. In order to clarify whether hTRPV2 is as well activated by LPC and LPI, we used HEK293 cells transiently expressing hTRPV2 channel. HEK293 cells are nucleofected with hTRPV2-GFP. Expression of hTRPV2-GFP channel is detected 72h after nucleofection by GFP fluorescence on HEKhTRPV2 cells (Fig 2Aa). This fluorescence is diminished at 20% when cells are co-nucleofected with shRNATRVPV2 I (Fig 2Ab) and abolished at 100% with shRNA TRPV2 II (Fig 2Ac). TRPV2 silencing was confirmed by immunoblot with anti -GFP antibody (Fig 2Ad) 72h after nucleofection. Immunohistochemical analysis of HEK293 nucleofected as described in Experimental procedures confirmed that hTRPV2 co-localised with GFP protein (Fig 2Ba). GFP protein (Fig 2Bb) was expressed in hTRPV2-positive cells, with intense intracellular labelling strictly coinciding with expression of this channel (Fig 2Bc).

In Ca^{2+} imaging experiments the basal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ levels are identical in HEKhTRPV2 ($86\text{nM} \pm 2\text{nM}$) and in HEKhTRPV2-shV2 II ($85\text{nM} \pm 3\text{nM}$) cells (Fig 2C) suggesting that in contrast to mTRPV2, the human homolog does not appear to be constitutively active. Ca^{2+} increase induced by high temperature and 2-APB is comparable in HEKhTRPV2 cells and in HEKhTRPV2-shV2 II cells. Indeed, we show that high temperatures induce cytoplasmic Ca^{2+} increase reaching a maximal amplitude of $206\text{nM} \pm 3\text{nM}$ in HEKhTRPV2 cells and $175\text{nM} \pm 4\text{nM}$ in HEKhTRPV2-shV2 II cells respectively (Fig 2C). Application of $500\mu\text{M}$ 2-APB generates a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase reaching $341\text{nM} \pm 20\text{nM}$ in HEKhTRPV2 as well as in HEKhTRPV2-shV2 II with an amplitude $268\text{nM} \pm 6\text{nM}$. Therefore, raise of cytoplasmic Ca^{2+} observed in HEKhTRPV2 cells is not due to the hTRPV2 channel. This result leads us to conclude that hTRPV2 is not activated by the high temperatures or by 2-APB.

Contrary to high temperatures and 2APB, we demonstrate that LPC C18:0 and LPI are agonists of hTRPV2 channel. Thus, we show that in HEKhTRPV2 cells LPC C18:0 10 μ M (Fig 2e, n=60 by condition) and LPI 10 μ M (Fig 2f, n=60 by condition) induce a raise of cytoplasmic Ca²⁺ whereas this was not the case in HEKhTRPV2-shV2 II. The increase is 706nM \pm 79nM for LPC C18:0 10 μ M and 660nM \pm 53nM for LPI 10 μ M (Fig 2g, n=60 by condition), while MeoH has no effect (Fig 2g, n=60).

Lysophospholipid chain length and composition define TRPV2 stimulation.

LPC C18:0 and LPI have different head-groups, choline and inositol, and induce high [Ca²⁺]_{cyt} responses. Lysophospholipids consist of a polar head-group and an unsaturated chain of fatty acid. We therefore checked whether the head-group and the unsaturated chains show distinct effects on the TRPV2 activity. We used palmitoleic acid which is the same as palmitic acid except for one unsaturated bond because LPC C18:0 missing the head-group of choline corresponds to poor solubility palmitic acid. We demonstrate that palmitoleic acid had no effect neither on mTRPV2 channel (Fig 3A, n=90) and neither on hTRPV2 channel (Fig 3B, n=90). We also show that choline, the head-group of LPC C18:0 has no effect on CHOmTRPV2 cells (Fig. 3A, n=90) or on HEKhTRPV2 cells (Fig 3B, n=90). In order to prove the specificity of LPC and LPI, we examined additional lysophospholipids like sphingosine and lysophosphatic acid (LPA), which have no significant effect on CHOmTRPV2 cells (Fig 3A, respectively 9nM \pm 2nM for LPA, 59nM \pm 9nM for sphingosine and 662nM \pm 37nM for LPC C18:0, n=90 by condition) and on HEKhTRPV2 cells (Fig 3B) (respectively 36nM \pm 10nM for sphingosine, 3nM \pm 1nM for LPA and 631nM \pm 79nM for LPC C18:0, n=90 by condition) (Fig 3B).

Thus to stimulate the TRPV2 channel, lysophospholipid should exhibit a precise combination of head-group and side chain. Consistent with the data presented in Fig. 2A and B, LPC we demonstrate that chain lengths greater than 12 carbons are needed to stimulate mTRPV2 (respectively 6nM \pm 4nM for LPC C6:0; 7nM \pm 2nM for LPC C12:0; 73nM \pm 8nM for LPC C14:0; 573nM \pm 43nM for LPC C16:0; and 744 \pm 32nM in CHOmTRPV2; Fig 3C) as well as hTRPV2 (respectively 1nM \pm 6nM for LPC C6:0; 3nM \pm 1nM for LPC C12:0; 61nM \pm 13nM for LPC C14:0; 454nM \pm 59nM for LPC C16:0; and 627 \pm 38nM in HEKhTRPV2; Fig 3D).

LPC induces Ca²⁺ influx by TRPV2 via the G protein and the PI3K pathways

In order to discriminate the origin of Ca²⁺ increase induced by lysophospholipids, we tested LPC C18:0 (Fig 4A-C) and LPI (data not shown) on CHOmTRPV2 (Fig 4A, C) and HEKhTRPV2 (Fig 4B, C) without Ca²⁺ in extracellular medium (0Ca²⁺). LPC C18:0 does not induce significant depletion of endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ stores in CHOmTRPV2 (61nM \pm 27nM, n=90) and HEKhTRPV2 (10nM \pm 3nM, n=90) cells. Application of 2mM Ca²⁺ (2Ca²⁺) in the extracellular medium, results in a massive Ca²⁺ entry with an amplitude of 683nM \pm 58nM (Fig 4c, n=90) in CHOmTRPV2 and of 530nM \pm 30nM (Fig 4c, n=90) in HEKhTRPV2 cells. Thus lysophospholipids activate both mTRPV2 and hTRPV2 channels present in the plasma membrane (Fig 1B, C and 2Aa) inducing a Ca²⁺ entry in the cells.

It is known that LPC C18:0 can act on various intracellular signalling pathways (Wang, 2004). In order to understand the activation mechanism of LPC C18:0, we used intracellular signalling inhibitors on CHOmTRV2 and HEKhTRPV2 cells. First, we used the PLC inhibitor, U73122 at 10 μ M which shows no effect on LPC C18:0 response (Fig 4D). We demonstrate that pre-treatment with PI3K inhibitor:

wortmannin 50 μ M (Fig 4D) during 15mn has a weak effect on Ca²⁺ entry induced by LPC C18:0 10 μ M (521nM \pm 31nM) on CHOmTRPV2 cells. However, pre-treatment with another PI3K inhibitor: LY294002 50 μ M during 15mn partially inhibited the LPC C18:0 effect (Fig 4D) (141nM \pm 26nM) on CHOmTRPV2 cells. Finally, in order to check whether LPC C18:0 effect is mediated by G protein, we have used pertussis toxin (PTX), an inhibitor of G protein. Here, we show that pre-treatment with PTX 250ng/ml during 12h inhibits completely the Ca²⁺ entry induced by LPC C18:0 (Fig 4D) on CHOmTRPV2 (7nM \pm 3nM). Pre-treatment HEKhTRPV2 cells with LY294002 50 μ M during 15mn or with PTX 250ng/ml during 12h also blocks the Ca²⁺ entry induced by LPC C18:0 (Fig 4E, respectively with amplitude 117nM \pm 5nM and 3nM \pm 1nM). Therefore, activation of TRPV2 channel by LPC C18:0 is mediated by G proteins and the PI3K pathway.

LPC induces TRPV2 translocation to the plasma membrane

In order to check whether of TRPV2 activity is due to increased plasma membrane channel expression we performed cell surface biotinylation (Fig 5A). When cells were stimulated with LPC C18:0, the amount of mTRPV2 expressed in the biotinylated fraction markedly increased (Fig 5A). As PTX and LY294002 inhibited the Ca²⁺ entry induced by LPC C18:0, we study their effect on mTRPV2 translocation. We show that pre-treatment with PTX 250ng/ml or with LY294002 50 μ M abolished LPC C18:0 effect on TRPV2 plasma membrane translocation (Fig 5A). We also observe enhanced cell surface expression of hTRPV2 upon LPC application in HEKhTRPV2 (Fig 5B). We can also see that raise of LPC C18:0 concentration is not necessary because the maximum effect was reached for 10 μ M (Fig 5B)

LPC stimulates endogenous TRPV2

Previously, it has been shown that lysophospholipids have effects on prostate cancer cells (Hao et al., 2007; Picascia et al., 2002; Raj et al., 2004). Semi-quantitative RT-PCR and immunoblot analysis of the human prostate cancer cell PC3 line PC3 revealed a robust TRPV2 expression (Fig 6A, B). TRPV2 silencing with shRNA TRPV2 I and II (PC3 shV2 I and II) abolished the channel's expression both on mRNA (Fig 6A), and protein level (Fig 6B) compared to PC3 nucleofected with the empty pSilencer vector (PC3 Psil).

By using Ca^{2+} imaging, we demonstrate on PC3 Psil cells that 10 μM LPC induces a Ca^{2+} entry (Fig 6C). However, PC3 cells expressed other TRP channels like TRPV1 known to be sensitive to lysophospholipids (Andersson et al., 2007; Vanden Abeele et al., 2006; Ye et al., 2007). In order to ensure that LPC C18:0 and LPI effects were specific for TRPV2 channel, we applied 10 μM capsazepin, an inhibitor of TRPV1. In presence of capsazepin, LPC C18:0 and LPI still induce an increase in the Ca^{2+} influx which is abolished with the TRPV2 silencing. Indeed, in PC3 shV2 I and II cells LPC C18:0 (Fig 6C) and LPI (data not shown) effects are abolished. This proves that LPC C18:0 and LPI act on the endogenous TRPV2 channel, expressed in PC3 cell, generating Ca^{2+} entry.

Discussion

Among TRPV channels, TRPV2 still remains poorly understood due to the lack of specific pharmacological and molecular tools. In this study we tested various lysophospholipids and we demonstrate that only lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidylinositol (LPI) stimulated mTRPV2, as well as hTRPV2. More precisely, LPC and LPI generated a Ca^{2+} entry by inducing the translocation of TRPV2 protein to the plasma membrane. Furthermore, we showed that activation and translocation of TRPV2 by lysophospholipids are carried out by G proteins and PI3K pathways.

In this study, our results demonstrate that overexpression of mTRPV2 channel generated an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in CHOmTRPV2 cells in agreement with other studies (Penna et al., 2006). However, this effect is not present in cells overexpressing hTRPV2 channel. In addition, 2-APB and high temperatures stimulate only mTRPV2. The difference observed for basal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ between mTRPV2 and hTRPV2 might result from a difference either in regulation between the murine and human form or in channel expression levels between the stable clone CHOmTRPV2 and the transiently transfected HEK cells. The divergence between the two TRPV2 homologs was also previously observed during the channel's activation by 2-APB and high temperatures (Juvin et al., 2007). Neeper et al. suggest that both the NH₂- and COOH-terminal regions appear to be important for channel activation by 2-APB and high temperature and that chimera between both NH₂-terminal regions with hTRPV2 allowed activation of this channel by the 2-APB and high temperatures (Neeper et al., 2007).

In our study, we identify two common agonists, LPC C18:0 and LPI, for both murine and human TRPV2 homologs. LPC and LPI are widely found in biological systems

and are considered to have a wide range of physiological and pathological effects (Ishii et al., 2004; Okita et al., 1997; Takeshita et al., 2000; Thukkani et al., 2003; Yan et al., 2004). We shown that lysophospholipids application induces a fast $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase. Comparable effects were described for other TRPs such as TRPC5 channel (Flemming et al., 2006) or TRPM8 channel (Vanden Abeele et al., 2006). Importantly, our results also show that TRPV2 activation depends on the length of the unsaturated chain of fatty acid. Moreover, we demonstrate fro the first time that, lysophospholipids need a combination of the head-group and the side chain to stimulate the TRPV2 channel. Our functional and localisation data show that LPC C18:0 and LPI induce Ca^{2+} influx by TRPV2 channel expressed on the plasma membrane rather than a depletion of Ca^{2+} stores.

Up to date, there are two main hypothesis explaining lysophospholipids actions: (i) indirectly via a receptor for the LPA or the sphingosine (Anliker and Chun, 2004). (ii) directly as for the LPC on TRPC5 channel (Flemming et al., 2006; So et al., 2005). Indeed, the many biological responses documented for lysophospholipids can be mechanistically attributed to signalling through specific G protein-coupled receptors. However, TRPC5 was considered as a direct sensor of lysophospholipids, a lipid ionotropic receptor. The use of pharmacological tools implies an indirect action of LPC/PLI on TRPV2 activity. This means that lysophospholipids stimulatory effect on TRPV2 should be distinguished from the one of 2-APB and high temperature (on the both NH₂- and COOH- terminal regions), since it would require an intermediary effector.

Our data also demonstrate that lysophospholipids act on TRPV2 channel by the PI3K pathway. LY294002, inhibitor of PI3K, has a better effect on TRPV2 channel than wortmannin in down-regulation of the LPC C18:0 response. In addition we show that

LPC C18:0 and LPI induce translocation of the channel to the plasma membrane via the G protein and the PI3 kinase pathways. It is known that lysophospholipids could activate PI3K (Anliker and Chun, 2004) which was also involved in TRPV2 activation (Penna et al., 2006). Moreover, it has been shown that chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation via PI3K pathway of the TRPV2 channel in macrophages (Nagasawa et al., 2007). Studies of TRPV2 translocation towards the plasma membrane seem to be an issue of controversy (Stokes et al., 2005). More precisely, it has been described that PI3K promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane (Penna et al., 2006). However, in this last study TRPV2 insertion at the plasma membrane might be regulated by other mechanisms. Incidentally, it has been proposed that Ca^{2+} would be involved in such a dynamic regulation of TRPV2 (Boels et al., 2001) by promoting the channel's activity and therefore Ca^{2+} influx PI3K might indirectly promote channel trafficking to the plasma membrane. In addition, a TRPV2 partner called recombinase gene activator protein (RGA) has recently been identified by an interaction trap screening. Binding of RGA to TRPV2 promotes its surface expression, in a protein kinase A-dependent way (Stokes et al., 2005). This suggests that other intracellular pathways are involved in the TRPV2 plasma membrane expression.

Finally, we demonstrate for the first time that LPC C18:0 and LPI generate Ca^{2+} influx on human prostate cancer cell line PC3 which express endogenously TRPV2. Lysophospholipids are involved in various biological processes, e.g., brain development and angiogenesis (Contos et al., 2000), but the following evidences suggest that these lipids are also significant actors of tumour development since they stimulate growth, survival and migration of malignant cells from various origins like ovary, prostate (Daaka, 2002; Xu et al., 1995). Recently, TRPM8 channel cloned

from human prostate and known to be involved in prostate tumour development was regulated by lysophospholipids, acting as its endogenous ligands (Vanden Abeele et al., 2006). Moreover, lysophospholipids and more particularly LPA are known to act on PC3 cells by modulating their proliferation, their differentiation or their migration (Hao et al., 2007; Picascia et al., 2002; Raj et al., 2004).

TRPV2 is a physiological sensor of heat and hot temperatures (Caterina et al., 1999). However, temperature alone is unlikely to account for activation of TRPV2 in all tissues because this channel is expressed in sensory nerves (Frederick et al., 2007). TRPV2 is also expressed in non-neuronal cells like in prostate (Kowase et al., 2002) or in human blood cells, suggesting that, in addition to its role as a noxious heat sensor (Caterina et al., 1999), this channel certainly encompasses other cellular functions (Saunders et al., 2007).

Neurons and non neuronal cells hardly ever experience high temperatures which generally are considered to stimulate TRPV2 (>53°C). Endogenous modulators, such as lysophospholipids, would bring down the temperature threshold so that TRPV2 can operate at physiological body temperatures. These lipid modulators could therefore have two roles: setting the temperature sensitivity of hot receptors in the skin and other tissues that are exposed to the external environment and regulating the activity of TRPV2-expressing neurons that innervate deeper tissues and organs. Thus, TRPV2 remains a channel with enigmatic functions, highly expressed in many tissues like prostate. In this study we provide new insights on the pharmacology of TRPV2 which can be helpful in the understanding channel's function.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministère de l'Éducation Nationale, ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Ligue Nationale Contre le Cancer and European Molecular Biology Organization long-term fellowship ALTF-161-2006. The authors would like to thank Morad Roudbaraki for primers design, Loic Lemmonier, Fabien Vanden Abeele for helpful advice and assistance and Etienne Dewailly for his technical assistance. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Bibliography

1. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7), 517-529
2. Ferrer-Montiel, A., Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., and Planells-Cases, R. (2004) *Eur J Biochem* 271(10), 1820-1826
3. Alexander, S. P., Mathie, A., and Peters, J. A. (2007) *Br J Pharmacol* 150 Suppl 1, S1
4. Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007) *Annu Rev Biochem* 76, 387-417
5. Clapham, D. E. (2003) *Nature* 426(6966), 517-524
6. Tominaga, M., and Caterina, M. J. (2004) *J Neurobiol* 61(1), 3-12
7. 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. (2006) *J Biol Chem* 281(8), 4977-4982
8. Vanden Abeele, F., Zholos, A., Bidaux, G., Shuba, Y., Thebault, S., Beck, B., Flourakis, M., Panchin, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006) *J Biol Chem* 281(52), 40174-40182
9. Benham, C. D., Davis, J. B., and Randall, A. D. (2002) *Neuropharmacology* 42(7), 873-888
10. Kowase, T., Nakazato, Y., Yoko, O. H., Morikawa, A., and Kojima, I. (2002) *Endocr J* 49(3), 349-355
11. Bang, S., Kim, K. Y., Yoo, S., Lee, S. H., and Hwang, S. W. (2007) *Neurosci Lett* 425(2), 120-125
12. Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., and Julius, D. (1999) *Nature* 398(6726), 436-441
13. Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., and Kojima, I. (1999) *Nat Cell Biol* 1(3), 165-170
14. Penna, A., Juvin, V., Chemin, J., Compan, V., Monet, M., and Rassendren, F. A. (2006) *Cell Calcium* 39(6), 495-507
15. Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., and Shigekawa, M. (2003) *J Cell Biol* 161(5), 957-967
16. Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M., and Imaizumi, Y. (2003) *Circ Res* 93(9), 829-838
17. Hu, H. Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C. K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L. Y., Wood, J. D., and Zhu, M. X. (2004) *J Biol Chem* 279(34), 35741-35748
18. Neeper, M. P., Liu, Y., Hutchinson, T. L., Wang, Y., Flores, C. M., and Qin, N. (2007) *J Biol Chem* 282(21), 15894-15902
19. Juvin, V., Penna, A., Chemin, J., Lin, Y. L., and Rassendren, F. A. (2007) *Mol Pharmacol*
20. 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(47), 39423-39435
21. Bidaux, G., Flourakis, M., Thebault, S., Zholos, A., Beck, B., Gkika, D., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007) *J Clin Invest* 117(6), 1647-1657
22. Humez, S., Monet, M., Legrand, G., Lepage, G., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2006) *Endocr Relat Cancer* 13(1), 181-195
23. Gkika, D., Topala, C. N., Chang, Q., Picard, N., Thebault, S., Houillier, P., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. (2006) *Embo J* 25(20), 4707-4716

24. Wang, X. (2004) *Curr Opin Plant Biol* 7(3), 329-336
25. Hao, F., Tan, M., Xu, X., Han, J., Miller, D. D., Tigy, G., and Cui, M. Z. (2007) *Biochim Biophys Acta* 1771(7), 883-892
26. Raj, G. V., Sekula, J. A., Guo, R., Madden, J. F., and Daaka, Y. (2004) *Prostate* 61(2), 105-113
27. Picascia, A., Stanzione, R., Chieffi, P., Kisslinger, A., Dikic, I., and Tramontano, D. (2002) *Mol Cell Endocrinol* 186(1), 81-87
28. Ye, F., Deng, P. Y., Li, D., Luo, D., Li, N. S., Deng, S., Deng, H. W., and Li, Y. J. (2007) *Vascul Pharmacol* 46(4), 238-246
29. Andersson, D. A., Nash, M., and Bevan, S. (2007) *J Neurosci* 27(12), 3347-3355
30. Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., and Chun, J. (2004) *Annu Rev Biochem* 73, 321-354
31. Okita, M., Gaudette, D. C., Mills, G. B., and Holub, B. J. (1997) *Int J Cancer* 71(1), 31-34
32. Yan, J. J., Jung, J. S., Lee, J. E., Lee, J., Huh, S. O., Kim, H. S., Jung, K. C., Cho, J. Y., Nam, J. S., Suh, H. W., Kim, Y. H., and Song, D. K. (2004) *Nat Med* 10(2), 161-167
33. Takeshita, S., Inoue, N., Gao, D., Rikitake, Y., Kawashima, S., Tawa, R., Sakurai, H., and Yokoyama, M. (2000) *J Atheroscler Thromb* 7(4), 238-246
34. Thukkani, A. K., McHowat, J., Hsu, F. F., Brennan, M. L., Hazen, S. L., and Ford, D. A. (2003) *Circulation* 108(25), 3128-3133
35. Anliker, B., and Chun, J. (2004) *J Biol Chem* 279(20), 20555-20558
36. So, I., Chae, M. R., Kim, S. J., and Lee, S. W. (2005) *Int J Impot Res* 17(6), 475-483
37. Nagasawa, M., Nakagawa, Y., Tanaka, S., and Kojima, I. (2007) *J Cell Physiol* 210(3), 692-702
38. Stokes, A. J., Wakano, C., Del Carmen, K. A., Koblan-Huberson, M., and Turner, H. (2005) *J Cell Biochem* 94(4), 669-683
39. Boels, K., Glassmeier, G., Herrmann, D., Riedel, I. B., Hampe, W., Kojima, I., Schwarz, J. R., and Schaller, H. C. (2001) *J Cell Sci* 114(Pt 20), 3599-3606
40. Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., and Chun, J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(24), 13384-13389
41. Xu, Y., Fang, X. J., Casey, G., and Mills, G. B. (1995) *Biochem J* 309 (Pt 3), 933-940
42. Daaka, Y. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1582(1-3), 265-269
43. Frederick, J., Buck, M. E., Matson, D. J., and Cortright, D. N. (2007) *Biochem Biophys Res Commun* 358(4), 1058-1064
44. Saunders, C. I., Kunde, D. A., Crawford, A., and Geraghty, D. P. (2007) *Mol Immunol* 44(6), 1429-1435

Figure legends

Fig 1: *mTRPV2 is activated by LPC and LPI*

A, Immunoblot of CHO_mTRPV2 cell lysates with the anti-mTRPV2 antibody showed two immunopositive bands: one glycosylated of 92kDa and one not glycosylated of 83kDa. **B**, Confocal images showing immunolocalisation of TRPV2 in CHO_mTRPV2 cells. **C**, Higher magnification put in evidence the plasma membrane localisation of the channel, CHO cells are used as negative control (**D**). **E**, Representative traces measured by Ca²⁺ imaging showing the effect of high temperatures (indicated by red bars) in CHO_mTRPV2 (n=90) and CHO control cells (n=90). **F**, Ca²⁺ imaging experiment showing the effect of 2-APB at 300μM in CHO mTRPV2 cells (n=90), and in CHO control cells (n=90). **G**, Representative traces measured by Ca²⁺ imaging showing the effect of LPC C18:0 10μM in CHO mTRPV2 cells (n=90) versus CHO control cells (n=90). **H**, Ca²⁺ imaging experiment showing the effect of LPI 10μM in CHO mTRPV2 cells (n=90), not in CHO control cells (n=90). **I**, Comparative graph showing maximal mean in response to LPC 10μM (n=90), LPI 10μM (n=90) and methanol (MeOH) vehicle (n=90) between CHO_mTRPV2 and CHO control cells.

Fig2: *LPC and LPI stimulate hTRPV2 channel*

A, Cells nucleofected with hTRPV2-GFP and the pSilencer empty vector (HEKhTRPV2) (**a**) are analysed 72h after for GFP fluorescence emission. When cells are co-nucleofected with hTRPV2-GFP and shRNA TRPV2 I (HEKhTRPV2-shV2 I) (**b**), GFP fluorescence decreased. GFP fluorescence is totally abolished when cells are nucleofected (72h) with hTRPV2/GFP+shRNA TRPV2 II (HEKhTRPV2-shV2 II) (**c**). Immunoblot of HEKhTRPV2, HEKhTRPV2shV2 I and II cell lysates with the anti-GFP antibody showing hTRPV2 expression 72h after nucleofection (**d**). This last

condition is equivalent to HEK control cells nucleofected without hTRPV2. **B**, Confocal images showing (a) co-localisation for GFP (b) and hTRPV2 (c) detected by anti-hTRPV2 antibody. **C**, Representative traces measured by Ca^{2+} imaging showing the effect of high temperatures (indicated by red bars) in HEK hTRPV2 (n=90) and HEK hTRPV2-shV2 II control cells (n=90). **D**, Ca^{2+} imaging experiment showing the effect of 2-APB at 500 μM in HEK hTRPV2 cells (n=90), and also in HEK hTRPV2-shV2 II control cells (n=90). **E**, Representative traces measured by Ca^{2+} imaging showing the effect of LPC C18:0 10 μM in HEK hTRPV2 cells (n=60), and in HEK hTRPV2-shV2 II control cells (n=60). **F**, Ca^{2+} imaging experiment showing the effect of LPI 10 μM in HEK hTRPV2 cells (n=60), and in HEK hTRPV2-shV2 II control cells (n=60). **G**, Comparative graph showing maximal mean in response to LPC C18:0 10 μM (n=60), LPI 10 μM (n=60) and methanol (MeOH) vehicle (n=60) between HEK hTRPV2 and HEK hTRPV2 shV2 II cells.

Fig 3: Screening of various lysophospholipidson TRPV2 activity

A, Comparative graph obtained by Ca^{2+} imaging showing maximal mean in response to LPC C18:0 (n=90) as control, palmitoleic acid (n=90), sphingosine (n=90), choline (n=90) and LPA (n=90) in CHO mTRPV2 cells. **B**, Ca^{2+} imaging experiment showing showing maximal mean in response to LPC C18:0 (n=60) as control, palmitoleic acid (n=60), sphingosine (n=60), choline (n=60) and LPA (n=60) in HEK hTRPV2 cells. **C**, Comparative graph showing Ca^{2+} uptake in response to LPC C18:0 10 μM (n=60), LPC C16:0 (n=60), LPC C14:0 (n=60), LPC C12:0 (n=60) and LPC C6:0 (n=60) in CHO mTRPV2 cells. **D**, Ca^{2+} imaging experiment showing Ca^{2+} uptake in response to LPC C18:0 10 μM (n=60), LPC C16:0 (n=60), LPC C14:0 (n=60), LPC C12:0 (n=60)

and LPC C6:0 (n=60) in HEKhTRPV2 cells. All lysophospholipids molecules were used at 10 μ M concentration.

Fig 4: Basic characterization of TRPV2 by Ca²⁺ imaging

A, LPC C18:0 induced a weak depletion of Ca²⁺ store in Ca²⁺ free condition (HBSS 0Ca²⁺) and a high Ca²⁺ influx in presence of 2mM Ca²⁺ in CHOmTRPV2 (n=60), **(B)** as for HEKhTRPV2 cells (n=60). LPC C18:0 has no effect on CHO or HEK control cells **(A, B)** (n=60 by condition). **C**, Comparative graph showing Ca²⁺ uptake in response to LPC C18:0 in absence of Ca²⁺ (HBSS 0Ca²⁺) and in presence of 2mM Ca²⁺ in CHOmTRPV2 and in HEKhTRPV2 cells (n=60 by condition). **D**, Ca²⁺ imaging experiment showing that pre-treatment with wortmannin 50 μ M, 30mn or with U73122 10 μ M, 30mn has no effect on amplitude of LPC C18:0 response but pre-treatment with PTX 250ng/ml overnight abolished LPC C18:0 response in CHOmTRPV2 cells (n=60 by condition). Moreover, pre-treatment with LY294002 50 μ M during 15mn diminished drastically amplitude of the response induced by LPC C18:0 in CHOmTRPV2 (n=60) characteristics traces are shown as an insert (n=60 by condition). **E**, Comparative graph showing that pre-treatment with PTX 250ng/ml overnight or with LY294002 50 μ M 15mn respectively totally inhibit or drastically diminished amplitude of LPC C18:0 response in HEKhTRPV2 cells, characteristics traces are shown as an insert (n=60 by condition).

Fig 5: LPC induces translocation of TRPV2 to the plasma membrane

A, Immunoblot with anti-mTRPV2 antibody showing increase of mTRPV2 expression in the biotinylated fraction after LPC C18:0 (10 μ M) application on CHOmTRPV2 cells. This increase is abolished by pre-treatment with LY294002

50 μ M or PTX 250ng/ml (overnight). **B.** Immunoblot with anti-hTRPV2 antibody showing raise of hTRPV2 expression in biotinylated fraction from LPC C18:0 10 μ M application. Higher concentrations of LPC C18:0 have no further effect on hTRPV2 expression in the biotinylated fraction on HEK hTRPV2 cells

Fig 6: LPC effect on prostate cancer cell line PC3.

A. Silencing of TRPV2 expression is assessed by RT-PCR in human prostate PC3 cells nucleofected with shTRPV2 I or II (PC3 shTRPV2 I or II) or empty vector (PC3 Psil). **B.** Immunoblot with antibody anti hTRPV2 showing that expression of TRPV2 protein in PC3 shTRPV2 I or II cells is abolished compared to PC3 Psil cells. **C,** 10 μ M LPC C18:0 induces cytoplasmic Ca²⁺ increase in PC3 Psil, but not in PC3 shTRPV2 I or II cells.

Table 1

List of primers used for RT-PCR amplifications.

	5'-forward-3'	5'-reverse-3'	Expected product size (bp)	Accession number
TRPV2	AAAGGGAACAGGTGCCAGTCA	TCCCCTGCTTGGTGCAAGCG	475	NM_016113.3
β -actin	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	210	NM_001101

Fig 1

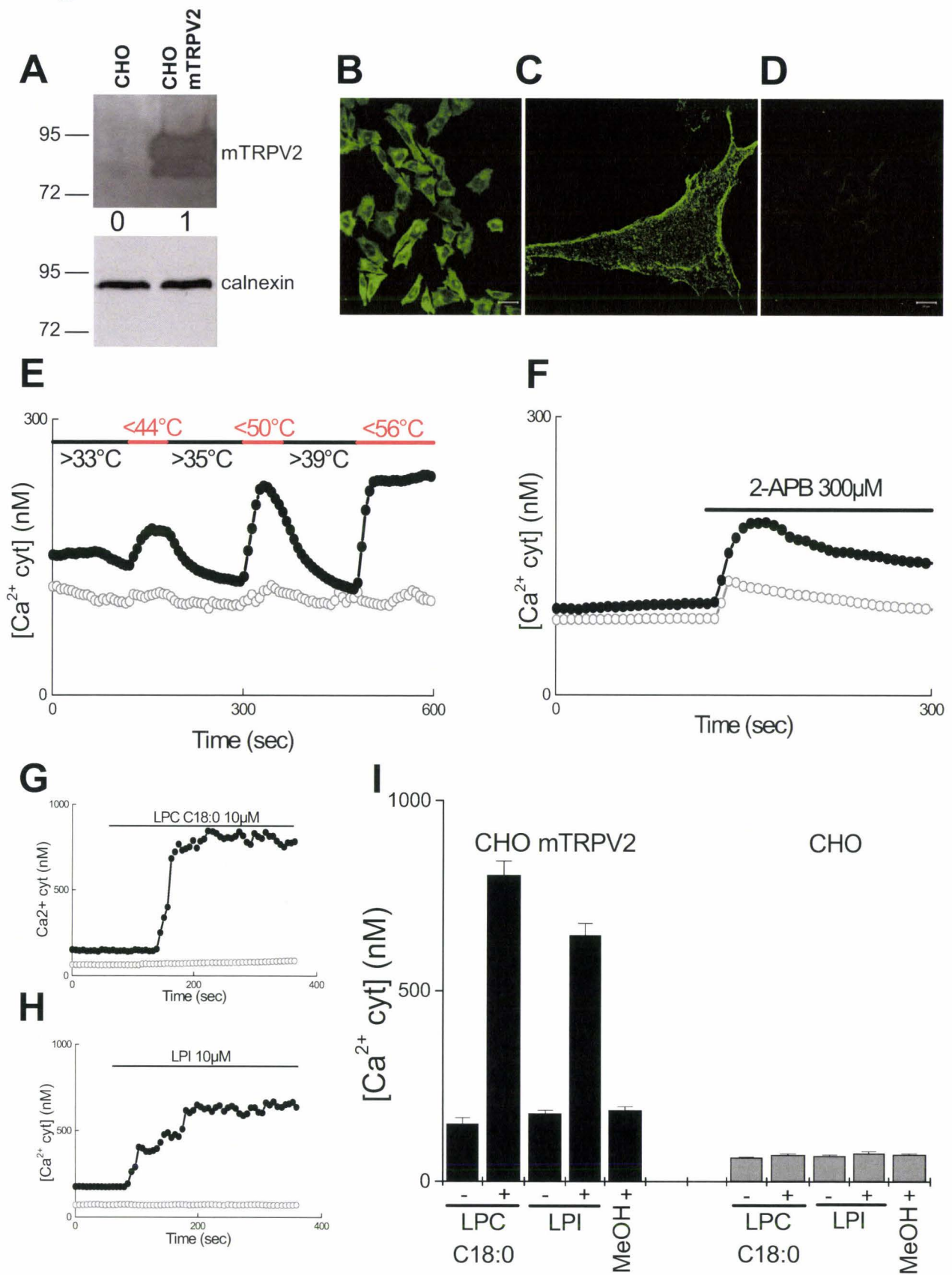
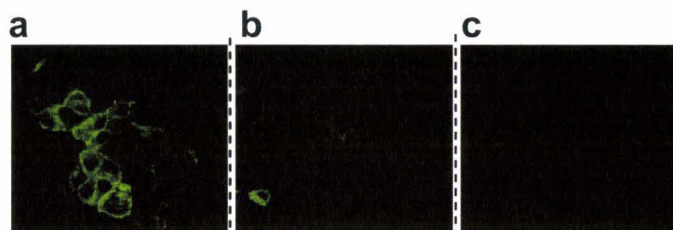
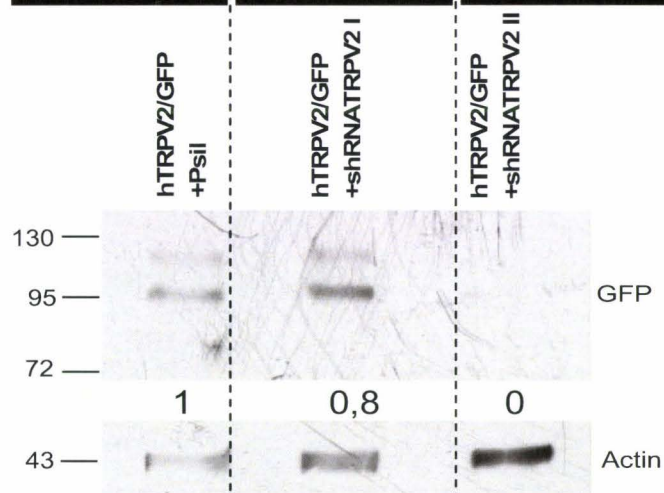


Fig 2

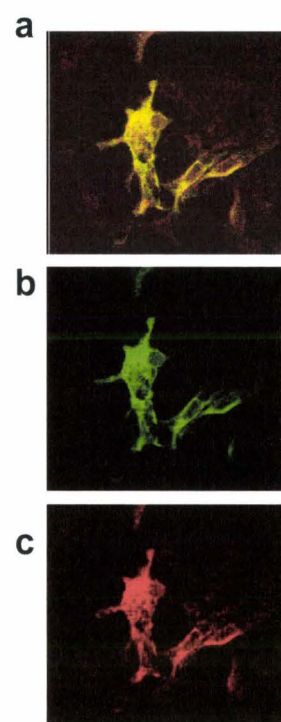
A



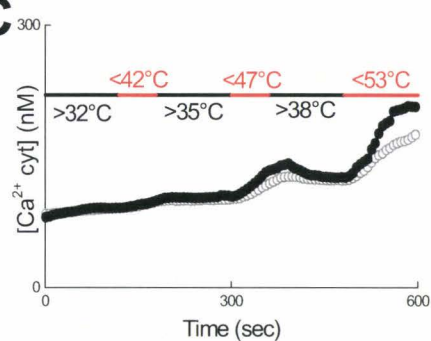
d



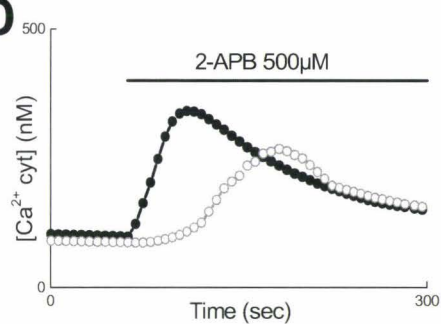
B



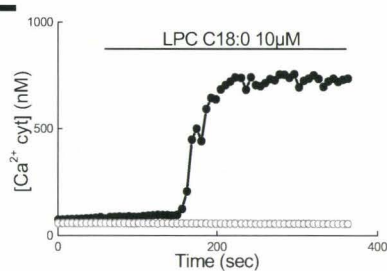
C



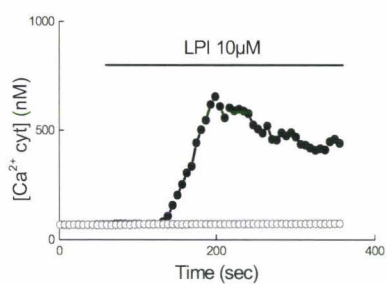
D



E



F



G

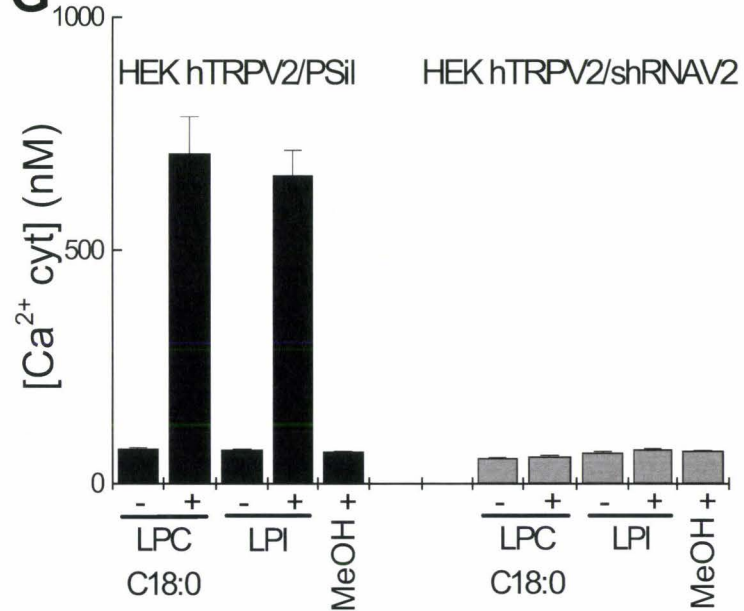


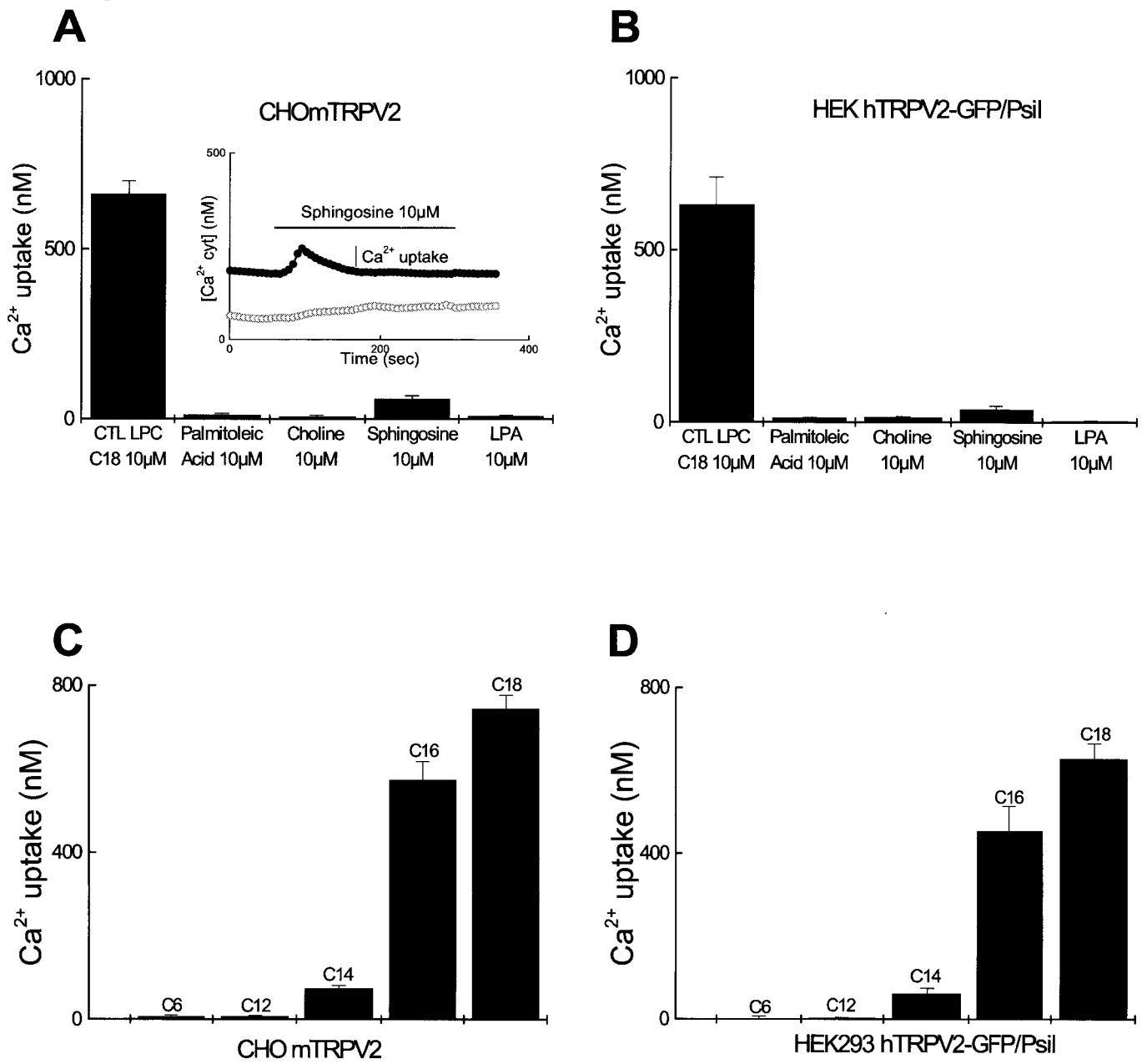
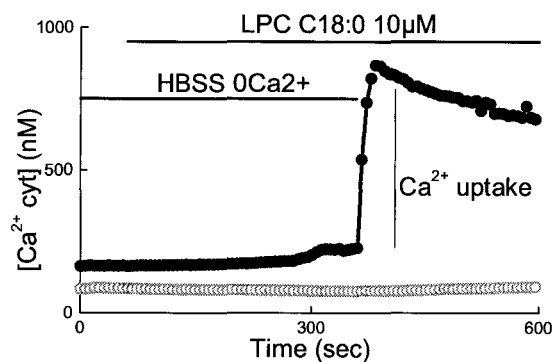
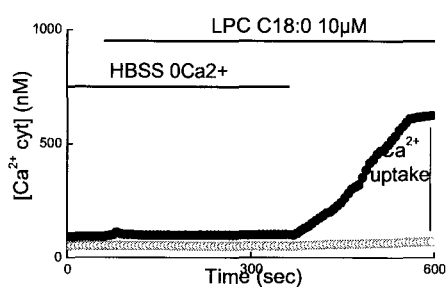
Fig 3

Fig 4

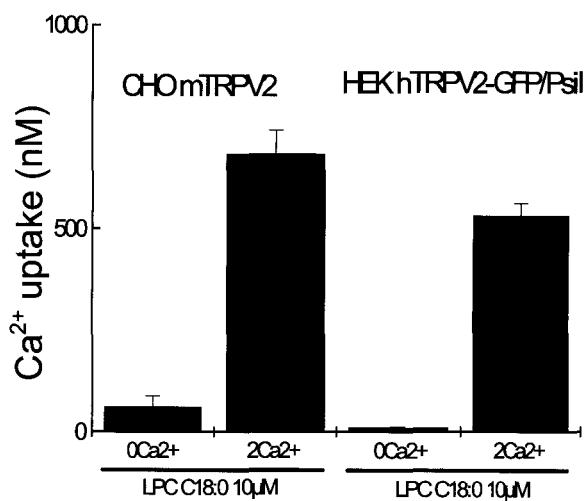
A



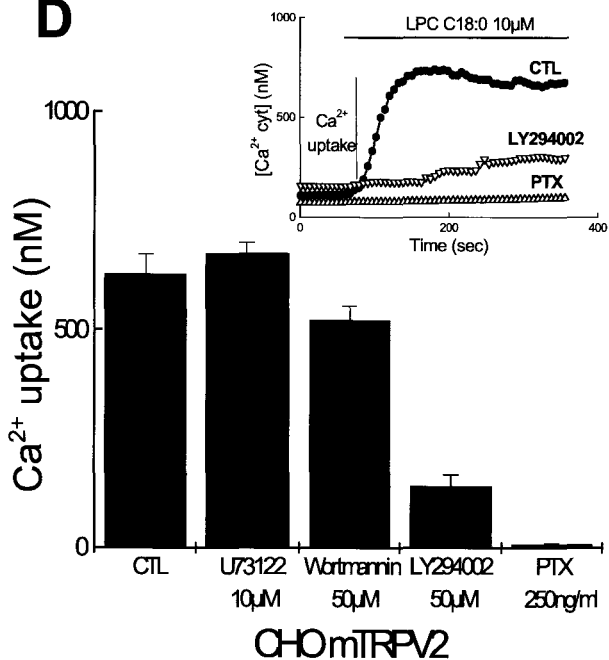
B



C



D



E

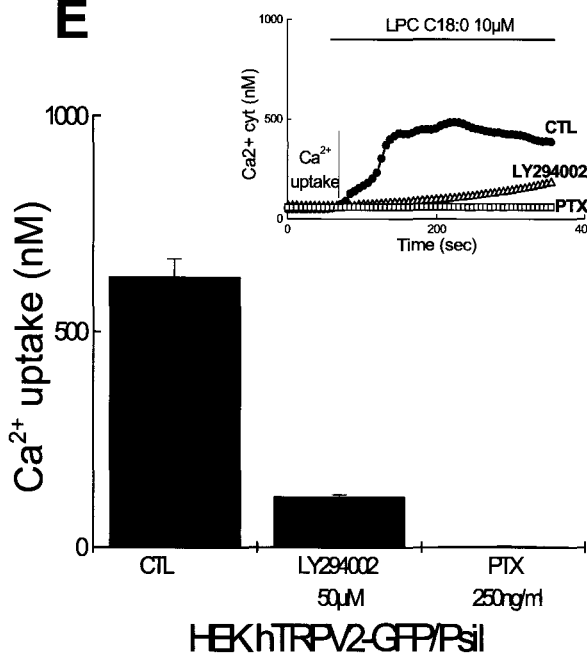
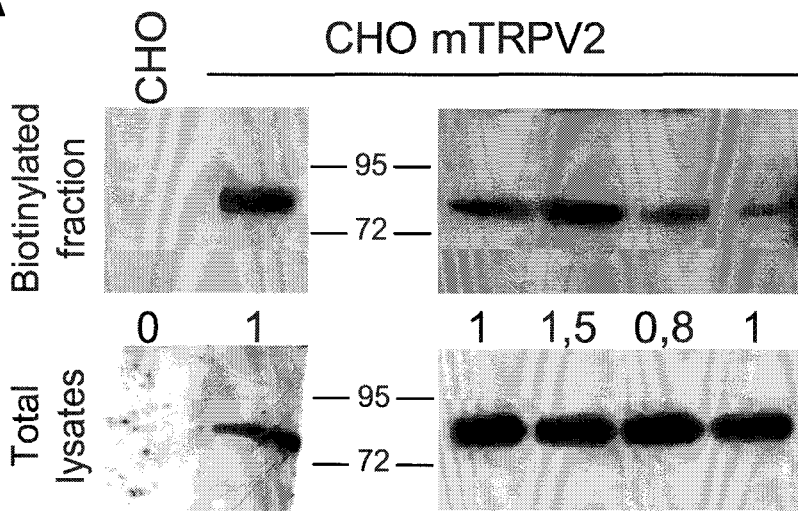


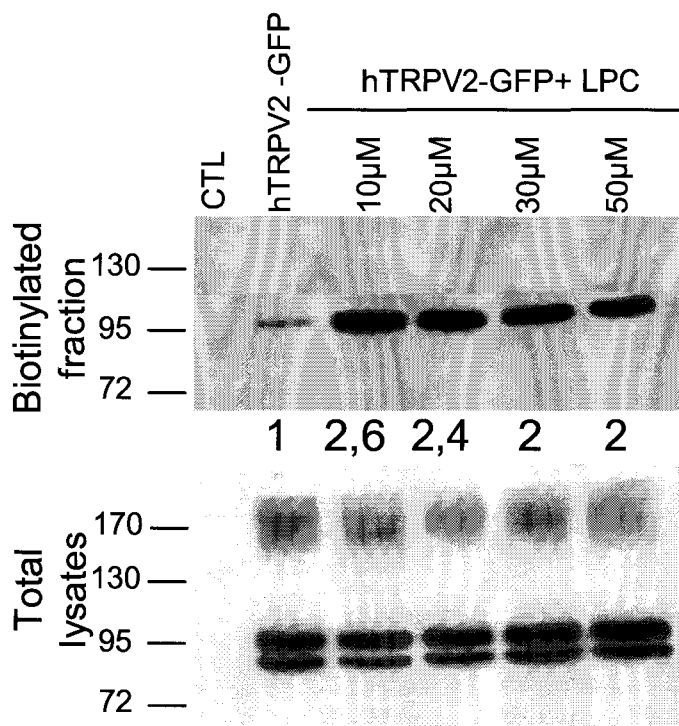
Fig 5

A



LPC 10 μ M	-	+	+	+
LY 294002 50 μ M	-	-	+	-
PTX 250ng/ml	-	-	-	+

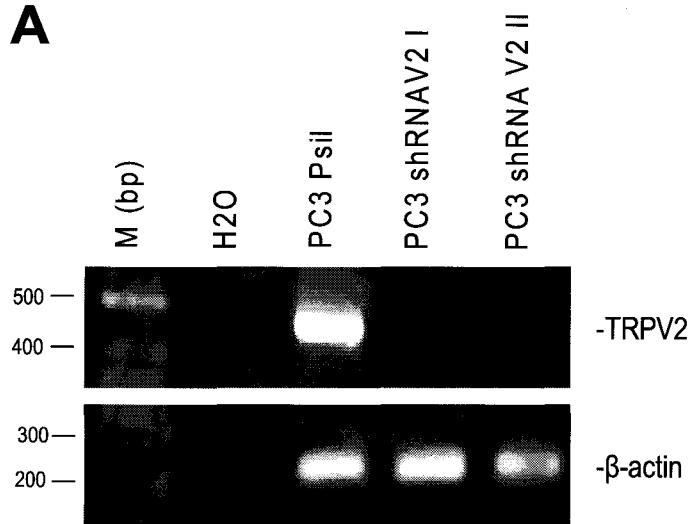
B



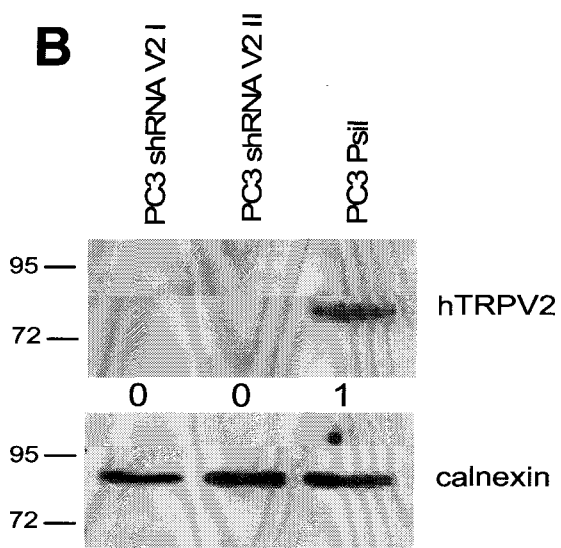
HEK293

Fig 6

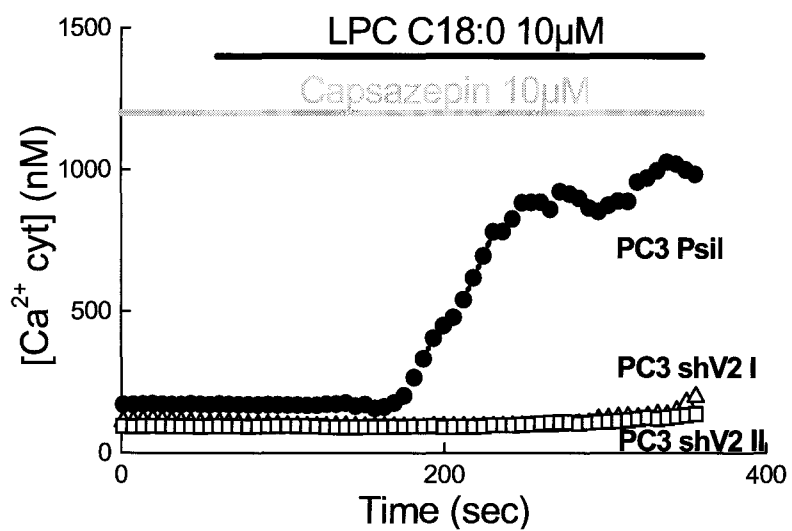
A



B



C



CHAPITRE 3

ARTICLE 5

TRPV2 EST IMPLIQUÉ DANS LA DIFFÉRENCIATION NEUROENDOCRINE ET L'ANDROGENO-INDEPENDANCE DES CELLULES CANCÉREUSES PROSTATIQUES HUMAINES.

Ce dernier article en cours de préparation montre l'expression et le rôle du canal TRPV2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. Le but était d'étudier l'expression de TRPV2 au cours de l'évolution du cancer prostatique humain.

Dans un premier temps, nos résultats montrent que le canal TRPV2 n'est pas exprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines androgéno-dépendantes LNCaP. Cependant, il est exprimé de manière endogène dans les différentes lignées de cellules cancéreuses prostatiques humaines androgéno-indépendantes DU145, PC3 et LNCaP C4-2 ainsi que dans les cellules LNCaP assimilées à des cellules androgéno-indépendantes suite à l'induction de la différenciation neuroendocrine par un traitement alliant l'AMPc et l'IBMX ou par un traitement avec un milieu déstéroïdé.

Cette expression de TRPV2 dans les différentes lignées est corrélée à une concentration en calcium basal cytoplasmique supérieure à celle des cellules n'exprimant pas le canal ou à celles des cellules transfectées par des si/shRNA dirigés spécifiquement contre le canal TRPV2. De plus, nous montrons que l'abolition de l'expression du canal TRPV2 par ces mêmes si/shRNA semble corrélée à une diminution d'expression du marqueur neuroendocrine NSE dans les cellules cancéreuses prostatiques.

En conclusion, l'expression du canal TRPV2 est corrélée à l'androgéno-indépendance ainsi qu'à la différenciation neuroendocrine du cancer de la prostate ainsi qu'aux modifications de l'homéostasie calcique de ces cellules. Le canal TRPV2 pourrait donc représenté un nouveau marqueur des cellules cancéreuses prostatiques évoluant vers les phénotypes les plus agressifs

TRPV2 CHANNEL IS INVOLVED IN NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION AND ANDROGEN INDEPENDANCE OF HUMAN PROSTATE CANCER CELLS

Michaël Monet¹, V'yacheslav Lehen'kyi¹, Morad Roudbaraki¹, Gabriel Bidaux¹,
Christian Slomianny¹, Etienne Dewailly¹, Philippe Delcourt¹, François
Rassendren³, Sandrine Humez^{1,2}, Natalia Prevarsakaya¹.

¹INSERM U800, Equipe labellisée par la Ligue nationale Contre le Cancer, Villeneuve d'Ascq, France. ²Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France. ³Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, Lens, France. ⁴Département de Pharmacologie, Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, Université Montpellier I, Université Montpellier II, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex, France

Abstract

Prostate cancer is one of the leading threats to the men's health. Being initially dependent on the androgens, the tumour often progresses to hormone-refractory stage wherein androgen ablation therapy is no longer efficient. The reasons for this transition as well as the mechanisms involved remain poorly understood. Here, we report that neuroendocrine differentiation of androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP initiates the expression of a non-selective cationic channel TRPV2. We have also detected TRPV2 expression in androgen-resistant prostate cancer cell lines PC-3, DU-145, and LNCaP C4-2 suggesting it as a prognostic marker for the advanced hormone-refractory stage. The neuroendocrine differentiated phenotype is

dependent on TRPV2 since TRPV2 silencing significantly downregulates neurone-specific enolase, a key neuroendocrine marker. The main mechanism is related to TRPV2-mediated increase in basal intracellular calcium level of neuroendocrine differentiated LNCaP, as well as androgen-independent PC-3, DU-145, and LNCaP C4-2 cell lines. Thus, TRPV2 is involved in neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells and may represent a prospective pharmacological target in the treatment and/or prevention of prostate cancer progression to hormone-refractory advanced stage.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most commonly diagnosed neoplasm in men and is the second leading cause of cancer-related death in North America and Western Europe. The incidence of PCa increases with age. Considering the general aging of the population in industrialized countries, PCa has become a significant health, social and economic problem.

Androgen ablation is initially beneficial to nearly all men with PCa, since androgen-dependent PCa undergoes apoptotic death by such treatment (Kyprianou et al., 1990). Unfortunately, androgen ablation is only palliative and patients relapse into androgen-independent PCa with dramatic consequences (Crawford, 1989). Indeed, androgen-independent PCa cells do not enter the programmed cell death pathway following androgen ablation (Denmeade et al., 1996). Thus, the major reason for the ability of PCa cells to metastasize and kill the patient is not related to their rate of proliferation, but to their extensive ability to survive once they have disseminated to a distant site (Berges et al., 1995). However, it remains unclear how androgen-independent PCa cells become resistant to the apoptosis.

Neuroendocrine cells are one of the phenotypes of apoptosis-resistant cells. Moreover, neuroendocrine cells represent an androgen-insensitive cell phenotype in the prostate (Krijnen et al., 1993). The abundance of neuroendocrine cells correlates with tumour malignancy, loss of androgen sensitivity and poor prognosis (Cussenot et al., 1998; Jongsma et al., 1999). In addition, significant and clustered neuroendocrine differentiation (NED) in PCa can lead to an increase in proliferation and earlier tumour progression (Grobholz et al., 2005). Tumours with an increased neuroendocrine cell population are often more aggressive and eventually become androgen-independent (Abrahamsson, 1999). However the molecular and cellular

mechanisms controlling NED and apoptosis resistance of neuroendocrine cells are only partially understood and improvement in our understanding of the biological nature of neuroendocrine cells is urgently required (Vashchenko and Abrahamsson, 2005).

It is now evident that many human diseases - named collectively "channelopathies" - are linked to ion channels dysfunctions. Despite the channelopathies being well characterized in neuronal, cardiac or metabolic diseases, much less is known about the role of ion channels in oncogenesis. The family of transient receptor potential (TRP) cationic protein-channels displaying extraordinarily diverse activation mechanisms (Alexander et al., 2007), have recently received increasing attention, in particular, to their link to human diseases (Duncan et al., 1998; Prawitt et al., 2000; Tsavaler et al., 2001). Some of these TRP channels have been reported to be involved in cancerogenesis: TRPM1 in melanoma (Duncan et al., 1998; Fang and Setaluri, 2000), TRPV6 and TRPM8 in PCa (Peng et al., 2001; Tsavaler et al., 2001). TRPV6, which is undetectable in benign prostate tissue, was shown to be upregulated in PCa especially in the late stages with extraprostatic extensions (Fixemer et al., 2003), and therefore was proposed as a prognostic marker for tumor progression.

Despite its expression in different cell types Transient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2) is still the most intriguing member of the TRPV channel family. The mechanisms of TRPV2 regulation are still a matter of debate. The recent studies have shown that mRNA of TRPV2 is expressed in prostatic tissue in rat (Wang et al., 2007). Initially, it was described that TRPV2, also named GRC (Growth factor Regulated Channel), was coexpressed with chromogranin A, a marker of NED in the prostate (Kowase et al., 2002). Nevertheless, the direct correlation of TRPV2

expression with neuroendocrine phenotype in the prostate is not clear. In addition, the phenotype of TRPV2 channel expressing cells and the role of TRPV2 in PCa had never been reported. This study was designed to study, on the one hand, the expression of TRPV2 channel in PCa progression towards androgen-independence, and on the other hand, the consequences of TRPV2 expression on Ca^{2+} homeostasis in human PCa cells. Our results show that TRPV2 is expressed in androgen-independent cancer cells but not in androgen-dependent cancer cells. Furthermore, this work demonstrates the direct correlation of TRPV2 channel expression with the neuroendocrine phenotype progression. We have also provided the evidence that TRPV2 affects Ca^{2+} -homeostasis by increasing intracellular calcium level ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) in TRPV2 expressing cancerous cells.



Experimental procedures

Cell Culture

The androgen-dependent human prostate cancer cell line LNCaP and androgen-independent human prostate cancer cells lines LNCaP C4-2, DU145 and PC3, were obtained from the American Type Culture Collection and maintained in culture in RPMI 1640 medium (Gibco-Life Technologies) medium supplemented with 10% fetal calf serum (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France), 5 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France), and kanamycin 100 µg/ml.

Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Prior to fluorescence measurements, the cells were trypsinized and transferred onto glass cover slips. Cells were used 2-4 days after trypsinization. The medium was replaced every 48 hours.

Generation of shTRPV2-vectors

Hybridized oligonucleotides were cloned into p*Silencer* 4.1-CMV-puro vector (Ambion) following the manufacturer's instructions and were defined as shTRPV2-I (sense 5'-GGTAAGACGTGCCTGATGA-3') and shTRPV2-II (sense 5'-TAAGAGTCAACCTCAACTA-3'). Silencing efficiency was verified by both western-blot and PCR.

Nucleofection

Transfection of shRNA TRPV2 I or II into PC3 cells was carried out using Nucleofector (Amaxa GmbH, Köln, Germany) according to manufacturer's instructions. Briefly, 3 µg of vector were transfected in 2 million of trypsinized

HEK293 or PC3 cells which were then plated into a T75 flask and onto glass coverslips for 72h.

siRNA transfection

LNCaP and LNCaP C4-2 were transfected with 50 nM siRNA against TRPV2 (siTRPV2, synthesized by Dharmacon Inc.) using 6 μ l TransIT-TKO transfection reagent (Mirus Inc), following the manufacturer's instructions (see Table 1 for siRNA sequences).

Ca²⁺ Measurements using Fura-2 AM

Prior to fluorescence measurements the cells were trypsinized and transferred to glass slips. The medium was replaced every 48 h. Cells were used 3 days after trypsinization. The culture medium was replaced by an HBSS solution containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of this solution were adjusted to 310 mOsm.l⁻¹ and 7.4, respectively. Dye loading was achieved by transferring the cells into a standard HBSS solution containing 1 mM Fura-2 AM (Calbiochem, Meudon, France) for 40 minutes at 37°C, as described previously (Humez et al., 2006).

RT-PCR

Total mRNA was isolated from cells as described (18). To detect TRPV2 cDNA, PCR was performed by adding 1 μ l of the RT template to a mixture of: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, and 1 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), in a final volume of 25 μ l. DNA amplification conditions

included an initial denaturation step of 7 min at 95°C, and 36 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 30 sec at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Primers used are listed in the supplemental Table 1.

Immunodetection

Cells were fixed with 4% formaldehyde-1X PBS for 15 minutes, washed three times, then permeabilized in PBS-gelatine (Phosphate buffer saline, gelatine 1.2%) complemented with 0.01% Tween 20 and 100mM glycine for 30 minutes at 37°C. Then, cells were incubated with the primary rabbit polyclonal anti-hTRPV2 antibody (1/200) in PBS-gelatine at 37°C for 1.5 hours. After thorough washes, the slides were treated with the corresponding anti-rabbit or anti-mouse IgG, coupled with either Alexa fluor 546-labeled (Molecular probes, dilution: 1/4,000) or Alexa fluor 488-labeled (Molecular probes, dilution: 1/2,000) diluted in PBS-gelatine for 1 hour at room temperature. After two washes, the slides were treated with Mowiol®.

Fluorescence analysis was carried out using a Zeiss LSM 510 confocal microscope and analysis software (AIM 3.2, Zeiss), as previously described (Thebault et al., 2005a).

Western blotting

Following treatments cells were rinsed with a NaCl solution (150 mM) and lysed with an ice-cold homogenizing buffer (pH 7.2) containing 20 mM PO₄Na₂K, 1% Triton X100, 1% sodium desoxycholate, 5 mM EDTA and a protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma) for 30 min at 4°C. The homogenates were cleared out by centrifugation at 16000 g for 10 min and the protein content in the supernatants was determined using the BCA method (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL). 4 µg of total

proteins of each sample were analyzed using 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After transfer onto PVDF membrane using a semi-dry electroblotter (Bio-Rad), the membrane was cut into thin strips that were further processed for immunodetection. The strips were blocked in 5% non-fat dry milk in TBST (15 mM Tris buffer (pH=8), 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20), washed three times, then incubated with specific polyclonal anti-hTRPV2 (rabbit, 1/250) as previously described (Juvin et al., 2007). After washing, blots were incubated for 1 h with the corresponding horseradish peroxidase-linked secondary antibody and processed for chemoluminescent substrate (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. The blots were then exposed to X-Omat AR films (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). Membranes were reblotted twice: first with the anti-NSE mouse monoclonal antibody (1/250 catalog no. M0873; Dako) and then with the anti-beta-actin mouse monoclonal antibody (1/500 catalog no. MS-1295-P; Neomarkers).

Data analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Plots were produced using origin 5.0 (Microcal Software, Inc). Each experiment was repeated at least three times. Turkey-Kramer test was used for statistical comparison among means and differences, and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

TRPV2 channel expression in human prostate cancer cell lines

Initially, it was described that TRPV2 was detected in different tissues including the prostate (Kowase et al., 2002). This led us to study the expression of this channel in the androgen-dependent human PCa cell line LNCaP and also in androgen-independent human PCa cell line LNCaP C4-2 derived from androgen-dependent LNCaP cells, and in two androgen-independent human PCa cell lines: DU145 and PC3. mRNA of TRPV2 channel is expressed in the human androgen-independent PCa cell lines DU145, PC3 and LNCaP C4-2 (Fig 1A). In contrast, mRNA of this channel is not expressed in the human androgen-dependent PCa cell line LNCaP. These expression studies were confirmed using western blot of TRPV2 protein channel (Fig 1B). Thus, TRPV2 protein is only detected in androgen-independent cells lines DU145, PC3 and LNCaP C4-2, but not in androgen-dependent LNCaP cells.

TRPV2 expression correlates with NSE expression and alteration in Ca²⁺ homeostasis in androgen-independent PC3 cells

To study the role of TRPV2 in the aggressiveness of prostatic cancerous cells, we used shRNA TRPV2 I and II (PC3 shV2 I and II) nucleofected into PC3 cells to specifically inhibit the expression of TRPV2. We have previously shown that mRNA and protein of TRPV2 were expressed in human PCa cell line PC3 (Fig 1A, B). Here, we show that PC3 cells nucleofected with shTRPV2 I or II (PC3 shTRPV2 I or II) had no detectable TRPV2 mRNA expression compared to the cells nucleofected with the control plasmid Psilencer (PC3 Psil, Fig 2A). Neuron-specific enolase (NSE) is known to be expressed in PC3 (Zelivianski et al., 2001), which is consistent with the

data obtained in our experiments (Fig 2A). TRPV2 knockdown with shTRPV2 I or II in PC3 cells led to significant suppression of NSE mRNA (Fig 2A). Protein detection of both TRPV2 and NSE using western blot confirmed these data (Fig 2B). It was initially suggested that TRPV2 in TRPV2-expressing cells was constitutively activated and significantly elevated basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ as compared to the cells not expressing this channel (Penna et al., 2006). Microscopy-based single-cell imaging using the ratiometric Ca^{2+} indicator dye fura-2 was used to investigate the consequences of TRPV2 knockdown on basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in PC3 cells (Fig 2C). As it is seen the basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in PC3 treated with shTRPV2 I or II is lower ($120nM \pm 13nM$ and $110nM \pm 9nM$, $n=90$, respectively) as compared to control Psil transfected cells ($172nM \pm 9nM$, $n=90$). Thus, in PC3 cells the expression of TRPV2 channel correlates with their androgen-independent and/or neuroendocrine phenotype as well as with the increase in basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

TRPV2 expression correlates with NSE expression and alteration in Ca^{2+} homeostasis in androgen-resistant LNCaP C4-2 cells

Human prostate androgen-resistant cancer cell line LNCaP C4-2 derived from androgen-dependent LNCaP cells is androgen-resistant (Liu et al., 2004). As we have previously shown by semi-quantitative RT-PCR, LNCaP C4-2 cells expressed TRPV2 mRNA in a control condition transfected with vehicle, or when cells were transfected with 50 nM siRNA control (siCTL) for 72 h (Fig 3A). To specifically silence TRPV2 mRNA we transfected LNCaP C4-2 cells with 50 nM TRPV2 siRNA (siTRPV2) for 72 h. This transfection knockdowned TRPV2 expression as compared to LNCaP C4-2 siCTL. We have also shown that in LNCaP C4-2 cells treated with siTRPV2, NSE expression is downregulated as compared to control conditions

(vehicle) or in the cells treated with siCTL (Fig 3A). Western blot experiment was used to confirm that transfection with 50 nM siTRPV2 for 72h drastically diminished the expression of TRPV2 and NSE proteins as compared to siCTL (Fig 3B). To investigate the effects of TRPV2 knockdown on basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in LNCaP C4-2 cells, we used calcium imaging experiments (Fig 3C). We have demonstrated that basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ is lower in LNCaP C4-2 cells transfected with siTRV2 ($77 \text{ nM} \pm 2 \text{ nM}$) as compared to LNCaP C4-2 cells transfected with siCTL ($102 \text{ nM} \pm 12 \text{ nM}$, $n=90$ per condition). Thus, in LNCaP C4-2 cells the expression of TRPV2 channel correlates with the androgen-resistant and neuroendocrine phenotypes, and with an increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ as well.

NED of LNCaP cells induces TRPV2 expression which alters calcium homeostasis

We studied the expression of TRPV2 mRNA during NED of PCa cells. It is known that NED of LNCaP cells can be induced by incubation with a steroid-deprived culture medium (Mariot et al., 2002). Thus, we studied the effects of steroid deprivation on the expression of TRPV2 channel. Semi-quantitative PCR experiment showed that in those conditions the expression of TRPV2 mRNA is detected after 24 h (Fig 4A) and that this expression persists after several days of treatment.

It is known that NED of LNCaP cells can be also induced by the addition of permeant analogs of cAMP, such as 1 mM dibutyryl cAMP (Bt_2cAMP), and a 100 μM phosphodiesterase inhibitor isobutylmethylxanthine (IBMX) into culture medium (Mariot et al., 2002). We demonstrated using semi-quantitative PCR experiment that addition of Bt_2cAMP and IBMX into culture medium induces TRPV2 mRNA expression in LNCaP cells after only 8 h of treatment (Fig 4B). Moreover, the rate of this expression increases with the incubation time. Further, the transfection with

siTRPV2 decreases TRPV2 and NSE mRNAs expression in LNCaP treated with Bt₂cAMP and IBMX (Fig 4C). Western blotting technique was used to detect TRPV2 channel in LNCaP treated with 1mM Bt₂cAMP and 100 μM IBMX for 6 days as compared to untreated LNCaP cells (LNCaP CTL). We observed that in the above conditions both TRPV2 channel and NSE proteins were expressed (Fig 4D), being absent in LNCaP CTL. siTRPV2 transfection of LNCaP cells treated with Bt₂cAMP and IBMX showed the consequent knockdown of both TRPV2 and NSE proteins (Fig 4D).

The basal [Ca²⁺]_{cyt} in LNCaP cells treated with Bt₂cAMP and IBMX was studied (Fig 4E). Calcium imaging technique was used to determine that the basal [Ca²⁺]_{cyt} is higher in LNCaP cells (Vehicle) treated with Bt₂cAMP and IBMX than in LNCaP CTL cells (Vehicle) (125 nM ± 10 nM and 78 nM ± 3 nM, respectively). Cells transfection with siCTL does not significantly modify the basal [Ca²⁺]_{cyt} (135 nM ± 10 nM for LNCaP treated with Bt₂cAMP and IBMX and 80 nM ± 6nM for LNCaP CTL, respectively). It should be noted that transfection of LNCaP cells with siTRPV2 had no effect on basal [Ca²⁺]_{cyt} (80 nM ± 3 nM). However, in LNCaP treated with Bt₂cAMP and IBMX the transfection with siTRPV2 significantly decreased the [Ca²⁺]_{cyt} (96 nM ± 4 nM) compared to LNCaP treated with Bt₂cAMP and IBMX and transfected with siCTL.

Discussion

In the present study we report two major findings which allow the understanding of both physiologic and pathologic roles of TRPV2 channel in the human PCa. We have shown for the first time that: 1) TRPV2 expression correlates with the PCa progression to the androgen-independent state, and 2) the expression of TRPV2 channel elevates $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

We have shown that TRPV2 is expressed in different human prostatic cell lines, more particularly in androgen-resistant cancerous cell line LNCaP C4-2, in androgen-independent cancerous cell lines PC3 and DU145, but not in the androgen-dependent LNCaP cell line. The expression of TRPV2 channel has been recently characterized in prostatic tissue in rat (Wang et al., 2007). However, expression of TRPV2 channel has never been associated with the progression of PCa. We demonstrate for the first time that the expression of TRPV2 correlates with androgen-independence. Contrary to TRM8 channel, the expression of TRPV2 channel does not require the presence and/or activation of androgen receptor (Bidaux et al., 2005), and the expression of TRPV2 channel increases with the cancer progression towards androgen-independent phenotype. The expression of TRPV2 obviously correlates with the phenotype of more aggressive PCa cells. Thus, this channel could be used as a prognostic marker of cancer progression to androgen-independent stage.

Our results demonstrate that in PCa cell lines which express TRPV2, basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ is higher than in control cells which do not express TRPV2. It has been previously shown that TRPV2 channel was constitutively activated in overexpressed cell systems and induced an increase in basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Penna et al., 2006). Association of TRPV2 expression and increase of basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ is likely to act on cell phenomena such as proliferation, apoptosis resistance or NED known to be

regulated by modifications of Ca^{2+} homeostasis (Berridge et al., 2003; Humez et al., 2004; Humez et al., 2006). Thus, by increasing basal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ TRPV2 channel may be involved in the induction of NED.

In the present work we have demonstrated for the first time that TRPV2 expression is associated with the NSE expression, a marker of NED, being directly dependent and/interrelated with TRPV2 expression.

Surprisingly, the correlation between TRPV2 and NSE was also observed in PC3 and LNCaP C4-2 cell lines which are not neuroendocrine cell lines. However, it has been demonstrated that other neuroendocrine cell markers PGP9.5 and chromogranin A are expressed in PC3 what suggests that these cells may have been derived from metastatic adenocarcinomas which had undergone NED (Leiblich et al., 2007). Moreover, it has been also demonstrated that neuroendocrine cells lack nuclear androgen receptor and thus represent an androgen-insensitive cell phenotype in the prostate (Krijnen et al., 1993). This absence of androgen receptor in neuroendocrine tumour cells suggests that these cells may represent a population that could initially be androgen-independent and therefore refractory to androgen-deprivation therapy. Thus, the correlation between TRPV2 channel and NSE protein suggest that this channel may be used as a marker of cancer progress to hormone-refractory stage.

We show for the first time that the expression of TRPV2 channel is initiated during NED which is induced by incubation with a steroid-deprived culture medium or by addition of cAMP permeant analogs as Bt_2cAMP and IBMX into culture medium. Furthermore, we proved that the expression of TRPV2 channel in neuroendocrine differentiated LNCaP correlates with an increase in basal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and that TRPV2 knockdown induces a decrease of basal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Neuroendocrine differentiation is a common feature of human prostate carcinoma (Abrahamsson, 1999; di Sant'Agnes

and Cockett, 1996) and is considered to be associated with a poor prognosis and reduced long-term survival (Cohen et al., 1994). Neuroendocrine cells are generally characterized by the presence of voltage-gated Ca^{2+} channels. It has been demonstrated that the overexpression of $\alpha 1\text{H}$ (Cav3.2) T-type calcium channel during NED was accompanied by the neurite extension and the overexpression of a neuron-specific enolase in LNCaP cells (Mariot et al., 2002). The other study showed that TRPV2 channel, previously named GRC, was detected in prostate and TRPV2 was notably coexpressed with chromogranin A (Kowase et al., 2002). However, no TRP channel type has been shown to be upregulated during NED. In the present work, we show for the first time that TRPV2 channel is expressed during NED induced by steroid-deprivation of a cell culture medium or by cells incubation with Bt_2cAMP and IBMX. However, we report that the expression of TRPV2 channel in LNCaP subjected to neuroendocrine differentiation correlates with an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and that TRPV2 silencing by siRNA or shRNA diminishes $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. These data were confirmed by the previous study showing that the overexpression of TRPV2 channel generated an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Penna et al., 2006). Thus, this channel could be used as a prognostic marker of PCa progression to androgen-independent stage, and more particularly a marker of NED.

In summary, we have demonstrated that TRPV2 expression correlates with the phenotype of more aggressive neuroendocrine differentiated cells in PCa. Furthermore, we showed for the first time that TRPV2 is interrelated with the NSE expression and that TRPV2 also controls Ca^{2+} homeostasis in human PCa cells.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministère de l'Éducation Nationale, ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Bibliography

- Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* 39, 135-148.
- Alexander, S. P., Mathie, A., and Peters, J. A. (2007). Guide to Receptors and Channels, 2nd edition (2007 Revision). *Br J Pharmacol* 150 Suppl 1, S1.
- Berges, R. R., Vukanovic, J., Epstein, J. I., CarMichel, M., Cisek, L., Johnson, D. E., Veltri, R. W., Walsh, P. C., and Isaacs, J. T. (1995). Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1, 473-480.
- 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.
- 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.
- Cohen, M. K., Arber, D. A., Coffield, K. S., Keegan, G. T., McClintock, J., and Speights, V. O., Jr. (1994). Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression. *Cancer* 74, 1899-1903.
- Crawford, E. D. (1989). Combined androgen blockade. *Urology* 34, 22-26; discussion 46-56.
- Cussenot, O., Villette, J. M., Cochand-Priollet, B., and Berthon, P. (1998). Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Suppl* 8, 43-51.
- Denmeade, S. R., Lin, X. S., and Isaacs, J. T. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 28, 251-265.
- di Sant'Agnese, P. A., and Cockett, A. T. (1996). Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 78, 357-361.
- 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.
- 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.
- 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.
- Grobholz, R., Griebe, M., Sauer, C. G., Michel, M. S., Trojan, L., and Bleyl, U. (2005). Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 36, 562-570.
- 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 TNF α . *J Cell Physiol* 201, 201-213.
- Humez, S., Monet, M., Legrand, G., Lepage, G., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2006). Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 13, 181-195.
- Jongsma, J., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Van Weerden, W. M., Martens, G. J., van der Kwast, T. H., Schroder, F. H., and van Steenbrugge, G. J. (1999). Kinetics of

neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *Am J Pathol* 154, 543-551.

Juvin, V., Penna, A., Chemin, J., Lin, Y. L., and Rassendren, F. A. (2007). Pharmacological characterization and molecular determinants of the activation of TRPV2 channel orthologs by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Mol Pharmacol*.

Kowase, T., Nakazato, Y., Yoko, O. H., Morikawa, A., and Kojima, I. (2002). Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues. *Endocr J* 49, 349-355.

Krijnen, J. L., Janssen, P. J., Ruizeveld de Winter, J. A., van Krimpen, H., Schroder, F. H., and van der Kwast, T. H. (1993). Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry* 100, 393-398.

Kyprianou, N., English, H. F., and Isaacs, J. T. (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res* 50, 3748-3753.

Leiblich, A., Cross, S. S., Catto, J. W., Pesce, G., Hamdy, F. C., and Rehman, I. (2007). Human prostate cancer cells express neuroendocrine cell markers PGP 9.5 and chromogranin A. *Prostate*.

Liu, A. Y., Brubaker, K. D., Goo, Y. A., Quinn, J. E., Kral, S., Sorensen, C. M., Vessella, R. L., Belldegrun, A. S., and Hood, L. E. (2004). Lineage relationship between LNCaP and LNCaP-derived prostate cancer cell lines. *Prostate* 60, 98-108.

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.

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.

Penna, A., Juvin, V., Chemin, J., Compan, V., Monet, M., and Rassendren, F. A. (2006). PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane. *Cell Calcium* 39, 495-507.

Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., Gartner, B., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Higgins, M., Pelletier, J., and Zabel, B. (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 9, 203-216.

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.

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.

Vashchenko, N., and Abrahamsson, P. A. (2005). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur Urol* 47, 147-155.

Wang, H. P., Pu, X. Y., and Wang, X. H. (2007). Distribution profiles of transient receptor potential melastatin-related and vanilloid-related channels in prostatic tissue in rat. *Asian J Androl* 9, 634-640.

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.

Figure legends

Figure 1: TRPV2 is expressed in androgen-independent prostate cancer cell lines

A: The expression of TRPV2 mRNA in different prostate cancer cell lines. β -Actin mRNA expression was used as a reference control in each sample. **B:** Western blot showing the expression of TRPV2 protein in different PCa cells line. β -Actin was used as a loading control.

Figure 2: TRPV2 silencing downregulates NSE expression and decreases $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in PC3 cells

A: TRPV2 silencing downregulates NSE expression. PC3 cells were nucleofected with either Psilencer (PC3 Psil) or shRNATRNPV2 I or II (PC3 shTRPV2 I or II) for 72 h. β -actin mRNA was used as a reference control in each sample. **B:** The expression of TRPV2 and NSE proteins in PC3 cells. PC3 cells were nucleofected with either Psilencer (PC3 Psil) or shRNATRNPV2 I or II (PC3 shTRPV2 I or II) for 72 h. TRPV2 and NSE proteins were detected using anti hTRPV2 and NSE antibodies and β -actin protein was used as a loading control; **C:** TRPV2 affects basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in PC3 cells (n=120 per condition).

Figure 3: TRPV2 silencing downregulates NSE expression and decreases $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in LNCaP C4-2 cells.

A: TRPV2 silencing downregulates NSE expression. LNCaP C4-2 cells were transfected with either 50 nM siTRPV2 or siCTL for 72 h, or untreated cell (vehicle) were used as a control. **B:** The expression of TRPV2 and NSE proteins in LNCaP C4-2 cells. PC3 cells were transfected either 50 nM siTRPV2 or siCTL for 72 h.

TRPV2 and NSE proteins were detected using anti hTRPV2 and NSE antibodies and β -actin protein was used as a loading control; **C:** TRPV2 affects basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in LNCaP C4-2 cells (n=90 per condition).

Figure 4: NED upregulates TRPV2 expression and augments $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in LNCaP cells

A: TRPV2 transcripts are upregulated in LNCaP cells treated with a steroid-deprived medium. Cells were cultured in steroids-deprived medium for up to 6 days. After each incubation time total mRNA of the samples was extracted and a semi-quantitative RT-PCR was performed for the TRPV2 mRNA (344 bp) expression as described in materials and methods section. **B:** TRPV2 transcripts are upregulated in LNCaP cells treated with Bt_2cAMP 1 mM and IBMX 100 μM (LNCaP+ Bt_2cAMP +IBMX). Cells were treated for up to 6 days. **C:** siRNA TRPV2 50 μM (siTRPV2) treatment for 72 h silenced TRPV2 transcripts as well as down-regulates the NSE transcripts in LNCaP+ Bt_2cAMP +IBMX cells. Non-transfected LNCaP+ Bt_2cAMP +IBMX cells (Vehicle) or transfected with siRNA CTL 50 μM (siCTL) for 72 h cells were used as a control. **D:** TRPV2 and NSE proteins are only expressed in LNCaP+ Bt_2cAMP +IBMX (vehicle) or siCTL cells. **E:** LNCaP+ Bt_2cAMP +IBMX cells have basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ elevated than that of untreated LNCaP cells. TRPV2 affects basal $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in LNCaP+ Bt_2cAMP +IBMX, but not in control untreated LNCaP cells (n=90 per condition).

Table 1

List of primers used for RT-PCR amplifications.

	5'-forward-3'	5'-reverse-3'	Expected product size (bp)	Accession number
TRPV2	CCGACTCGGAATACACAGAGG	TCCCACTGCTTGGTGCAAGCG	351	NM_016113.3
TRPV2 (PC3)	AAAGGGAACAGGTGCCAGTCA	TCCCACTGCTTGGTGCAAGCG	475	NM_016113.3
NSE	TGAGGGATGGAGACAAACAG	CTTGTCGATGGCTTCCTTAC	553	NM_001975.2
GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA	237	NM_002046.3
β -actin	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	210	NM_001101

Fig 1
A

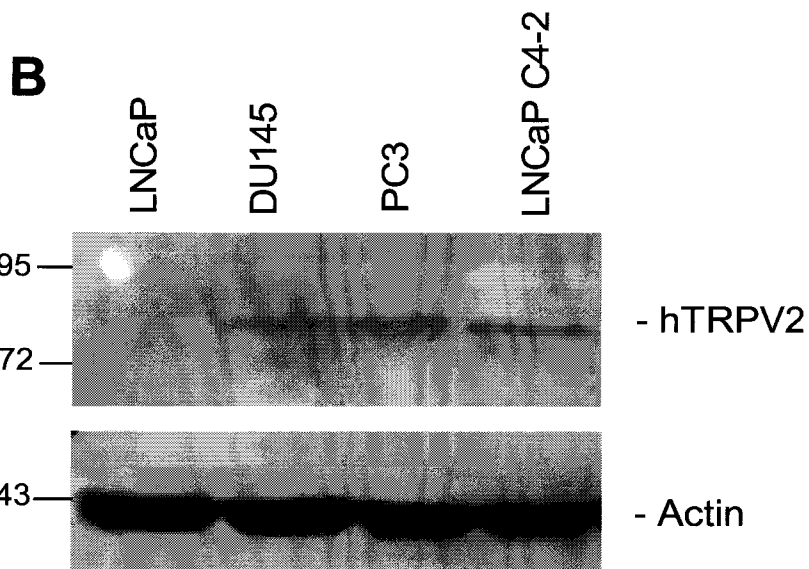
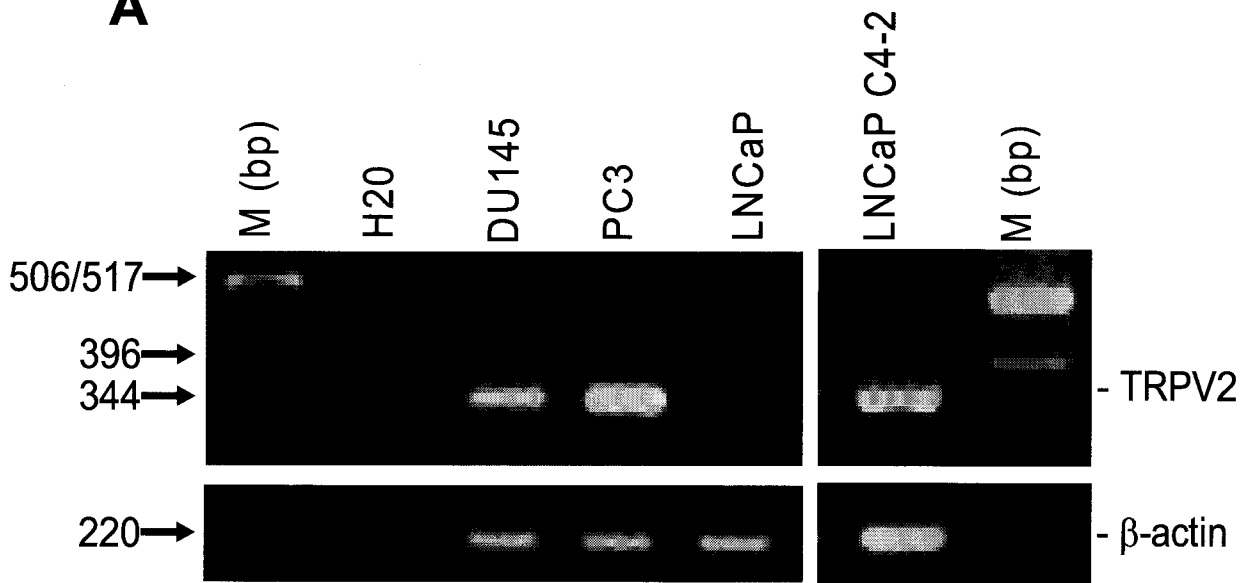


Fig 2

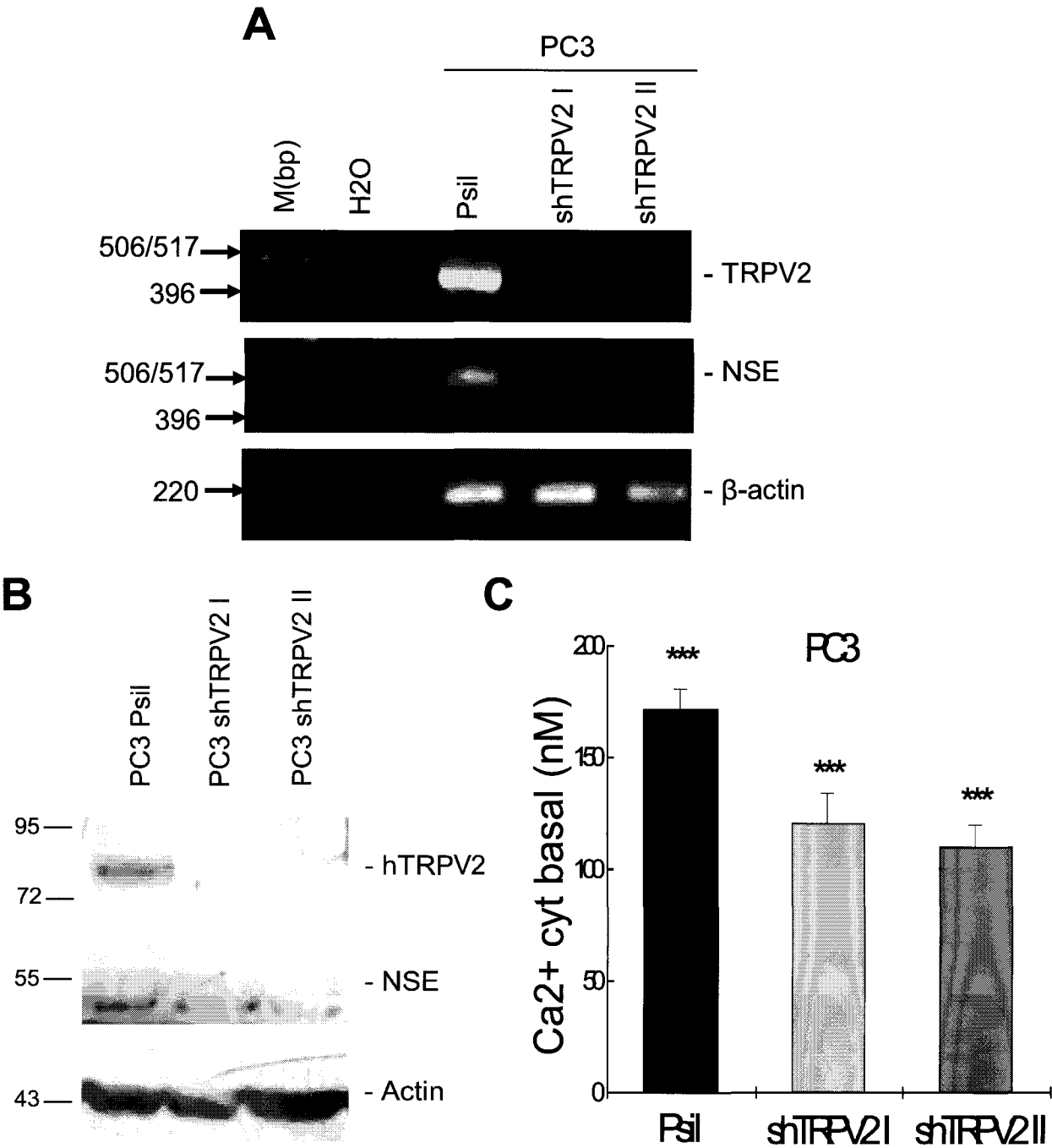


Fig 3

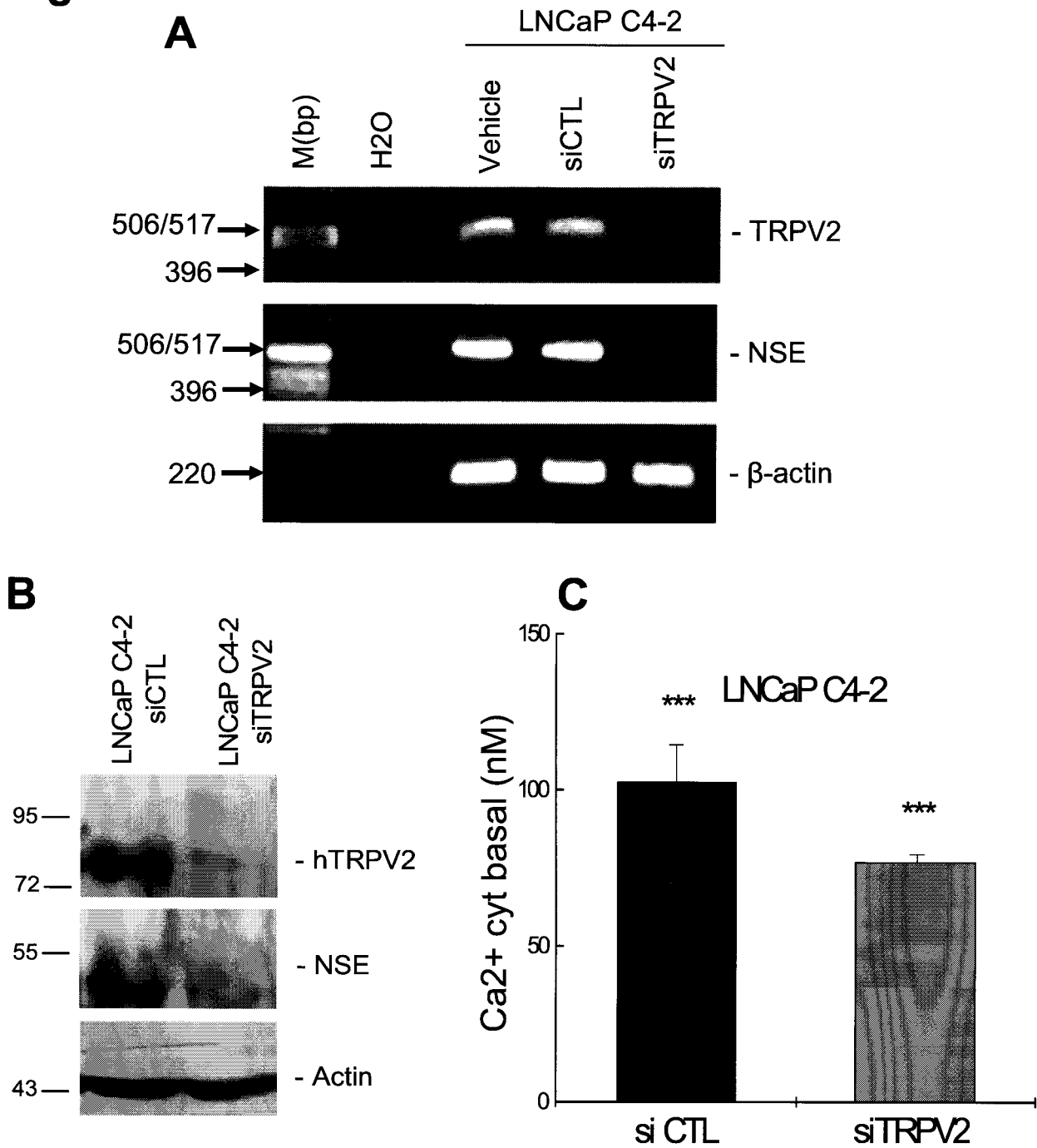
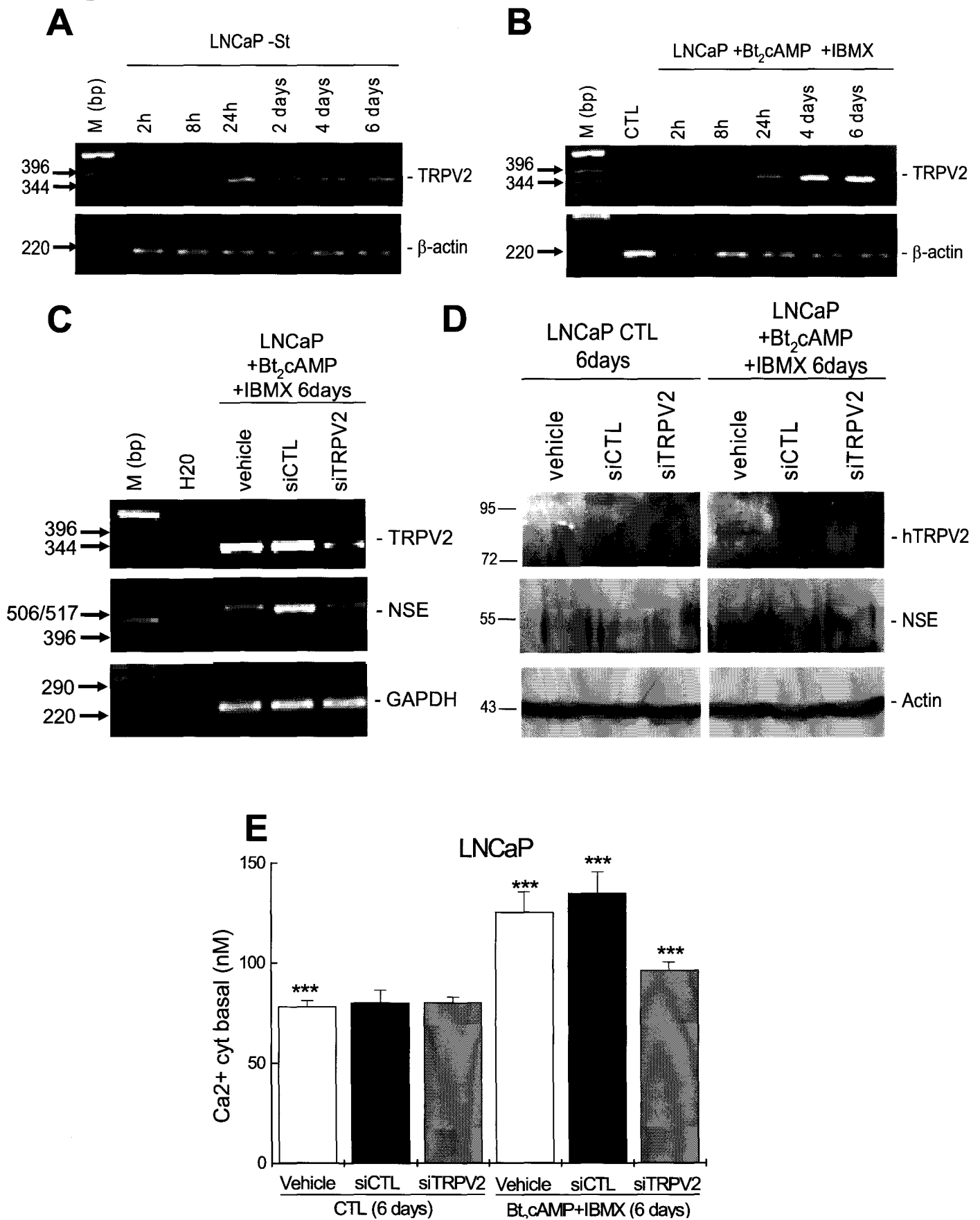


Fig 4



*Discussion et
Perspectives*

I. DISCUSSION

Le cancer de la prostate est une maladie fréquente, touchant plus de 15 000 hommes chaque année en France. Véritable problème de santé publique, cette pathologie présente la particularité de n'être sensible à aucune chimiothérapie connue actuellement. En outre, les traitements actuels ont une efficacité limitée dans le temps, et l'issue de la maladie est encore trop souvent mortelle, ce qui donne à cette pathologie le triste titre de second cancer le plus meurtrier chez l'homme.

Il est connu depuis longtemps que la croissance du tissu prostatique normal et pathologique de la prostate est dépendante des androgènes. Durant de nombreuses années, les androgènes ont été la seule cible des recherches contre le cancer de la prostate, et les traitements actuels ont d'ailleurs pour point commun d'empêcher l'action des androgènes sur cet organe. Cependant, cette théorie hormonale du développement des cancers prostatiques a ses limites. En effet, les traitements anti androgéniques actuels sont bénéficiaires à une majorité de patients de manière temporaire car il est fréquent que ces patients développent par la suite une résistance aux traitements. Elle est le résultat (i) de l'évolution des cellules cancéreuses prostatiques vers l'androgéno-indépendance et (ii) de l'augmentation de la différenciation neuroendocrine (Bonkhoff et al., 1994). Les cellules neuroendocrines produisent et sécrètent des neurohormones régulant l'activité et l'homéostasie des cellules basales et sécrétrices (Gkonos et al., 1995). De plus, la différenciation neuroendocrine est en général associée à un pronostic clinique défavorable, à une augmentation de l'agressivité et de l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques.

L'une des caractéristiques majeures de l'évolution du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance se traduit par la capacité des cellules à survivre indépendamment du stroma grâce à l'intervention de facteurs non androgéniques. Parmi ces facteurs, les facteurs de croissance tiennent un rôle prépondérant. Il est en effet bien établi que la progression d'une prostate saine vers une prostate cancéreuse, ainsi que l'acquisition de l'androgéno-indépendance, s'accompagnent de modifications de l'expression de ces facteurs ainsi que de leurs récepteurs (Russell et al., 1998). Parmi ces facteurs, l'Insulin like Growth Factor (IGF), le Tumor Necrosis growth Factor-alpha (TNF alpha) et l'Epidermal Growth Factor (EGF) ont particulièrement attiré notre attention.

Outre les facteurs de croissance, les lysophospholipides ont également attirés notre attention car ils représentent de véritables médiateurs de la communication intercellulaire. Comme nous l'avons vu, les LPLs sont impliqués non seulement dans des processus

physiologiques survenant au cours du développement mais également dans des manifestations physiopathologiques (Raynal et al., 2005)

L'originalité de notre travail réside dans le fait que nous n'avons pas étudié les effets des facteurs de croissance et des lysophospholipides sur les processus classiques impliqués dans la croissance cellulaire, mais que nous avons étudié leurs effets sur un acteur clé impliqué dans les processus de prolifération cellulaire, de différenciation neuroendocrine et d'apoptose à savoir l'homéostasie calcique. En effet, il est établi que le Ca^{2+} est un second messenger universel et un facteur clé dans la signalisation intracellulaire impliqué dans beaucoup de mécanismes cellulaires (Berridge et al., 1998). L'origine du calcium, la cinétique et l'amplitude des signaux calciques sont les trois composantes majeures de la régulation des signaux calciques permettant la coordination de nombreuses fonctions cellulaires (Berridge et al., 1998). Ces trois paramètres, orientant la cellule soit vers la prolifération, soit vers la différenciation, soit vers l'apoptose, résultent de la nature du stimulus et de l'intégration des différents signaux calciques. Il est connu que les modulations d'homéostasie calcique sont régulées, d'une part, par la modulation des stocks calciques contenus en particulier dans le réticulum endoplasmique grâce à de nombreuses protéines présentes au sein de celui-ci et, d'autre part, par l'activité de canaux ioniques situés sur la membrane plasmique.

Le but du travail présenté dans cette thèse était donc de mettre en évidence le rôle du Ca^{2+} et du canal TRPV2, acteur de l'homéostasie calcique, dans le contrôle de la croissance et dans l'évolution des cellules cancéreuses prostatiques vers les stades les plus agressifs, ainsi que l'implication du calcium dans le mode d'action des facteurs de croissance impliqués dans le développement des tumeurs prostatiques.

A. IMPLICATION DES RESERVES CALCIQUES INTRACELLULAIRES DANS LA CROISSANCE DES CELLULES PROSTATIQUES ANDROGENO-DEPENDANTES.

Le réticulum endoplasmique, première ressource de calcium intracellulaire, est un compartiment majeur dans la signalisation calcique intracellulaire et dans l'orientation de la cellule vers sa survie ou sa mort. Dans ce cadre, j'ai participé à l'étude du rôle des modifications du taux de calcium du réticulum endoplasmique dans le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP (Humez et al., 2004). Les travaux du laboratoire ont montré que l'apoptose des cellules LNCaP est due exclusivement à la vidange de calcium du réticulum et non pas à l'augmentation de calcium

cytoplasmique consécutive à l'entrée capacitive (Skryma et al., 2000). Nos travaux ont permis de démontrer que l'apoptose induite par la vidange de calcium du réticulum a lieu aussi bien quand cette vidange est transitoire ou continue à condition qu'elle soit de forte amplitude.

Le mécanisme exact qui relie la déplétion des stocks calciques intracellulaires à l'apoptose reste à élucider. Trois hypothèses ont été proposées par He et al., (He et al., 1997) qui ont montré que la déplétion des stocks calciques de cellules de lymphome conduit à l'apoptose : (1) la première hypothèse postule que la déplétion des stocks calciques pourrait déstabiliser les interactions de protéines liées au Ca^{2+} , et qui permettent le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique, provoquant ainsi la vésiculation de la cellule et la formation de corps apoptotiques ; (2) la seconde hypothèse explique l'apoptose induite par la déplétion des stocks calciques par le fait que le maintien d'un taux optimal de Ca^{2+} au sein du réticulum endoplasmique est nécessaire à la synthèse et au transport des protéines (Kuznetsov et al., 1992) ; et (3), la troisième hypothèse postule que la vidange des stocks calciques permettrait la co-libération du Ca^{2+} et d'une endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN. En outre, des travaux ont montré que la déplétion des stocks calciques intracellulaires par la TG induit l'apoptose par l'activation du DR5 (Death Receptor -5), un membre de la famille des TRAILs (TNF-Related Apoptosis Ligand) et des caspases 8 (He et al., 2002).

En ce qui concerne le mécanisme qui relie une modification du contenu des stocks calciques intracellulaires à la prolifération, les données sont fragmentaires. On sait cependant que le réticulum endoplasmique est un élément essentiel à la synthèse protéique, qui dépend de la bonne concentration du contenu calcique de ces stocks (Michalak et al., 1998). Ainsi, des modifications de la concentration calcique du réticulum pourraient avoir des répercussions sur la croissance. En outre, il est connu que la mobilisation des stocks calciques intracellulaires est généralement à l'origine des signaux calciques conduisant la cellule au passage de phases clés du cycle cellulaire. Il est donc raisonnable de postuler que dans le modèle que nous avons étudié, les facteurs mitotiques qui augmentent le contenu mobilisable des stocks calciques intracellulaires, favorisent ce phénomène et stimulent ainsi la prolifération.

Les travaux auxquels j'ai collaboré ont aussi porté sur l'étude des rôles des modifications du taux de calcium réticulaire dans le ralentissement de la croissance (Humez et al., 2004). Nos travaux mettent en évidence qu'une diminution du taux de calcium réticulaire limitée en amplitude et continue conduit à la diminution de la croissance des

cellules LNCaP sans induction de l'apoptose alors qu'une diminution limitée en amplitude mais transitoire ne modifie pas la croissance cellulaire.

Ces mêmes travaux montrent que dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP, les stocks calciques intracellulaires (qui contrôlent prolifération et apoptose), sont la cible des facteurs de croissance impliqués dans le contrôle de ces phénomènes, puisque EGF, IGF-I et TNF-alpha régulent le contenu de ces stocks en modulant l'expression des pompes calciques responsables de leur remplissage (Figure 31). Ces résultats sont en accord avec ceux reportés sur les cellules musculaires lisses, ou il a été montré qu'un autre facteur de croissance, le PDGF, induit la surexpression des protéines SERCAs (Magnier et al., 1992). Cependant, à notre connaissance, notre étude est la première à montrer ce type d'effet sur des cellules non excitables.

Ainsi, nous avons montré que les protéines SERCAs qui remplissent les stocks calciques intracellulaires sont essentielles au bon déroulement de la croissance cellulaire, et que ces protéines sont la cible de facteurs de croissance dont l'expression est modifiée durant la cancérogenèse de la prostate. En effet, au cours de la cancérogenèse de la prostate humaine, les signaux transmis par l'EGF et l'IGF-I sont amplifiés, tandis que les signaux transmis par le TNF-alpha sont réduits, via une modulation des facteurs et de leurs récepteurs respectifs. Sachant que l'EGF et l'IGF-I provoquent une surexpression des protéines SERCA2b, et que le TNF-alpha induit une réduction de leur expression sur ces cellules, il est légitime de penser que ces modifications du profil d'expression des facteurs de croissance provoquent une surexpression des protéines SERCAs, se traduisant par une augmentation du contenu calcique intraréticulaire, et donc, par une stimulation de la croissance cellulaire (Figure 31) (Humez et al., 2004).

Généralement, les facteurs de croissances sont connus pour réguler le taux cytoplasmique de Ca^{2+} , suite à la production d'IP3 qui provoque une vidange réversible des stocks intracellulaires, suivie d'une entrée soutenue de Ca^{2+} *via* le phénomène d'entrée capacitive. D'une part, ces travaux prouvent que l'EGF et l'IGF sont capables d'augmenter le taux de calcium du réticulum *via* l'augmentation de l'expression de l'isoforme 2b de la pompe calcique du réticulum (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) : SERCA2b, d'autre part, ils démontrent qu'un facteur induisant l'apoptose, le TNF alpha, diminue le taux de calcium réticulaire et diminue l'expression des SERCA2b.

En résumé, mes résultats démontrent que des variations du taux de calcium du réticulum conduisent à des modifications de la croissance des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes et décrivent que les facteurs de croissance EGF, IGF, TNFalpha

modulent la croissance cellulaire *via* des modifications de l'homéostasie calcique. Ces résultats ont un caractère particulièrement original car ils montrent le rôle majeur de la concentration luminale en calcium du réticulum dans le phénomène de croissance des cellules cancéreuses (Figure 31).

B. REGULATION ET ROLE DES RESERVES CALCIQUES INTRACELLULAIRES DANS LES CELLULES ANDROGENO-INDEPENDANTES (DU145).

Les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes sont caractérisées par leur faible taux de prolifération : 95 % de ces cellules sont à l'état de quiescence en phase G₀ (Berges et al., 1995) ce qui explique la non efficacité des traitements chimiothérapeutiques classiques sur ce cancer.

Ces cellules ont en outre acquis la capacité d'être résistante aux traitements anti androgéniques classiques qui provoquent habituellement l'apoptose des cellules prostatiques, et sont donc responsables de l'échappement thérapeutique de ce cancer. Il apparaît donc primordial d'élucider le mécanisme par lequel ces cellules deviennent résistantes à l'apoptose induite par la privation androgénique.

Ayant montré le rôle crucial joué par les stocks calciques intracellulaires dans le contrôle de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP, nous nous sommes naturellement intéressé au rôle potentiel joué par l'homéostasie calcique dans le contrôle de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes DU145.

Mes travaux ont montré que les signaux calciques qui induisent l'apoptose des cellules androgéno-indépendantes DU145 sont radicalement différents de ceux observés dans les cellules androgéno-dépendantes (Humez et al., 2006). En effet, nous avons montré que l'apoptose des cellules DU145 peut être induite par la vidange des réserves calciques mais aussi grâce à l'augmentation de calcium cytoplasmique. Ces travaux décrivent que l'amplitude et la durée de l'influx calcique sont les facteurs majeurs qui régulent le taux d'apoptose.

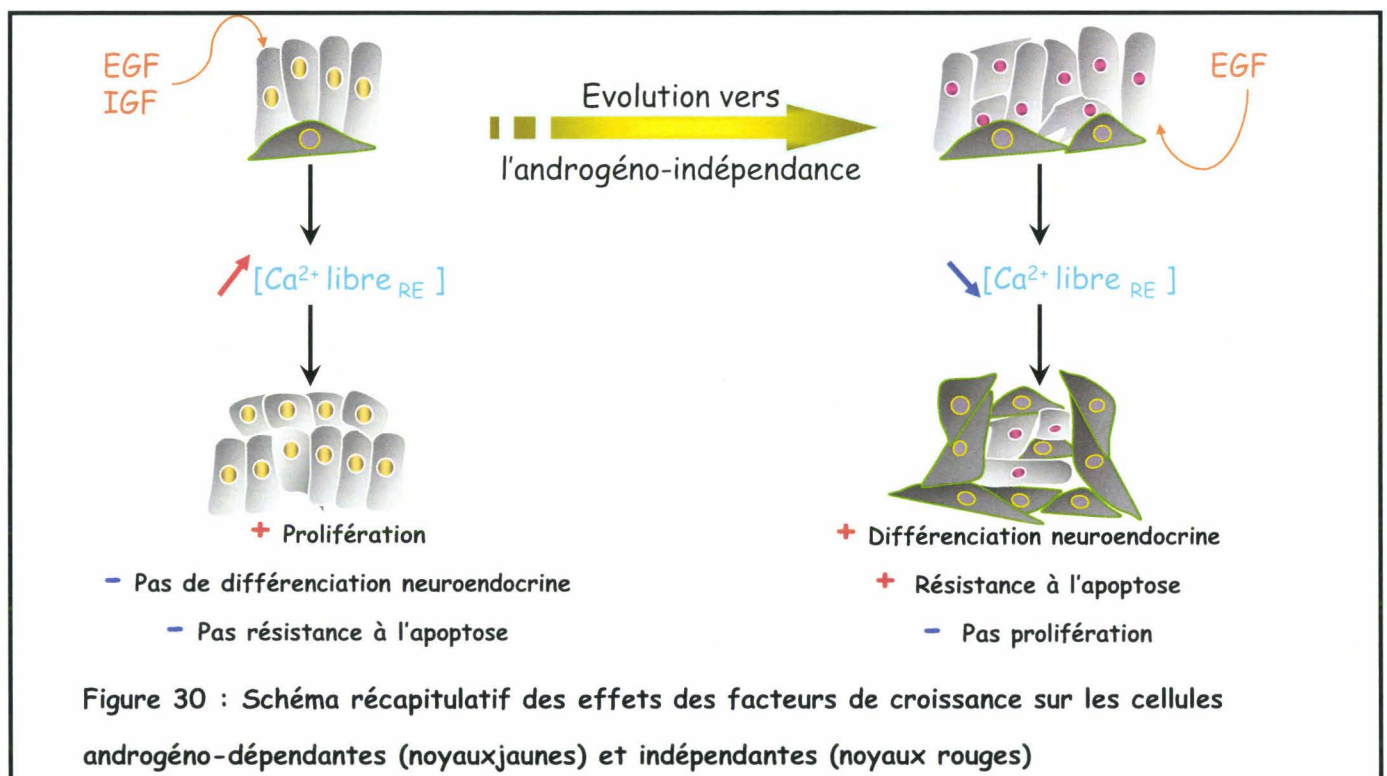
Ces résultats sont en accord avec les travaux de Wang et al. (Wang and Wong, 1998) montrant que sur ces cellules, une augmentation du taux de Ca²⁺ cytoplasmique peut induire l'apoptose. En outre, ce résultat est compatible avec les données observées sur la lignée cellulaire de rat AT3, par Tombal et al. (Tombal et al., 2000) qui montre que chez l'animal, l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes nécessite

une entrée secondaire de Ca^{2+} , retardée de plusieurs heures, suite à la déplétion des stocks calciques intracellulaires.

Mes travaux ont également mis en évidence qu'un traitement par l'EGF est capable de protéger les cellules DU145 de l'apoptose induite par une surcharge calcique (Figure 30). Nous avons observé une réduction de la quantité de calcium libérable par le réticulum endoplasmique ainsi qu'une réduction de sa vitesse de libération suite au même traitement. Ces résultats mettent en avant que le changement du mode d'action des facteurs de croissance, en l'occurrence l'EGF, sur l'homéostasie ionique est lié à l'acquisition de l'androgéno-indépendance (Humez et al., 2006).

De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois comme le montre la figure 31, qu'en plus d'induire des modulations de la calcémie réticulaire, le traitement par l'EGF induit la transdifférenciation des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes DU145 en induisant une différenciation morphologique et la surexpression d'un marqueur de différenciation neuroendocrine : la Neuron Specific Enolase (NSE) (Humez et al., 2006).

Ces dernières observations apportent, pour la première fois, la preuve expérimentale de l'hypothèse avancée par Zelivianski et al., (Zelivianski et al., 2001) selon laquelle les cellules neuroendocrines de la prostate pourraient provenir de la transdifférenciation de cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes. Compte tenu du rôle capital de la différenciation neuroendocrine dans l'augmentation de l'agressivité des tumeurs de la prostate, nos résultats montrant que celle-ci puisse être induite par l'EGF sont très novateurs.



C. REGULATION ET ROLE DU CANAL TRPV2 DANS LES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES.

Outre l'implication du réticulum endoplasmique dans la différenciation neuroendocrine, il est également connu que les canaux ioniques transmembranaires régulent la calcémie cellulaire et qu'ils peuvent être impliqués dans la différenciation neuroendocrine. Parmi les canaux ioniques transmembranaires, de nombreuses études suggèrent que la famille des canaux cationiques non voltage-dépendants de type TRP (Transient Receptor Potential) constitue un élément majeur de l'homéostasie calcique.

La famille des TRP est divisée en sept groupes : trois historiques avec les TRPC, TRPM et TRPV et quatre plus récemment découverts avec les TRPP, TRPML, TRPA et TRPN. Tous ces canaux présentent des fonctions très diverses et certains d'entre eux sont dérégulés dans des pathologies comme TRPM1 dans le mélanome et TRPM5 dans le syndrome de Beckwith-Wiedman (Clapham and Montell, 2002). De plus, les travaux du laboratoire ont montré que le canal TRPM8 était spécifiquement régulé par le récepteur aux androgènes dans les cellules épithéliales sécrétrices cancéreuses prostatiques humaines (Bidaux et al., 2005).

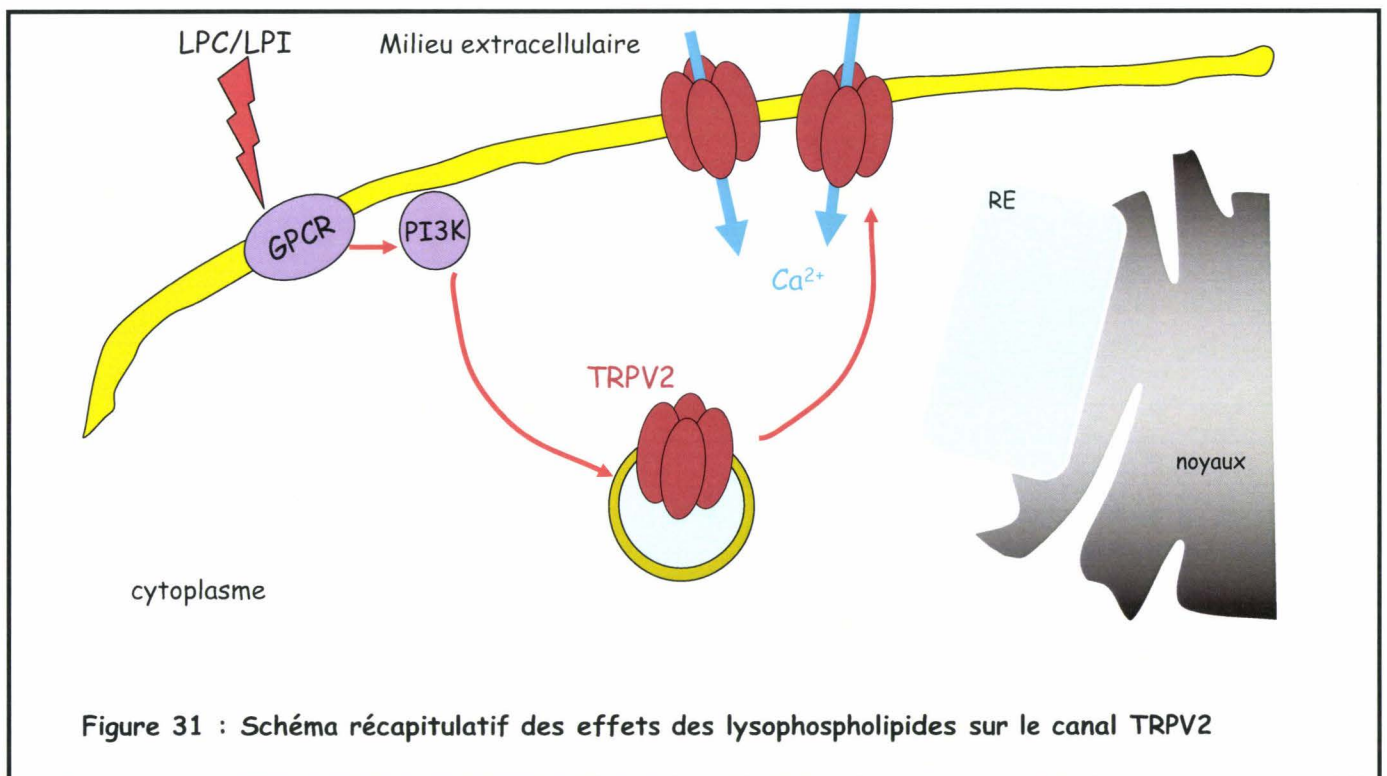
Beaucoup d'éléments de régulation des canaux TRPV ont été identifiés ces dernières années. « Une exception remarquable » à cela est le canal à sélectivité calcique TRPV2 (TRP Vanilloid 2) pour lequel nombre d'évènements cellulaires en lien avec sa régulation sont toujours sujet à débat. Il a été montré qu'une température supérieure à 52°C (Kanzaki et al., 1999) et que le 2APB (Hu et al., 2004) induisait l'activation de ce canal. De plus, ce canal, qualifié de « sensor thermique » des fibres nerveuses sensibles, est exprimé dans de nombreux tissus dont la prostate. De manière physiologique, ni une telle température, ni le 2APB ne peuvent être considérés comme des activateurs pour les organes exprimant ce canal, dont la prostate fait partie, ce qui laisse posée la question du ou des activateur(s) physiologique(s) du canal TRPV2. Enfin, il a été montré que cette activation par la température ou par le 2APB n'était observable que dans les modèles non humains du canal TRPV2 (Neeper et al., 2007) ce qui posait le problème de l'activateur commun aux différentes formes du canal TRPV2.

A ces questions, mes travaux ont en partie répondues en montrant que les différentes formes du canal TRPV2 peuvent être activées par les lysophospholipides LPC et LPI, éléments physiologiques contenus dans le sérum circulant de l'organisme (Figure 31) (Monet et al., en préparation). Ces molécules pour lesquelles une famille de récepteurs couplés aux

protéines G a été identifiée sont biologiquement assimilables à des facteurs de croissance et cytokines. Ainsi, nous avons également montré que les lysophospholipides activaient TRPV2 par les voies des protéines G et de la PI3 kinase en induisant la translocation du canal vers la membrane plasmique. Nos travaux en collaboration montrent donc deux mécanismes d'activation différents du canal TRPV2:

- L'un montrant que la voie PI3-kinase favorise l'activité du canal TRPV2 murin indépendamment de la translocation du canal à la membrane plasmique (Penna et al., 2006). Dans ce cas, nous avons pu observer que l'activité constitutive de ce canal était corrélée à un taux de calcium cytoplasmique plus élevé que la normale.

- L'autre mécanisme représenté en figure 31 montre que les lysophospholipides via la voie PI3 kinase permettent l'activation et la translocation des canaux TRPV2 murin et humain vers la membrane plasmique (Monet et al., en préparation).



Il a été décrit que les lysophospholipides constituent des facteurs mitogéniques prostatiques majeurs et qu'à ce titre, ils sont impliqués dans un ensemble de processus cellulaires dont la régulation de l'homéostasie calcique, la pathogenèse, la motilité et l'invasion des cancers de la prostate et des ovaires (Chun et al., 1999; Moolenaar, 1999; Spiegel and Milstien, 2003). De plus, le canal TRPV2 alors nommé GRC a été détecté en coexpression avec la chromogranine A, un marqueur de la différenciation neuroendocrine dans les cellules prostatiques (Kowase et al., 2002).

De manière intéressante, mes derniers travaux ont permis d'observer comme le montre la figure 32 dans les cellules cancéreuses androgéno-dépendantes LNCaP que la différenciation neuroendocrine était corrélée à une surexpression du canal calcique transmembranaire TRPV2 (Monet et al., en préparation). De plus, nous avons montré que ce canal voit son expression fortement augmentée dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP C4-2, dérivées des LNCaP mais avec un phénotype androgéno-indépendant et dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes DU145 et PC3. Son expression semble être corrélée avec l'avancement du cancer de la prostate puisque il est détecté dans les cellules cancéreuses androgéno-indépendantes prostatiques LNCaP C4-2, DU145 et PC3 mais pas dans les cellules androgéno-dépendantes LNCaP. Mes travaux ont montré que la présence de ce canal était corrélée à un taux de calcium cytoplasmique plus élevé par rapport aux cellules qui n'expriment pas TRPV2 (Figure 32). Enfin, mes résultats prouvent que l'abolition de l'expression de TRPV2 par des siRNA spécifiquement dirigés contre ce canal et transfectés dans les cellules exprimant TRPV2 est corrélée à une diminution d'expression du marqueur neuroendocrine NSE ainsi qu'à une diminution du taux de calcium cytoplasmique basal.

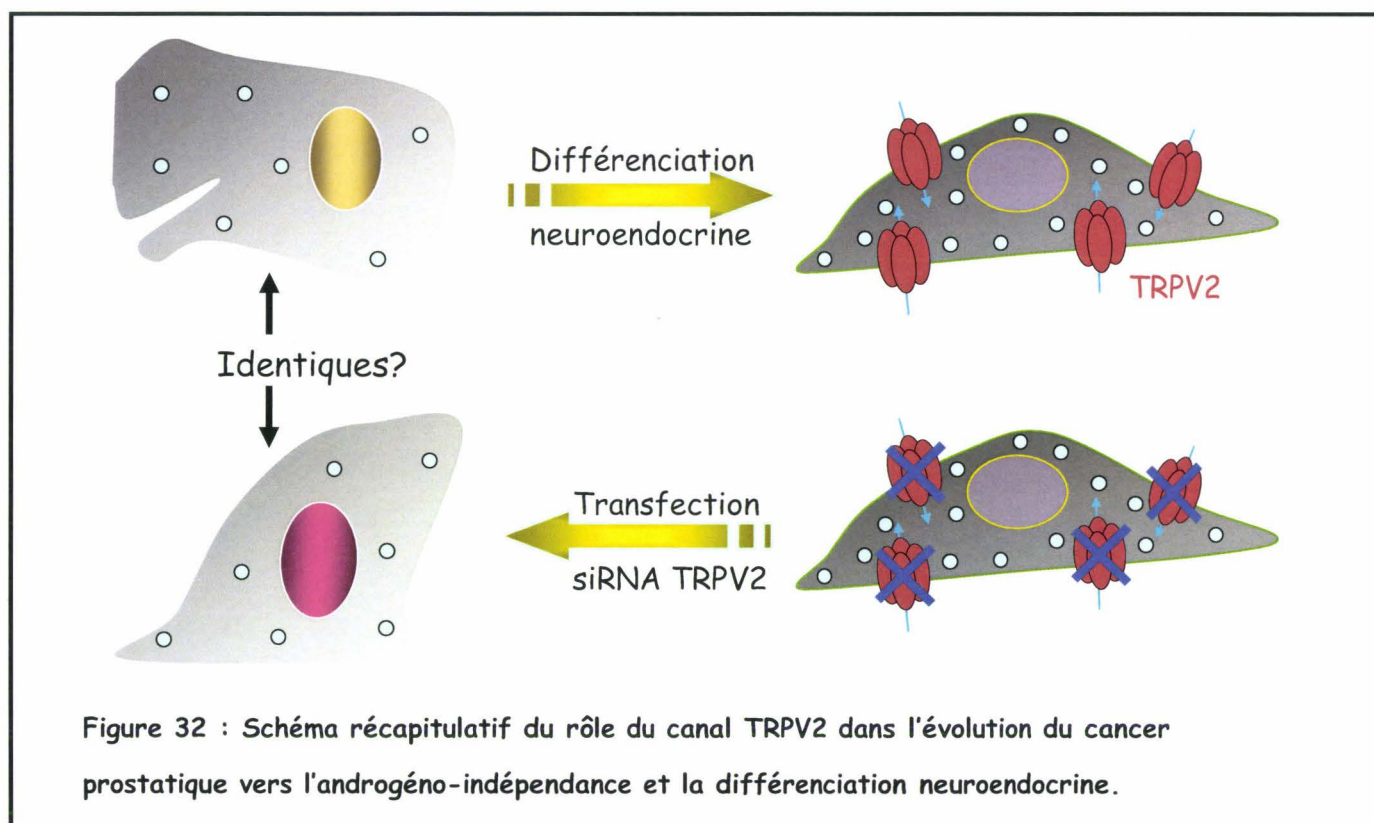


Figure 32 : Schéma récapitulatif du rôle du canal TRPV2 dans l'évolution du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance et la différenciation neuroendocrine.

II. EVOLUTION DU PROJET ENVISAGE

Les hypothèses découlant de ces travaux sont nombreuses et diverses perspectives sont envisagées concernant les facteurs de croissance d'une part et le canal TRPV2 d'autre part dans la prostate. Je finirai donc cette thèse par la description de nos résultats préliminaires et des recherches en projet.

A. FACTEURS DE CROISSANCE ET PROTEINES REGULANT L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE DES CELLULES PROSTATIQUES.

Nous avons observé que les facteurs de croissances et plus particulièrement l'EGF induisent la prolifération des cellules LNCaP en augmentant la quantité de calcium libérable par les stocks calciques réticulaires et en augmentant l'expression de pompes calciques de type P : les SERCA. Nos résultats ont également montré qu'en plus d'induire la différenciation neuroendocrine, l'EGF protège les cellules DU145 de l'apoptose en réduisant l'amplitude de l'influx calcique provoqué par l'activation de l'ECC suite à la vidange des stocks intracellulaires.

Il est vraisemblable de penser que ces effets sont du à la propriété de ces facteurs de croissance, de moduler l'expression de protéines qui interviennent soit dans l'effet prolifératif pour les LNCaP, soit dans l'effet différenciateur et/ou antiapoptotique pour les DU145. En ce sens, il apparaît nécessaire d'étudier les effets de ces facteurs de croissance sur des protéines qui peuvent moduler les stocks calciques intracellulaires ainsi que l'influx capacitif, et notamment les canaux calciques eux-mêmes, les PMCA et les protéines chélatrices.

1. Effet des facteurs de croissance sur les TRP

Parmi les différents types de canaux calciques pouvant être impliqués dans la prolifération et/ou l'induction de l'ECC, la famille des canaux TRP présente un nombre élevé de candidats (Thebault et al., 2005b; Wang and Shao, 2001). De plus, les canaux TRP sont présents sur la membrane plasmique comme sur la membrane réticulaire (Bidaux et al., 2007; Seth et al., 2004). Il est possible qu'en fonction du type cellulaire et de l'état d'avancement dans le cancer, les facteurs de croissance réduisent la densité des canaux exprimés, ou provoque l'expression de nouveaux types de canaux TRP dans ces cellules, et que ces modifications conduisent à une augmentation de la vidange des stocks calciques dans le cas des LNCaP et, à l'inverse, à une diminution de la vidange des stocks calciques et/ou à un influx capacitif réduit dans les DU145.

Il paraît donc nécessaire d'étudier l'évolution de la densité des canaux calciques membranaires en utilisant la technique électrophysiologique de patch clamp, et d'étudier l'expression des canaux calciques de type TRP par western blot et immunocytochimie, de cellules traitées ou non par des facteurs de croissance.

Dans ce sens, des travaux sont actuellement menés au sien du laboratoire pour étudier l'évolution de l'expression de canaux TRP suite aux traitements par les facteurs de croissance EGF et IGF-1.

2. Effet des facteurs de croissance sur les PMCA

Nous avons montré que la durée de l'influx calcique, en plus de l'amplitude de celui-ci, est un facteur régulant l'apoptose des cellules DU145. Il serait intéressant d'étudier l'effet des facteurs de croissance sur l'expression des PMCA sur ces cellules. En effet, une surexpression de ces pompes calciques de la membrane plasmique se traduirait par une expulsion plus rapide du Ca^{2+} suite à l'influx capacitif, et donc à une durée réduite de l'influx calcique, ce qui pourrait expliquer le faible taux d'apoptose inductible par la TG sur des cellules traitées à l'EGF.

Ces pompes pourraient être des cibles potentielles des facteurs de croissance dans la mesure où nous avons montré sur la lignée LNCaP que ce même facteur de croissance stimule l'expression des SERCA. Cependant, nous avons observé pour les DU145, que l'EGF ne modulait pas l'expression de la protéine SERCA2b, contrairement à ce que nous avons montré sur les cellules LNCaP.

3. Effet des facteurs de croissance sur les protéines chélatrices

Comme nous l'avons vu, les protéines chélatrices sont également en charge de la régulation de l'homéostasie calcique et, à ce titre, elles représentent des cibles potentielles des facteurs de croissance. La modulation de l'expression de ces protéines comme la calréticuline (Szperl and Opas, 2005), qui chélate le Ca^{2+} au sein du réticulum endoplasmique, permettrait de moduler la quantité de calcium libérable par les stocks calciques réticulaires et in fine de moduler l'entrée de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire.

L'étude de l'effet des facteurs de croissance sur les protéines chélatrices semble donc nécessaire pour savoir si par exemple l'EGF modifie différemment l'expression de ces protéines lors de son effet prolifératif sur les LNCaP d'une part et de son effet différenciateur sur les DU145 d'autre part. Il est à noter que nos travaux préliminaires sur la protéine calréticuline dans les DU145 différenciées n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse.

B. TRPV2 ET PATHOLOGIES.

1. Lysophospholipides et TRPV2 dans la prostate

Nos travaux ont montré que le canal TRPV2 était activé par des agonistes physiologiques : les LPLs. De plus, nous avons également montré que ce canal était corrélé à l'agressivité du cancer prostatique car il est présent dans les cellules différenciées neuroendocrines et dans les cellules androgéno-indépendantes cancéreuses prostatiques. Comme nous l'avons cité dans l'introduction, les LPLs ont une action indirecte en se fixant sur un récepteur ou directe en activant des canaux calciques par exemple. Il est suggéré que les LPLs peuvent stimuler la prolifération, survie et migration de diverses cellules tumorales (Goetzl et al., 2002). De plus, ils sont connus pour être dérégulés en cas de cancer dont celui de la prostate (Raynal et al., 2005). Il serait donc intéressant de savoir si les LPLs peuvent activer les canaux TRPV2 endogènes exprimés dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes et neuroendocrines et de déterminer l'influence de cette activation potentielle sur les processus physiologiques des cellules.

Mes résultats répondent en partie à cette question en montrant que les LPLs et plus précisément les LPC et LPI induisent une entrée de Ca^{2+} via TRPV2 dans les cellules androgéno-indépendantes PC3. De plus, mes travaux préliminaires non présentés dans ce manuscrit montrent que les LPLs induisent une entrée calcique depuis le milieu extracellulaire pour les cellules neuroendocrines et androgéno-indépendantes exprimant TRPV2. Cette entrée est abolie lors de la transfection des cellules avec le siRNA TRPV2. Enfin, les premières expériences réalisées sur les cellules issues de la culture primaire et transfectées avec un siRNA CTL montrent une entrée de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire, entrée qui n'est pas retrouvée pour les cellules transfectées avec le siRNA TRPV2.

Les LPLs induisent donc une entrée de Ca^{2+} via les canaux TRPV2 endogènes exprimés par les cellules cancéreuses prostatiques. Cependant, il reste à définir l'impact de cette entrée de Ca^{2+} sur la migration, la survie et/ou la prolifération des cellules neuroendocrines, des lignées androgéno-indépendantes et des cellules issues de culture primaires.

La seconde partie des recherches sur les LPLs et TRPV2 dans la prostate consistera à définir le mode d'action et plus précisément les acteurs intracellulaires permettant l'activation de TRPV2 par les LPLs. Comme nous l'avons présenté dans les résultats, les LPLs activent un récepteur couplé aux protéines G pour induire la translocation et l'activation des canaux TRPV2. Cependant, nous ne connaissons pas précisément le type de protéines G nécessaire à

la transmission de cet effet. Il serait donc nécessaire de cribler les différentes protéines G pour connaître celle impliquée dans l'activation de TRPV2. Pour se faire, nous utiliserons une stratégie de siRNA dirigée contre les différents types de protéines G que nous transfecterons dans les cellules exprimant TRPV2 et qui sont activées par les LPLs. Des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec le Dr Baneres à Montpellier montrent que la protéine Gi n'intervient pas dans la voie d'activation de TRPV2 par les LPLs.

2. TRPV2 dans l'urothélium et le foie

Comme nous l'avons vu, les canaux TRP, et plus particulièrement TRPV2, tiennent une place importante dans le cancer de la prostate. Dans le but d'étendre nos recherches à d'autres cancers et de confirmer l'impact des canaux TRP dans le cancer en général, des recherches menées au laboratoire porte sur les cancers urothélial et hépatique.

De récentes études montrent que l'urothélium possède des propriétés sensorielles et signalétiques qui leur permettent de répondre à leur environnement (chimique et physique) et d'engager une communication chimique réciproque avec les cellules nerveuses qui les avoisine (Andersson, 2002; Moore and Goldman, 2006). Il apparaît également que les mécanismes qui régulent l'activité du calcium intracellulaire dans les cellules urothéliales soient des acteurs clé dans la signalétique urothéliale. En effet, les canaux TRP présent sur les cellules urothéliales semble impliqués dans les réponses de l'urothélium face aux stimuli mécaniques ou chimiques. L'urothélium exprime des canaux TRP thermosensibles dont le canal TRPV2. La localisation du signal calcique, son amplitude et sa cinétique constituent la signature calcique. L'implication des canaux TRP urothéliaux dans la signature calcique urothéliale et la nature exacte de la signature calcique impliquée dans la physiopathologie urothéliale restent encore à définir.

Quels sont les mécanismes exacts à la base de l'activation des TRP présents sur l'urothélium ?

Quelle place tiennent ces différents TRP dans le signal afférent émis par l'urothélium ?

Quel est le rôle de ces TRP dans la communication réciproque urothélium/vessie ?

Quelles sont les modifications de la signature calcique impliquées lors de l'instabilité vésicale ?

Si l'heure actuelle l'expression de TRPV1 et son rôle dans les informations afférentes sont bien documenté (Avelino and Cruz, 2006) ce n'est absolument pas le cas des autres TRP. Nous proposons donc une étude axée sur l'implication des canaux et plus particulièrement de TRPV2 dans l'urothélium.

Outre l'urothélium, des travaux préliminaires menés au laboratoire montrent que le foie humain sain exprime les ARNm codant pour 3 TRPV: V1, V2 et V4. Alors que TRPV1 et V4 sont détectés à un niveau d'expression similaire dans les foies sains et tumoraux, une surexpression des ARNm codant pour TRPV2 dans les foies malades est observée. Il reste donc à définir l'implication du canal TRPV2 hépatique dans la signature calcique hépatique et la nature exacte de la signature calcique impliquée dans la physiopathologie hépatique.

Quels sont les mécanismes exacts à la base de l'activation de TRPV2 hépatique ?

Quel est le rôle de TRPV2 dans la physiologie hépatique ?

Quelles sont les modifications de la signature calcique impliquées lors des pathologies hépatiques?

***Publications personnelles
et Références
bibliographiques***

I. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

A. PUBLICATIONS

Monet M, Lehen'kyi V, Roudbaraki M, Bidaux G, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Rassendren F, Humez S, Prevarskaya N. TRPV2 channel is involved in neuroendocrine differentiation and androgen-independence of human prostate cancer cells. (en préparation).

Monet M, Gkika D, Pourtier A, Lehen'kyi V, Bidaux G, Juvin V, Rassendren F, Humez S, Prevarskaya N. Lysophospholipids sensing by TRPV2 calcium channel. (en préparation).

Monet M, Mariot P, Oulidi A, Humez S. The Role of ATP in basal growth on androgen-independent cancer cells. (en préparation).

Penna A, Juvin V, Chemin J, Compan V, **Monet M** and Rassendren FA. PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane. *Cell Calcium*, 2006. 39(6):495-507.

Humez S, **Monet M**, Delcourt P, Prevarskaya N. EGF induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocrine Related Cancer*, 2006.; 13 (1):181-95.

Humez S, **Monet M**, van Coppenolle F, Delcourt P, Prevarskaya N. The role of intracellular pH in cell growth arrest induced by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Dec;287(6):C1733-46

Humez S, Legrand G, Vanden-Abeele F, **Monet M**, Marchetti P, Lepage G, Crepin A, Dewailly E, Wuytack F, and Prevarskaya N. Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNFalpha. *J Cell Physiol* 2004.201(2):201-13.

B. COMMUNICATIONS

Michaël Monet, Sandrine Humez, Gabriel Bidaux, V'yacheslav Lehen'kyi, François Rassendren et Natalia Prevarskaya. *Implication of TRP-V2 calcium channel in neuroendocrine differentiation in human prostate cancer*. 17th Ion Channel Meeting. Presqu'île de Giens –France 17 au 20 septembre 2006.

Michaël Monet, Sandrine Humez, François Rassendren, Thierry Capiod, Gabriel Bidaux, Alexandre Crepin et Natalia Prevarskaya. *Implication du canal calcique TRP-V2 dans la différenciation neuroendocrine du cancer de la prostate humaine*. Journée André Verbert Ecole Doctorale Biologie et Santé Lille-France 28 Septembre 2005.

II REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* 39, 135-148.
- Abrahamsson, P. A., Cockett, A. T., and di Sant'Agnese, P. A. (1998). Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Suppl* 8, 37-42.
- Abrahamsson, P. A., Dizeyi, N., Alm, P., di Sant'Agnese, P. A., Deftos, L. J., and Aumuller, G. (2000). Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *Prostate* 44, 181-186.
- Abrahamsson, P. A., Wadstrom, L. B., Alumets, J., Falkmer, S., and Grimelius, L. (1986). Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands. *Pathol Res Pract* 181, 675-683.
- Aggarwal, B. B., Sethi, G., Ahn, K. S., Sandur, S. K., Pandey, M. K., Kunnumakkara, A. B., Sung, B., and Ichikawa, H. (2006). Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci* 1091, 151-169.
- Akerstrom, G., Hellman, P., Hessman, O., and Osmak, L. (2005). Management of midgut carcinoids. *J Surg Oncol* 89, 161-169.
- Alexander, S. P., Mathie, A., and Peters, J. A. (2007). Guide to Receptors and Channels, 2nd edition (2007 Revision). *Br J Pharmacol* 150 Suppl 1, S1.
- Allsbrook, W. C., Jr., and Simms, W. W. (1992). Histochemistry of the prostate. *Hum Pathol* 23, 297-305.
- Alroy, I., and Yarden, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410, 83-86.
- Alvarez, R. H., Kantarjian, H. M., and Cortes, J. E. (2006). Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc* 81, 1241-1257.
- 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.
- An, S., Zheng, Y., and Bleu, T. (2000). Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem* 275, 288-296.
- Andersson, D. A., Nash, M., and Bevan, S. (2007). Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* 27, 3347-3355.
- Andersson, K. E. (2002). Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 59, 43-50.
- Andriole, G., Bruchovsky, N., Chung, L. W., Matsumoto, A. M., Rittmaster, R., Roehrborn, C., Russell, D., and Tindall, D. (2004). Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 172, 1399-1403.
- Anliker, B., and Chun, J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279, 20555-20558.
- Aoki, J., Inoue, A., Makide, K., Saiki, N., and Arai, H. (2007). Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89, 197-204.

- Aprikian, A. G., Cordon-Cardo, C., Fair, W. R., and Reuter, V. E. (1993). Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma. *Cancer* 71, 3952-3965.
- Arnaudeau, S., Frieden, M., Nakamura, K., Castelbou, C., Michalak, M., and Demaurex, N. (2002). Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* 277, 46696-46705.
- Asaoka, Y., Yoshida, K., Sasaki, Y., Nishizuka, Y., Murakami, M., Kudo, I., and Inoue, K. (1993). Possible role of mammalian secretory group II phospholipase A2 in T-lymphocyte activation: implication in propagation of inflammatory reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 716-719.
- Aumuller, G., Leonhardt, M., Janssen, M., Konrad, L., Bjartell, A., and Abrahamsson, P. A. (1999). Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* 53, 1041-1048.
- Aumuller, G., Leonhardt, M., Renneberg, H., von Rahden, B., Bjartell, A., and Abrahamsson, P. A. (2001). Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate* 46, 108-115.
- Avelino, A., and Cruz, F. (2006). TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373, 287-299.
- Babaian, R. J., Mettlin, C., Kane, R., Murphy, G. P., Lee, F., Drago, J. R., and Chesley, A. (1992). The relationship of prostate-specific antigen to digital rectal examination and transrectal ultrasonography. Findings of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. *Cancer* 69, 1195-1200.
- Baillargeon, J., and Rose, D. P. (2006). Obesity, adipokines, and prostate cancer (review). *Int J Oncol* 28, 737-745.
- Baltogiannis, D., Giannakopoulos, X., Charalabopoulos, K., and Sofikitis, N. (2004). Monotherapy in advanced prostate cancer: an overview. *Exp Oncol* 26, 185-191.
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J., and Patapoutian, A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41, 849-857.
- Bang, S., Kim, K. Y., Yoo, S., Lee, S. H., and Hwang, S. W. (2007). Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci Lett* 425, 120-125.
- 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.
- Barnhill, J. C., Stokes, A. J., Koblan-Huberson, M., Shimoda, L. M., Muraguchi, A., Adra, C. N., and Turner, H. (2004). RGA protein associates with a TRPV ion channel during biosynthesis and trafficking. *J Cell Biochem* 91, 808-820.
- Battaglia, S., Casali, A. M., and Botticelli, A. R. (1994). Age-related distribution of endocrine cells in the human prostate: a quantitative study. *Virchows Arch* 424, 165-168.
- Beato, M., and Sanchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17, 587-609.
- Beech, D. J., Muraki, K., and Flemming, R. (2004). Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *J Physiol* 559, 685-706.
- Bender, F. L., Mederos, Y. S. M., Li, Y., Ji, A., Weihe, E., Gudermann, T., and Schafer, M. K. (2005). The temperature-sensitive ion channel TRPV2 is endogenously expressed and functional in the primary sensory cell line F-11. *Cell Physiol Biochem* 15, 183-194.
- Benham, C. D., Davis, J. B., and Randall, A. D. (2002). Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 42, 873-888.

- Benham, C. D., Gunthorpe, M. J., and Davis, J. B. (2003). TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 33, 479-487.
- Berger, A., Cultaro, C. M., Segal, S., and Spiegel, S. (1998). The potent lipid mitogen sphingosylphosphocholine activates the DNA binding activity of upstream stimulating factor (USF), a basic helix-loop-helix-zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 1390, 225-236.
- Berges, R. R., Vukanovic, J., Epstein, J. I., CarMichel, M., Cisek, L., Johnson, D. E., Veltri, R. W., Walsh, P. C., and Isaacs, J. T. (1995). Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1, 473-480.
- Berridge, M. J. (1986). Regulation of ion channels by inositol trisphosphate and diacylglycerol. *J Exp Biol* 124, 323-335.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- Berridge, M. J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* 17, 491-500.
- Berridge, M. J. (1996). Microdomains and elemental events in calcium signalling. *Cell Calcium* 20, 95-96.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* 395, 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.
- Bidaux, G., Flourakis, M., Thebault, S., Zholos, A., Beck, B., Gkika, D., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., *et al.* (2007). Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest* 117, 1647-1657.
- 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.
- Birnbaumer, L., Yildirim, E., and Abramowitz, J. (2003). A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium* 33, 419-432.
- Blaschko, H., Comline, R. S., Schneider, F. H., Silver, M., and Smith, A. D. (1967). Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* 215, 58-59.
- 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.
- Bobe, R., Bredoux, R., Wuytack, F., Quarck, R., Kovacs, T., Papp, B., Corvazier, E., Magnier, C., and Enouf, J. (1994). The rat platelet 97-kDa Ca²⁺ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 protein. *J Biol Chem* 269, 1417-1424.
- Boels, K., Glassmeier, G., Herrmann, D., Riedel, I. B., Hampe, W., Kojima, I., Schwarz, J. R., and Schaller, H. C. (2001). The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca²⁺-permeable channel GRC. *J Cell Sci* 114, 3599-3606.
- 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.

Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1994). The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 24, 114-118.

Bootman, M. D., and Berridge, M. J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83, 675-678.

Brandl, C. J., deLeon, S., Martin, D. R., and MacLennan, D. H. (1987). Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 262, 3768-3774.

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.

Breslow, R. A., and Weed, D. L. (1998). Review of epidemiologic studies of alcohol and prostate cancer: 1971-1996. *Nutr Cancer* 30, 1-13.

Britsch, S. (2007). The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190, 1-65.

Bubendorf, L., Sauter, G., Moch, H., Schmid, H. P., Gasser, T. C., Jordan, P., and Mihatsch, M. J. (1996). Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol* 178, 437-441.

Buchanan, G., Irvine, R. A., Coetzee, G. A., and Tilley, W. D. (2001). Contribution of the androgen receptor to prostate cancer predisposition and progression. *Cancer Metastasis Rev* 20, 207-223.

Budnik, L. T., and Mukhopadhyay, A. K. (2002). Lysophosphatidic acid and its role in reproduction. *Biol Reprod* 66, 859-865.

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.

Canene-Adams, K., Lindshield, B. L., Wang, S., Jeffery, E. H., Clinton, S. K., and Erdman, J. W., Jr. (2007). Combinations of tomato and broccoli enhance antitumor activity in dunning r3327-h prostate adenocarcinomas. *Cancer Res* 67, 836-843.

Capper, E. A., and Marshall, L. A. (2001). Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res* 40, 167-197.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.

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.

Cecio, A., Cocca, T., Masotti, M. T., La Mura, E., and Vittoria, A. (1993). CCK-containing paraneurons in human adenomatous prostate. *Biosci Rep* 13, 251-258.

Chisolm, G. M., 3rd, and Chai, Y. (2000). Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic Biol Med* 28, 1697-1707.

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.

- Chun, J., Contos, J. J., and Munroe, D. (1999). A growing family of receptor genes for lysophosphatidic acid (LPA) and other lysophospholipids (LPs). *Cell Biochem Biophys* 30, 213-242.
- Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M. J. (2004). 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24, 5177-5182.
- Citri, A., Alroy, I., Lavi, S., Rubin, C., Xu, W., Grammatikakis, N., Patterson, C., Neckers, L., Fry, D. W., and Yarden, Y. (2002). Drug-induced ubiquitylation and degradation of ErbB receptor tyrosine kinases: implications for cancer therapy. *Embo J* 21, 2407-2417.
- Citri, A., Kochupurakkal, B. S., and Yarden, Y. (2004). The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* 3, 51-60.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 505-516.
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.
- Clapham, D. E., and Montell, C. (2002). The TRP ion channel family. *IUPHAR Compendium TRP Channels* July 10.
- 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.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-446.
- Cochran, B. H. (1993). Regulation of immediate early gene expression. *NIDA Res Monogr* 125, 3-24.
- Cockett, A. T., di Sant'Agnesse, P. A., Gopinath, P., Schoen, S. R., and Abrahamsson, P. A. (1993). Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. *Urology* 42, 512-519.
- Cohen, M. K., Arber, D. A., Coffield, K. S., Keegan, G. T., McClintock, J., and Speights, V. O., Jr. (1994). Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression. *Cancer* 74, 1899-1903.
- Cohen, R. J., Glezeron, G., and Haffejee, Z. (1991). Neuro-endocrine cells--a new prognostic parameter in prostate cancer. *Br J Urol* 68, 258-262.
- Cohen, R. J., Glezeron, G., Taylor, L. F., Grundle, H. A., and Naude, J. H. (1993). The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *J Urol* 150, 365-368.
- 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.
- Connolly, J. M., and Rose, D. P. (1989). Secretion of epidermal growth factor and related polypeptides by the DU 145 human prostate cancer cell line. *Prostate* 15, 177-186.
- Connolly, J. M., and Rose, D. P. (1990). Production of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha by the androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cell line. *Prostate* 16, 209-218.
- Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., and Chun, J. (2000). Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13384-13389.

- 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.
- Cox, M. E., Deeble, P. D., Lakhani, S., and Parsons, S. J. (1999). Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res* 59, 3821-3830.
- Crabtree, G. R. (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem* 276, 2313-2316.
- Crawford, E. D. (1989). Combined androgen blockade. *Urology* 34, 22-26; discussion 46-56.
- Croset, M., Brossard, N., Polette, A., and Lagarde, M. (2000). Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J* 345 Pt 1, 61-67.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Hittmair, A., Zhang, J., Thurnher, M., Bartsch, G., and Klocker, H. (1996). Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* 28, 392-405.
- Cunha, G. R., Donjacour, A. A., Cooke, P. S., Mee, S., Bigsby, R. M., Higgins, S. J., and Sugimura, Y. (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8, 338-362.
- Cussenot, O., Villette, J. M., Cochand-Priollet, B., and Berthon, P. (1998). Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Suppl* 8, 43-51.
- Cutz, E. (1982). Neuroendocrine cells of the lung. An overview of morphologic characteristics and development. *Exp Lung Res* 3, 185-208.
- Daaka, Y. (2002). Mitogenic action of LPA in prostate. *Biochim Biophys Acta* 1582, 265-269.
- de Laat, S. W., Boonstra, J., Defize, L. H., Kruijer, W., van der Saag, P. T., Tertoolen, L. G., van Zoelen, E. J., and den Hertog, J. (1999). Growth factor signalling. *Int J Dev Biol* 43, 681-691.
- Dehm, S. M., and Tindall, D. J. (2006). Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem* 99, 333-344.
- DeLellis, R. A. (2001). The neuroendocrine system and its tumors: an overview. *Am J Clin Pathol* 115 Suppl, S5-16.
- Denmeade, S. R., Lin, X. S., and Isaacs, J. T. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 28, 251-265.
- Desai, N. N., Carlson, R. O., Mattie, M. E., Olivera, A., Buckley, N. E., Seki, T., Brooker, G., and Spiegel, S. (1993). Signaling pathways for sphingosylphosphorylcholine-mediated mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 121, 1385-1395.
- Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). TRP Ion Channels and Temperature Sensation. *Annu Rev Neurosci*.
- Di Lorenzo, G., Tortora, G., D'Armiento, F. P., De Rosa, G., Staibano, S., Autorino, R., D'Armiento, M., De Laurentiis, M., De Placido, S., Catalano, G., *et al.* (2002). Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8, 3438-3444.
- Di Sant'Agnese, P. A., and Cockett, A. T. (1994). The prostatic endocrine-paracrine (neuroendocrine) regulatory system and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review and future directions in basic research. *J Urol* 152, 1927-1931.
- di Sant'Agnese, P. A., and Cockett, A. T. (1996). Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 78, 357-361.
- di Sant'Agnese, P. A., de Mesy Jensen, K. L., and Ackroyd, R. K. (1989). Calcitonin, katalcalcin, and calcitonin gene-related peptide in the human prostate. *An*

immunocytochemical and immunoelectron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 113, 790-796.

Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., and Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-858.

Dolmetsch, R. E., Xu, K., and Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936.

Doroquez, D. B., and Rebay, I. (2006). Signal integration during development: mechanisms of EGFR and Notch pathway function and cross-talk. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 339-385.

Dowd, D. R. (1995). Calcium regulation of apoptosis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30, 255-280.

Dragoni, I., Guida, E., and McIntyre, P. (2006). The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functionally important double cysteine motif. *J Biol Chem* 281, 37353-37360.

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.

Edwin, F., Wiepz, G. J., Singh, R., Peet, C. R., Chaturvedi, D., Bertics, P. J., and Patel, T. B. (2006). A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol Biol* 327, 1-24.

Estrada, M., Uhlen, P., and Ehrlich, B. E. (2006). Ca²⁺ oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. *J Cell Sci* 119, 733-743.

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.

Fang, X., Schummer, M., Mao, M., Yu, S., Tabassam, F. H., Swaby, R., Hasegawa, Y., Tanyi, J. L., LaPushin, R., Eder, A., *et al.* (2002). Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 1582, 257-264.

Farini, D., Puglianiello, A., Mammi, C., Siracusa, G., and Moretti, C. (2003). Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology* 144, 1631-1643.

Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.

Feldman, S. A., and Eiden, L. E. (2003). The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. *Endocr Pathol* 14, 3-23.

Ferrer-Montiel, A., Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., and Planells-Cases, R. (2004). Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 271, 1820-1826.

Ferry, G., Tellier, E., Try, A., Gres, S., Naime, I., Simon, M. F., Rodriguez, M., Boucher, J., Tack, I., Gesta, S., *et al.* (2003). Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278, 18162-18169.

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 Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.

- Fetissov, F., Arbeille, B., Guilloteau, D., and Lanson, Y. (1987). Glycoprotein hormone alpha-chain-immunoreactive endocrine cells in prostate and cloacal-derived tissues. *Arch Pathol Lab Med* *111*, 836-840.
- 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.
- 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. (2006). Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J Biol Chem* *281*, 4977-4982.
- Flockerzi, V. (2007). An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*, 1-19.
- Fluchter, S. H., Weiser, R., and Gamper, C. (2007). The role of hormonal treatment in prostate cancer. *Recent Results Cancer Res* *175*, 211-237.
- Fong, C. J., Sherwood, E. R., Braun, E. J., Berg, L. A., Lee, C., and Kozlowski, J. M. (1992a). Regulation of prostatic carcinoma cell proliferation and secretory activity by extracellular matrix and stromal secretions. *Prostate* *21*, 121-131.
- Fong, C. J., Sherwood, E. R., Mendelsohn, J., Lee, C., and Kozlowski, J. M. (1992b). Epidermal growth factor receptor monoclonal antibody inhibits constitutive receptor phosphorylation, reduces autonomous growth, and sensitizes androgen-independent prostatic carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* *52*, 5887-5892.
- Fournier, G., Valeri, A., Mangin, P., and Cussenot, O. (2004). [Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology]. *Ann Urol (Paris)* *38*, 187-206.
- Fowler, J. E., Jr., Lau, J. L., Ghosh, L., Mills, S. E., and Mounzer, A. (1988). Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: an immunohistochemical study. *J Urol* *139*, 857-861.
- Frederick, J., Buck, M. E., Matson, D. J., and Cortright, D. N. (2007). Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochem Biophys Res Commun* *358*, 1058-1064.
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., *et al.* (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.
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J., Weiner, J. A., and Chun, J. (2001). Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *41*, 507-534.
- 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.
- Garber, S. S., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1989). Regulation of ionic currents in pheochromocytoma cells by nerve growth factor and dexamethasone. *J Neurosci* *9*, 3976-3987.
- Garcia-Segura, L. M., Sanz, A., and Mendez, P. (2006). Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection. *Neuroendocrinology* *84*, 275-279.
- Gaudet, A. D., Williams, S. J., Hwi, L. P., and Ramer, M. S. (2004). Regulation of TRPV2 by axotomy in sympathetic, but not sensory neurons. *Brain Res* *1017*, 155-162.
- Ghadirian, P., Howe, G. R., Hislop, T. G., and Maisonneuve, P. (1997). Family history of prostate cancer: a multi-center case-control study in Canada. *Int J Cancer* *70*, 679-681.

- Gill, D. L., Waldron, R. T., Rys-Sikora, K. E., Ufret-Vincenty, C. A., Graber, M. N., Favre, C. J., and Alfonso, A. (1996). Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci Rep* 16, 139-157.
- Gioeli, D. (2005). Signal transduction in prostate cancer progression. *Clin Sci (Lond)* 108, 293-308.
- Gkika, D., Topala, C. N., Chang, Q., Picard, N., Thebault, S., Houillier, P., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. (2006). Tissue kallikrein stimulates Ca(2+) reabsorption via PKC-dependent plasma membrane accumulation of TRPV5. *Embo J* 25, 4707-4716.
- Gkonos, P. J., Krongrad, A., and Roos, B. A. (1995). Neuroendocrine peptides in the prostate. *Urol Res* 23, 81-87.
- 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.
- Goetzl, E. J., Dolezalova, H., Kong, Y., and Zeng, L. (1999). Dual mechanisms for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 59, 4732-4737.
- Goetzl, E. J., Graeler, M., Huang, M. C., and Shankar, G. (2002). Lysophospholipid growth factors and their G protein-coupled receptors in immunity, coronary artery disease, and cancer. *ScientificWorldJournal* 2, 324-338.
- Goldie, J. H., and Coldman, A. J. (1979). A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 63, 1727-1733.
- Goodlad, R. A., and Wright, N. A. (1996). Epidermal growth factor (EGF). *Baillieres Clin Gastroenterol* 10, 33-47.
- Gouni-Berthold, I., and Sachinidis, A. (2004). Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Curr Pharm Des* 10, 1261-1271.
- Grobholz, R., Griebel, M., Sauer, C. G., Michel, M. S., Trojan, L., and Bleyl, U. (2005). Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 36, 562-570.
- Grube, D. (1986). The endocrine cells of the digestive system: amines, peptides, and modes of action. *Anat Embryol (Berl)* 175, 151-162.
- 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.
- Guerrant, R. L., Brunton, L. L., Schnaitman, T. C., Rebhun, L. I., and Gilman, A. G. (1974). Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 10, 320-327.
- Gunteski-Hamblin, A. M., Clarke, D. M., and Shull, G. E. (1992). Molecular cloning and tissue distribution of alternatively spliced mRNAs encoding possible mammalian homologues of the yeast secretory pathway calcium pump. *Biochemistry* 31, 7600-7608.
- Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A., and Davis, J. B. (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 23, 183-191.
- Gutkind, J. S. (1998). Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17, 1331-1342.
- 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.
- Handler, J. A., Danilowicz, R. M., and Eling, T. E. (1990). Mitogenic signaling by epidermal growth factor (EGF), but not platelet-derived growth factor, requires arachidonic acid

metabolism in BALB/c 3T3 cells. Modulation of EGF-dependent c-myc expression by prostaglandins. *J Biol Chem* 265, 3669-3673.

Hansson, J., and Abrahamsson, P. A. (2001). Neuroendocrine pathogenesis in adenocarcinoma of the prostate. *Ann Oncol* 12 Suppl 2, S145-152.

Hao, F., Tan, M., Xu, X., Han, J., Miller, D. D., Tigyi, G., and Cui, M. Z. (2007). Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA(1), p42 and p38alpha. *Biochim Biophys Acta* 1771, 883-892.

Harteneck, C., Plant, T. D., and Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 23, 159-166.

He, H., Lam, M., McCormick, T. S., and Distelhorst, C. W. (1997). Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol* 138, 1219-1228.

He, Q., Lee, D. I., Rong, R., Yu, M., Luo, X., Klein, M., El-Deiry, W. S., Huang, Y., Hussain, A., and Sheikh, M. S. (2002). Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene* 21, 2623-2633.

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.

Heese, K., Low, J. W., and Inoue, N. (2006). Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease. *Neurosignals* 15, 1-12.

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., *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.

Herrero, M., Rodriguez, A., and Cejas, H. (2002). [Prostatic neuroendocrine cells]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 59, 91-96.

Hla, T. (2003). Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res* 47, 401-407.

Hobisch, A., Eder, I. E., Putz, T., Horninger, W., Bartsch, G., Klocker, H., and Culig, Z. (1998). Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res* 58, 4640-4645.

Hoenderop, J. G., Muller, D., Van Der Kemp, A. W., Hartog, A., Suzuki, M., Ishibashi, K., Imai, M., Sweep, F., Willems, P. H., Van Os, C. H., and Bindels, R. J. (2001a). Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 12, 1342-1349.

Hoenderop, J. G., Vennekens, R., Muller, D., Prenen, J., Droogmans, G., Bindels, R. J., and Nilius, B. (2001b). Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* 537, 747-761.

Hofer, A. M., Landolfi, B., Debellis, L., Pozzan, T., and Curci, S. (1998). Free [Ca²⁺] dynamics measured in agonist-sensitive stores of single living intact cells: a new look at the refilling process. *Embo J* 17, 1986-1995.

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.

Hook, V., and Metz-Boutigue, M. H. (2002). Protein trafficking to chromaffin granules and proteolytic processing within regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 971, 397-405.

- 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.
- Hsieh, T. C., Xu, W., and Chiao, J. W. (1995). Growth regulation and cellular changes during differentiation of human prostatic cancer LNCaP cells as induced by T lymphocyte-conditioned medium. *Exp Cell Res* 218, 137-143.
- Hu, H. Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C. K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L. Y., Wood, J. D., and Zhu, M. X. (2004). 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279, 35741-35748.
- Hu, J., Milenkovic, N., and Lewin, G. R. (2006). The high threshold mechanotransducer: a status report. *Pain* 120, 3-7.
- Huang, B. R., Cai, L. W., and Xiang, X. Z. (2001). [The basic and applied study on the epidermal growth factor]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 23, 176-180.
- Huggins, C., and Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 168, 9-12.
- 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.
- Humez, S., Monet, M., Legrand, G., Lepage, G., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2006). Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 13, 181-195.
- 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.
- Isaacs, J. T., and Coffey, D. S. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 2, 33-50.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., and Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 73, 321-354.
- Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., and Shigekawa, M. (2003). A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol* 161, 957-967.
- Jarrard, D. F., Blitz, B. F., Smith, R. C., Patai, B. L., and Rukstalis, D. B. (1994). Effect of epidermal growth factor on prostate cancer cell line PC3 growth and invasion. *Prostate* 24, 46-53.
- Jatoi, A., Burch, P., Hillman, D., Vanyo, J. M., Dakhil, S., Nikcevich, D., Rowland, K., Morton, R., Flynn, P. J., Young, C., and Tan, W. (2007). A tomato-based, lycopene-containing intervention for androgen-independent prostate cancer: results of a Phase II study from the North Central Cancer Treatment Group. *Urology* 69, 289-294.
- Jiang, S., Chow, S. C., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1994). Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp Cell Res* 212, 84-92.
- Jin, X., Touhey, J., and Gaudet, R. (2006). Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J Biol Chem* 281, 25006-25010.
- Johnston, J. B., Navaratnam, S., Pitz, M. W., Maniate, J. M., Wiechec, E., Baust, H., Gingerich, J., Skliris, G. P., Murphy, L. C., and Los, M. (2006). Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. *Curr Med Chem* 13, 3483-3492.

- Jones, H. E., Eaton, C. L., Barrow, D., Dutkowski, C. M., Gee, J. M., and Griffiths, K. (1997). Comparative studies of the mitogenic effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- α and the expression of various growth factors in neoplastic and non-neoplastic prostatic cell lines. *Prostate* 30, 219-231.
- Jongsma, J., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Van Weerden, W. M., Martens, G. J., van der Kwast, T. H., Schroder, F. H., and van Steenbrugge, G. J. (1999). Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *Am J Pathol* 154, 543-551.
- Jost, M., Kari, C., and Rodeck, U. (2000). The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol* 10, 505-510.
- Juin, P., Pelletier, M., Oliver, L., Tremblais, K., Gregoire, M., Meflah, K., and Vallette, F. M. (1998). Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 273, 17559-17564.
- Juvin, V., Penna, A., Chemin, J., Lin, Y. L., and Rassendren, F. A. (2007). Pharmacological characterization and molecular determinants of the activation of TRPV2 channel orthologs by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Mol Pharmacol*.
- Kadmon, D., Thompson, T. C., Lynch, G. R., and Scardino, P. T. (1991). Elevated plasma chromogranin-A concentrations in prostatic carcinoma. *J Urol* 146, 358-361.
- Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., and Kojima, I. (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1, 165-170.
- Karlsson, E. (2001). The role of pancreatic chromogranins in islet physiology. *Curr Mol Med* 1, 727-732.
- 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.
- Khoury, S. (1991). Physiologie exocrine de la prostate, l'HBP en question).
- Khoury, S., and Wright, F. (1991). Physiologie hormonale de la prostate, l'HBP en question).
- King, C. R., Borrello, I., Bellot, F., Comoglio, P., and Schlessinger, J. (1988). Egf binding to its receptor triggers a rapid tyrosine phosphorylation of the erbB-2 protein in the mammary tumor cell line SK-BR-3. *Embo J* 7, 1647-1651.
- Kowase, T., Nakazato, Y., Yoko, O. H., Morikawa, A., and Kojima, I. (2002). Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues. *Endocr J* 49, 349-355.
- Krijnen, J. L., Janssen, P. J., Ruizeveld de Winter, J. A., van Krimpen, H., Schroder, F. H., and van der Kwast, T. H. (1993). Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry* 100, 393-398.
- Krsek, M. (2003). [Somatostatin, somatostatin analogs and their clinical use]. *Cas Lek Cesk* 142, 134-138; discussion 139.
- Kue, P. F., Taub, J. S., Harrington, L. B., Polakiewicz, R. D., Ullrich, A., and Daaka, Y. (2002). Lysophosphatidic acid-regulated mitogenic ERK signaling in androgen-insensitive prostate cancer PC-3 cells. *Int J Cancer* 102, 572-579.
- Kuznetsov, G., Brostrom, M. A., and Brostrom, C. O. (1992). Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *J Biol Chem* 267, 3932-3939.
- 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.

- Kyprianou, N., English, H. F., and Isaacs, J. T. (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res* 50, 3748-3753.
- Kyprianou, N., and Isaacs, J. T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122, 552-562.
- Kyprianou, N., King, E. D., Bradbury, D., and Rhee, J. G. (1997). bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 70, 341-348.
- Lalani, E. N., Stubbs, A., and Stamp, G. W. (1997). Prostate cancer; the interface between pathology and basic scientific research. *Semin Cancer Biol* 8, 53-59.
- Lam, M., Dubyak, G., and Distelhorst, C. W. (1993). Effect of glucocorticosteroid treatment on intracellular calcium homeostasis in mouse lymphoma cells. *Mol Endocrinol* 7, 686-693.
- Larre, S., Salomon, L., and Abbou, C. C. (2007). Choices for surgery. *Recent Results Cancer Res* 175, 163-178.
- Larsson, L. I. (1980). On the possible existence of multiple endocrine, paracrine and neurocrine messengers in secretory cell systems. *Invest Cell Pathol* 3, 73-85.
- Latil, A., and Lidereau, R. (1998). Genetic aspects of prostate cancer. *Virchows Arch* 432, 389-406.
- Leav, I., McNeal, J. E., Ziar, J., and Alroy, J. (1998). The localization of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in stromal and epithelial compartments of developing human prostate and hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions. *Hum Pathol* 29, 668-675.
- Lee, Y. S., Sayeed, M. M., and Wurster, R. D. (1994). Inhibition of cell growth and intracellular Ca²⁺ mobilization in human brain tumor cells by Ca²⁺ channel antagonists. *Mol Chem Neurobiol* 22, 81-95.
- 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.
- Leiblich, A., Cross, S. S., Catto, J. W., Pesce, G., Hamdy, F. C., and Rehman, I. (2007). Human prostate cancer cells express neuroendocrine cell markers PGP 9.5 and chromogranin A. *Prostate*.
- 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.
- Lewinter, R. D., Skinner, K., Julius, D., and Basbaum, A. I. (2004). Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 470, 400-408.
- 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.
- 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.
- 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., and Kim, C. (2005). Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon! *Cell Mol Life Sci* 62, 2985-3001.
- 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.
- Liliom, K., Guan, Z., Tseng, J. L., Desiderio, D. M., Tigyi, G., and Watsky, M. A. (1998). Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury. *Am J Physiol* 274, C1065-1074.
- Ling, M. T., Wang, X., Zhang, X., and Wong, Y. C. (2006). The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation* 74, 481-487.
- 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.
- Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C. S., and Cantley, L. C. (1994). Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J Biol Chem* 269, 21403-21406.
- Liu, A. Y., Brubaker, K. D., Goo, Y. A., Quinn, J. E., Kral, S., Sorensen, C. M., Vessella, R. L., Beldegrun, A. S., and Hood, L. E. (2004). Lineage relationship between LNCaP and LNCaP-derived prostate cancer cell lines. *Prostate* 60, 98-108.
- 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.
- Loza, J., Carpio, L., Lawless, G., Marzec, N., and Dziak, R. (1995). Role of extracellular calcium influx in EGF-induced osteoblastic cell proliferation. *Bone* 16, 341S-347S.
- Ludwig, M. G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J. A., Jones, C. E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R. M., and Seuwen, K. (2003). Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425, 93-98.
- Luscombe, C. J., French, M. E., Liu, S., Saxby, M. F., Jones, P. W., Fryer, A. A., and Strange, R. C. (2001). Prostate cancer risk: associations with ultraviolet radiation, tyrosinase and melanocortin-1 receptor genotypes. *Br J Cancer* 85, 1504-1509.
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139.
- Lytton, J., and MacLennan, D. H. (1988). Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 263, 15024-15031.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E., and MacLennan, D. H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267, 14483-14489.
- Lytton, J., Zarain-Herzberg, A., Periasamy, M., and MacLennan, D. H. (1989). Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 264, 7059-7065.
- MacDonald, A., and Habib, F. K. (1992). Divergent responses to epidermal growth factor in hormone sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. *Br J Cancer* 65, 177-182.
- Maddy, S. Q., Chisholm, G. D., Busuttill, A., and Habib, F. K. (1989). Epidermal growth factor receptors in human prostate cancer: correlation with histological differentiation of the tumour. *Br J Cancer* 60, 41-44.

- Magnier, C., Papp, B., Corvazier, E., Bredoux, R., Wuytack, F., Eggermont, J., Maclouf, J., and Enouf, J. (1992). Regulation of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases during platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 267, 15808-15815.
- Mann, T. (1974). Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fertil* 37, 179-188.
- 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.
- Marks, A. R. (1997). Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* 272, H597-605.
- McConkey, D. J., and Orrenius, S. (1997). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 357-366.
- McLellan, D. L., and Norman, R. W. (1995). Hereditary aspects of prostate cancer. *Cmaj* 153, 895-900.
- McLeod, D. G. (1993). Antiandrogenic drugs. *Cancer* 71, 1046-1049.
- McNeal, J. E. (1969). Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer* 23, 24-34.
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 2, 35-49.
- McWilliam, L. J., Manson, C., and George, N. J. (1997). Neuroendocrine differentiation and prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol* 80, 287-290.
- Merchant, T. E., Kasimos, J. N., de Graaf, P. W., Minsky, B. D., Gierke, L. W., and Glonek, T. (1991). Phospholipid profiles of human colon cancer using ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Int J Colorectal Dis* 6, 121-126.
- 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.
- Michalak, M., Mariani, P., and Opas, M. (1998). Calreticulin, a multifunctional Ca²⁺ binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem Cell Biol* 76, 779-785.
- 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* 147, 5160-5169.
- Mills, G. B., and Moolenaar, W. H. (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 582-591.
- Minke, B. (1977). Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* 3, 59-64.
- Mogami, H., Tepikin, A. V., and Petersen, O. H. (1998). Termination of cytosolic Ca²⁺ signals: Ca²⁺ reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca²⁺ concentration in the store lumen. *Embo J* 17, 435-442.
- Montano, X., and Djamgoz, M. B. (2004). Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. *FEBS Lett* 571, 1-8.
- Monteiro, H. P., Rocha Oliveira, C. J., Curcio, M. F., Moraes, M. S., and Arai, R. J. (2005). Tyrosine phosphorylation in nitric oxide-mediated signaling events. *Methods Enzymol* 396, 350-358.
- 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.
- Moolenaar, W. H. (1999). Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res* 253, 230-238.
- Moolenaar, W. H. (2000). Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann N Y Acad Sci* 905, 1-10.
- Moolenaar, W. H., Kranenburg, O., Postma, F. R., and Zondag, G. C. (1997). Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* 9, 168-173.
- Moolenaar, W. H., Tertoolen, L. G., and de Laat, S. W. (1984). Growth factors immediately raise cytoplasmic free Ca²⁺ in human fibroblasts. *J Biol Chem* 259, 8066-8069.
- Moore, C. K., and Goldman, H. B. (2006). The bladder epithelium and overactive bladder: what we know. *Curr Urol Rep* 7, 447-449.
- Morales Martinez, M. E., and Pedron, N. (1999). [beta-Endorphins and the male reproductive system]. *Ginecol Obstet Mex* 67, 183-187.
- Mori, S., Murakami-Mori, K., and Bonavida, B. (1999). Interleukin-6 induces G1 arrest through induction of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, and neuron-like morphology in LNCaP prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 609-614.
- Morris, G. L., and Dodd, J. G. (1990). Epidermal growth factor receptor mRNA levels in human prostatic tumors and cell lines. *J Urol* 143, 1272-1274.
- Morton, M. S., Chan, P. S., Cheng, C., Blacklock, N., Matos-Ferreira, A., Abranches-Monteiro, L., Correia, R., Lloyd, S., and Griffiths, K. (1997). Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate* 32, 122-128.
- Mosca, A., Berruti, A., Russo, L., Torta, M., and Dogliotti, L. (2005). The neuroendocrine phenotype in prostate cancer: basic and clinical aspects. *J Endocrinol Invest* 28, 141-145.
- Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M., and Imaizumi, Y. (2003). TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93, 829-838.
- 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.
- Murugesan, G., and Fox, P. L. (1996). Role of lysophosphatidylcholine in the inhibition of endothelial cell motility by oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 97, 2736-2744.
- Nagakawa, O., Ogasawara, M., Murata, J., Fuse, H., and Saiki, I. (2001). Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines. *Int J Urol* 8, 65-70.
- Nagasawa, M., Nakagawa, Y., Tanaka, S., and Kojima, I. (2007). Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *J Cell Physiol* 210, 692-702.
- Neeper, M. P., Liu, Y., Hutchinson, T. L., Wang, Y., Flores, C. M., and Qin, N. (2007). Activation Properties of Heterologously Expressed Mammalian TRPV2: EVIDENCE FOR SPECIES DEPENDENCE. *J Biol Chem* 282, 15894-15902.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., and Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270, 633-637.
- Nicotera, P., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (1994). Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 16, 279-288.
- Noordzij, M. A., van der Kwast, T. H., van Steenbrugge, G. J., Hop, W. J., and Schroder, F. H. (1995). The prognostic influence of neuroendocrine cells in prostate cancer: results of a

long-term follow-up study with patients treated by radical prostatectomy. *Int J Cancer* 62, 252-258.

Odermatt, A., Taschner, P. E., Khanna, V. K., Busch, H. F., Karpati, G., Jablecki, C. K., Breuning, M. H., and MacLennan, D. H. (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat Genet* 14, 191-194.

Okita, M., Gaudette, D. C., Mills, G. B., and Holub, B. J. (1997). Elevated levels and altered fatty acid composition of plasma lysophosphatidylcholine(lysoPC) in ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 71, 31-34.

Oliva, J. L., Griner, E. M., and Kazanietz, M. G. (2005). PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors* 23, 245-252.

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.

Ozil, J. P. (1998). Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach. *Biophys Chem* 72, 141-152.

Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggon, T. J., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.

Parekh, A. B., Fleig, A., and Penner, R. (1997). The store-operated calcium current I(CRAC): nonlinear activation by InsP3 and dissociation from calcium release. *Cell* 89, 973-980.

Partin, A. W., and Coffey, D. S. (1994). Benign and malignant prostatic neoplasms: human studies. *Recent Prog Horm Res* 49, 293-331.

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.

Patt, L. M., and Houck, J. C. (1983). Role of polypeptide growth factors in normal and abnormal growth. *Kidney Int* 23, 603-610.

Peehl, D. M. (2005). Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 12, 19-47.

Peng, J. B., Chen, X. Z., Berger, U. V., Vassilev, P. M., Tsukaguchi, H., Brown, E. M., and Hediger, M. A. (1999). Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 274, 22739-22746.

Peng, J. B., 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.

Penna, A., Juvin, V., Chemin, J., Compan, V., Monet, M., and Rassendren, F. A. (2006). PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane. *Cell Calcium* 39, 495-507.

Picascia, A., Stanzione, R., Chieffi, P., Kisslinger, A., Dikic, I., and Tramontano, D. (2002). Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates proliferation and differentiation of prostate cells. *Mol Cell Endocrinol* 186, 81-87.

Pienta, K. J., and Esper, P. S. (1993). Is dietary fat a risk factor for prostate cancer? *J Natl Cancer Inst* 85, 1538-1540.

Pigozzi, D., Tombal, B., Ducret, T., Vacher, P., and Gailly, P. (2004). Role of store-dependent influx of Ca²⁺ and efflux of K⁺ in apoptosis of CHO cells. *Cell Calcium* 36, 421-430.

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.

Porter, V. A., Bonev, A. D., Knot, H. J., Heppner, T. J., Stevenson, A. S., Kleppisch, T., Lederer, W. J., and Nelson, M. T. (1998). Frequency modulation of Ca²⁺ sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol* 274, C1346-1355.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74, 595-636.

Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230-233.

Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., Gartner, B., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Higgins, M., Pelletier, J., and Zabel, B. (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 9, 203-216.

Prestrelski, S. J., Arakawa, T., Wu, C. S., O'Neal, K. D., Westcott, K. R., and Narhi, L. O. (1992). Solution structure and dynamics of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Biol Chem* 267, 319-322.

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.

Prinsloo, S. E., and Van Aswegen, C. H. (2000). The role of receptors in prostate cancer. *Adv Clin Chem* 35, 101-160.

Putney, J. W., Jr., and McKay, R. R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* 21, 38-46.

Quek, M. L., Daneshmand, S., Rodrigo, S., Cai, J., Dorff, T. B., Groshen, S., Skinner, D. G., Lieskovsky, G., and Pinski, J. (2006). Prognostic significance of neuroendocrine expression in lymph node-positive prostate cancer. *Urology* 67, 1247-1252.

Rader, D. J. (2000). Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 343, 1179-1182.

Raj, G. V., Sekula, J. A., Guo, R., Madden, J. F., and Daaka, Y. (2004). Lysophosphatidic acid promotes survival of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells via activation of NF-kappaB. *Prostate* 61, 105-113.

Rajan, R., Vanderslice, R., Kapur, S., Lynch, J., Thompson, R., and Djakiew, D. (1996). Epidermal growth factor (EGF) promotes chemomigration of a human prostate tumor cell line, and EGF immunoreactive proteins are present at sites of metastasis in the stroma of lymph nodes and medullary bone. *Prostate* 28, 1-9.

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.

Raynal, P., Montagner, A., Dance, M., and Yart, A. (2005). [Lysophospholipids and cancer: current status and perspectives]. *Pathol Biol (Paris)* 53, 57-62.

Remontet, L., Esteve, J., Bouvier, A. M., Grosclaude, P., Launoy, G., Menegoz, F., Exbrayat, C., Tretare, B., Carli, P. M., Guizard, A. V., *et al.* (2003). Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 51, 3-30.

Richard, F. (1994). [Epidemiology of prostate cancer and its implications in public health]. *Rev Prat* 44, 575-579.

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.

- Rosen, L. B., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1995). Calcium regulation of gene expression. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30, 225-253.
- Roznovanu, S. L., Amalinci, C., and Radulescu, D. (2005). Molecular mechanisms in hormone-resistant prostate cancer. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 109, 577-583.
- Ruizeveld de Winter, J. A., Janssen, P. J., Sleddens, H. M., Verleun-Mooijman, M. C., Trapman, J., Brinkmann, A. O., Santerse, A. B., Schroder, F. H., and van der Kwast, T. H. (1994). Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol* 144, 735-746.
- Russell, P. J., Bennett, S., and Stricker, P. (1998). Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* 44, 705-723.
- Sadar, M. D., and Gleave, M. E. (2000). Ligand-independent activation of the androgen receptor by the differentiation agent butyrate in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 60, 5825-5831.
- Sadasivan, R., Morgan, R., Jennings, S., Austenfeld, M., Van Veldhuizen, P., Stephens, R., and Noble, M. (1993). Overexpression of Her-2/neu may be an indicator of poor prognosis in prostate cancer. *J Urol* 150, 126-131.
- Sakura, H., and Ashcroft, F. M. (1997). Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 40, 528-532.
- Sasaki, Y., Asaoka, Y., and Nishizuka, Y. (1993). Potentiation of diacylglycerol-induced activation of protein kinase C by lysophospholipids. Subspecies difference. *FEBS Lett* 320, 47-51.
- Saulnier-Blache, J. S. (2004). [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Med Sci (Paris)* 20, 799-803.
- Saunders, C. I., Kunde, D. A., Crawford, A., and Geraghty, D. P. (2007). Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol* 44, 1429-1435.
- Schalken, J. A., and van Leenders, G. (2003). Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology* 62, 11-20.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- 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.
- Schubert, D., LaCorbiere, M., Whitlock, C., and Stallcup, W. (1978). Alterations in the surface properties of cells responsive to nerve growth factor. *Nature* 273, 718-723.
- 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.
- Sellmayer, A., Uedelhoven, W. M., Weber, P. C., and Bonventre, J. V. (1991). Endogenous non-cyclooxygenase metabolites of arachidonic acid modulate growth and mRNA levels of immediate-early response genes in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 266, 3800-3807.
- Seth, M., Sumbilla, C., Mullen, S. P., Lewis, D., Klein, M. G., Hussain, A., Soboloff, J., Gill, D. L., and Inesi, G. (2004). Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca²⁺ signaling mechanism in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16683-16688.
- Shimizu, N., Miyatake, R., Esa, A., and Ishikawa, Y. (2005). [Small cell carcinoma of the prostate: an autopsy case report]. *Hinyokika Kyo* 51, 399-402.

- Shimosato, G., Amaya, F., Ueda, M., Tanaka, Y., Decosterd, I., and Tanaka, M. (2005). Peripheral inflammation induces up-regulation of TRPV2 expression in rat DRG. *Pain* *119*, 225-232.
- Shitaka, Y., Matsuki, N., Saito, H., and Katsuki, H. (1996). Basic fibroblast growth factor increases functional L-type Ca²⁺ channels in fetal rat hippocampal neurons: implications for neurite morphogenesis in vitro. *J Neurosci* *16*, 6476-6489.
- Shou, J., Massarweh, S., Osborne, C. K., Wakeling, A. E., Ali, S., Weiss, H., and Schiff, R. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* *96*, 926-935.
- 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.
- Siddiqui, E. J., Shabbir, M., Mikhailidis, D. P., Thompson, C. S., and Mumtaz, F. H. (2006). The role of serotonin (5-hydroxytryptamine_{1A} and _{1B}) receptors in prostate cancer cell proliferation. *J Urol* *176*, 1648-1653.
- Simmons, N. L. (1990). A cultured human renal epithelioid cell line responsive to vasoactive intestinal peptide. *Exp Physiol* *75*, 309-319.
- Simon, M. F., Rey, A., Castan-Laurel, I., Gres, S., Sibrac, D., Valet, P., and Saulnier-Blache, J. S. (2002). Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production. *J Biol Chem* *277*, 23131-23136.
- 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.
- So, I., Chae, M. R., Kim, S. J., and Lee, S. W. (2005). Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces the change of calcium mobilization via TRPC ion channels in cultured human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res* *17*, 475-483.
- Soga, N., and Sugimura, Y. (2007). [Optimal treatment for elderly high-risk prostate cancer patients]. *Gan To Kagaku Ryoho* *34*, 387-392.
- Solem, M., McMahan, T., and Messing, R. O. (1995). Depolarization-induced neurite outgrowth in PC12 cells requires permissive, low level NGF receptor stimulation and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci* *15*, 5966-5975.
- Speirs, V., Bienkowski, E., Wong, V., and Cutz, E. (1993). Paracrine effects of bombesin/gastrin-releasing peptide and other growth factors on pulmonary neuroendocrine cells in vitro. *Anat Rec* *236*, 53-61; discussion 62-57.
- Spiegel, S., Cuvillier, O., Edsall, L., Kohama, T., Menzeleev, R., Olivera, A., Thomas, D., Tu, Z., Van Brocklyn, J., and Wang, F. (1998). Roles of sphingosine-1-phosphate in cell growth, differentiation, and death. *Biochemistry (Mosc)* *63*, 69-73.
- Spiegel, S., and Milstien, S. (1995). Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *J Membr Biol* *146*, 225-237.
- Spiegel, S., and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 397-407.
- Spiridon, C. I., Ghetie, M. A., Uhr, J., Marches, R., Li, J. L., Shen, G. L., and Vitetta, E. S. (2002). Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved

antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 8, 1720-1730.

Spitzer, N. C., Lautermilch, N. J., Smith, R. D., and Gomez, T. M. (2000). Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *Bioessays* 22, 811-817.

Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S., and Redwine, E. (1987). Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 317, 909-916.

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.

Stephan, C., Jung, K., Diamandis, E. P., Rittenhouse, H. G., Lein, M., and Loening, S. A. (2002). Prostate-specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer. *Urology* 59, 2-8.

Stern, D. F., and Kamps, M. P. (1988). EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *Embo J* 7, 995-1001.

Stice, L. L., Vaziri, C., and Faller, D. V. (1999). Regulation of platelet-derived growth factor signaling by activated p21Ras. *Front Biosci* 4, D72-86.

Stokes, A. J., Shimoda, L. M., Koblan-Huberson, M., Adra, C. N., and Turner, H. (2004). A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *J Exp Med* 200, 137-147.

Stokes, A. J., Wakano, C., Del Carmen, K. A., Koblan-Huberson, M., and Turner, H. (2005). Formation of a physiological complex between TRPV2 and RGA protein promotes cell surface expression of TRPV2. *J Cell Biochem* 94, 669-683.

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., *et al.* (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.

Szperl, M., and Opas, M. (2005). [Calreticulin, Ca²⁺-binding chaperon of the endoplasmic reticulum]. *Postepy Biochem* 51, 382-386.

Takekoshi, K., Nakai, T., and Matsui, Y. (1999). [Chromogranin A, chromogranin B, chromogranin C]. *Nippon Rinsho* 57 *Suppl*, 234-237.

Takeshita, S., Inoue, N., Gao, D., Rikitake, Y., Kawashima, S., Tawa, R., Sakurai, H., and Yokoyama, M. (2000). Lysophosphatidylcholine enhances superoxide anions production via endothelial NADH/NADPH oxidase. *J Atheroscler Thromb* 7, 238-246.

Tarle, M., Frkovic-Grazio, S., Kraljic, I., and Kovacic, K. (1994). A more objective staging of advanced prostate cancer--routine recognition of malignant endocrine structures: the assessment of serum TPS, PSA, and NSE values. *Prostate* 24, 143-148.

Tarle, M., and Rados, N. (1991). Investigation on serum neurone-specific enolase in prostate cancer diagnosis and monitoring: comparative study of a multiple tumor marker assay. *Prostate* 19, 23-33.

Tarnawski, A. S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 50 *Suppl* 1, S24-33.

Tassi, E., and Wellstein, A. (2006). The angiogenic switch molecule, secreted FGF-binding protein, an indicator of early stages of pancreatic and colorectal adenocarcinoma. *Semin Oncol* 33, S50-56.

Thalman, G. N., Anezinis, P. E., Chang, S. M., Zhou, H. E., Kim, E. E., Hopwood, V. L., Pathak, S., von Eschenbach, A. C., and Chung, L. W. (1994). Androgen-independent cancer

progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* *54*, 2577-2581.

Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L., *et al.* (2006). Differential role of transient receptor potential channels in 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., *et al.* (2005a). 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 Ca⁽²⁺⁾-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest* *111*, 1691-1701.

Thebault, S., Zholos, A., Enfissi, A., Slomianny, C., Dewailly, E., Roudbaraki, M., Parys, J., and Prevarskaya, N. (2005b). Receptor-operated Ca²⁺ entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J Cell Physiol* *204*, 320-328.

Thorpe, J. F., Jain, S., Marczylo, T. H., Gescher, A. J., Steward, W. P., and Mellon, J. K. (2007). A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention. *Ann R Coll Surg Engl* *89*, 207-211.

Thukkani, A. K., McHowat, J., Hsu, F. F., Brennan, M. L., Hazen, S. L., and Ford, D. A. (2003). Identification of alpha-chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions. *Circulation* *108*, 3128-3133.

Tokumura, A. (2002). Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochim Biophys Acta* *1582*, 18-25.

Tokura, Y., Wakita, H., Seo, N., Furukawa, F., Nishimura, K., and Takigawa, M. (1999). Modulation of T-lymphocyte proliferation by exogenous natural ceramides and sphingosylphosphorylcholine. *J Invest Dermatol Symp Proc* *4*, 184-189.

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.

Tominaga, M., and Caterina, M. J. (2004). Thermosensation and pain. *J Neurobiol* *61*, 3-12.

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.

Tu, H., Jacobs, S. C., Borkowski, A., and Kyprianou, N. (1996). Incidence of apoptosis and cell proliferation in prostate cancer: relationship with TGF-beta1 and bcl-2 expression. *Int J Cancer* *69*, 357-363.

Turner, H., Fleig, A., Stokes, A., Kinet, J. P., and Penner, R. (2003). Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J* *371*, 341-350.

Ueda, Y., and Saijo, N. (2001). [Signal transduction inhibitor]. *Gan To Kagaku Ryoho* *28*, 591-600.

- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* *309*, 418-425.
- 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.
- Ushiro, H., and Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* *255*, 8363-8365.
- Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J., Thangada, S., Liu, C. H., et al. (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* *142*, 229-240.
- Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E., and Prevarskaya, N. (2004). Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* *117*, 4135-4142.
- 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., 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., Zholos, A., Bidaux, G., Shuba, Y., Thebault, S., Beck, B., Flourakis, M., Panchin, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006). Ca²⁺-independent phospholipase A2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids. *J Biol Chem* *281*, 40174-40182.
- 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.
- Varvarigou, A., Bouziotis, P., Zikos, C., Scopinaro, F., and De Vincentis, G. (2004). Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biother Radiopharm* *19*, 219-229.
- Vashchenko, N., and Abrahamsson, P. A. (2005). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur Urol* *47*, 147-155.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* *76*, 387-417.
- Vias, M., Burt, G., Culig, Z., Veerakumarasivam, A., Neal, D. E., and Mills, I. G. (2007). A role for neurotensin in bicalutamide resistant prostate cancer cells. *Prostate* *67*, 190-202.

- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., *et al.* (2006a). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 16, 2073-2079.
- 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.
- Waldron, R. T., Short, A. D., Meadows, J. J., Ghosh, T. K., and Gill, D. L. (1994). Endoplasmic reticulum calcium pump expression and control of cell growth. *J Biol Chem* 269, 11927-11933.
- Wang, H. P., Pu, X. Y., and Wang, X. H. (2007). Distribution profiles of transient receptor potential melastatin-related and vanilloid-related channels in prostatic tissue in rat. *Asian J Androl* 9, 634-640.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G. V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P. S., *et al.* (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.
- Wang, X. (2004). Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7, 329-336.
- Wang, Y. H., and Shao, F. Y. (2001). [Molecular candidates for capacitative calcium entry channel]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 32, 302-306.
- Wang, Y. Z., and Wong, Y. C. (1998). Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* 35, 165-177.
- Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., *et al.* (2002a). Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* 277, 13569-13577.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., and Nilius, B. (2002b). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 47044-47051.
- 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.
- Westermann, A. M., Havik, E., Postma, F. R., Beijnen, J. H., Dalesio, O., Moolenaar, W. H., and Rodenhuis, S. (1998). Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity. *Ann Oncol* 9, 437-442.
- 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.
- Wiecha, J., Reineker, K., Reitmayer, M., Voisard, R., Hannekum, A., Mattfeldt, T., Waltenberger, J., and Hombach, V. (1998). Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human vascular cells by insulin and basic fibroblast growth factor. *Growth Horm IGF Res* 8, 175-181.
- Wisard, M., and Leisinger, H. J. (2006). [Prostate cancer prevention]. *Rev Med Suisse* 2, 163-165.
- 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.

- 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.
- Wu, C. J., Chen, Z., Ullrich, A., Greene, M. I., and O'Rourke, D. M. (2000). Inhibition of EGFR-mediated phosphoinositide-3-OH kinase (PI3-K) signaling and glioblastoma phenotype by signal-regulatory proteins (SIRPs). *Oncogene* 19, 3999-4010.
- Wu, G., Iwamura, M., di Sant'Agnese, P. A., Deftos, L. J., Cockett, A. T., and Gershagen, S. (1998a). Characterization of the cell-specific expression of parathyroid hormone-related protein in normal and neoplastic prostate tissue. *Urology* 51, 110-120.
- Wu, H. C., Hsieh, J. T., Gleave, M. E., Brown, N. M., Pathak, S., and Chung, L. W. (1994). Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer* 57, 406-412.
- Wu, K. D., Lee, W. S., Wey, J., Bungard, D., and Lytton, J. (1995). Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol* 269, C775-784.
- Wu, S. S., Chiu, T., and Rozengurt, E. (2002). ANG II and LPA induce Pyk2 tyrosine phosphorylation in intestinal epithelial cells: role of Ca²⁺, PKC, and Rho kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C1432-1444.
- Wu, T. T., Sikes, R. A., Cui, Q., Thalmann, G. N., Kao, C., Murphy, C. F., Yang, H., Zhau, H. E., Balian, G., and Chung, L. W. (1998b). Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. *Int J Cancer* 77, 887-894.
- Wuytack, F., Dode, L., Baba-Aissa, F., and Raeymaekers, L. (1995). The SERCA3-type of organellar Ca²⁺ pumps. *Biosci Rep* 15, 299-306.
- Xia, W., Mullin, R. J., Keith, B. R., Liu, L. H., Ma, H., Rusnak, D. W., Owens, G., Alligood, K. J., and Spector, N. L. (2002). Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* 21, 6255-6263.
- Xu, S. Z., Muraki, K., Zeng, F., Li, J., Sukumar, P., Shah, S., Dedman, A. M., Flemming, P. K., McHugh, D., Naylor, J., *et al.* (2006). A sphingosine-1-phosphate-activated calcium channel controlling vascular smooth muscle cell motility. *Circ Res* 98, 1381-1389.
- 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.
- Xu, Y. (2002). Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1582, 81-88.
- Xu, Y., Fang, X. J., Casey, G., and Mills, G. B. (1995). Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells. *Biochem J* 309 (Pt 3), 933-940.
- Xu, Y., Shen, Z., Wiper, D. W., Wu, M., Morton, R. E., Elson, P., Kennedy, A. W., Belinson, J., Markman, M., and Casey, G. (1998). Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *Jama* 280, 719-723.
- Xu, Y., Xiao, Y. J., Baudhuin, L. M., and Schwartz, B. M. (2001). The role and clinical applications of bioactive lysolipids in ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig* 8, 1-13.
- Yamada, T., Okajima, F., Ohwada, S., and Kondo, Y. (1997). Growth inhibition of human pancreatic cancer cells by sphingosylphosphorylcholine and influence of culture conditions. *Cell Mol Life Sci* 53, 435-441.
- Yan, J. J., Jung, J. S., Lee, J. E., Lee, J., Huh, S. O., Kim, H. S., Jung, K. C., Cho, J. Y., Nam, J. S., Suh, H. W., *et al.* (2004). Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med* 10, 161-167.

- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 *Suppl* 4, S3-8.
- Ye, D., Mendelsohn, J., and Fan, Z. (1999). Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene* 18, 731-738.
- Ye, F., Deng, P. Y., Li, D., Luo, D., Li, N. S., Deng, S., Deng, H. W., and Li, Y. J. (2007). Involvement of endothelial cell-derived CGRP in heat stress-induced protection of endothelial function. *Vascul Pharmacol* 46, 238-246.
- 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.
- Yu, M., Lin, J., Khadeer, M., Yeh, Y., Inesi, G., and Hussain, A. (1999). Effects of various amino acid 256 mutations on sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function and their role in the cellular adaptive response to thapsigargin. *Arch Biochem Biophys* 362, 225-232.
- 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.
- 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.
- Zhan, Y., and O'Rourke, D. M. (2004). SHP-2-dependent mitogen-activated protein kinase activation regulates EGFRvIII but not wild-type epidermal growth factor receptor phosphorylation and glioblastoma cell survival. *Cancer Res* 64, 8292-8298.
- 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.
- Zhou, H. E., Wan, D. S., Zhou, J., Miller, G. J., and von Eschenbach, A. C. (1992). Expression of c-erb B-2/neu proto-oncogene in human prostatic cancer tissues and cell lines. *Mol Carcinog* 5, 320-327.
- Zhou, H. Y., Zhou, J., Symmans, W. F., Chen, B. Q., Chang, S. M., Sikes, R. A., and Chung, L. W. (1996). Transfected neu oncogene induces human prostate cancer metastasis. *Prostate* 28, 73-83.
- Zhu, M. X., and Tang, J. (2004). TRPC channel interactions with calmodulin and IP3 receptors. *Novartis Found Symp* 258, 44-58; discussion 58-62, 98-102, 263-106.

