

Université des Sciences et Technologies de Lille  
Année 2007



N° d'ordre : 4136

# **THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de :

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

Discipline : Biologie-Santé

Par

**Matthieu Flourakis**

---

## **Nouveaux mécanismes de régulation de la concentration calcique réticulaire : implication dans la physiopathologie de la prostate humaine.**

---

Thèse dirigée par le Prof. Natalia PREVARSKAYA

Soutenue le 14 Décembre 2007

Jury :

Dr. P. Marchetti,	Président
Pr. P. Paterlini-Bréchet,	Rapporteur
Dr J. Cancela,	Rapporteur
Pr. N. Prevarskaya,	Examineur
Pr. R. Skryma,	Examineur
Dr. F. Van Coppenolle,	Examineur
Dr. D. Gordienko,	Examineur

## **Nouveaux mécanismes de régulation de la concentration calcique réticulaire : implication dans la physiopathologie de la prostate humaine.**

Le cancer de la prostate est la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme. Actuellement, les traitements hormonaux visent à diminuer le taux d'androgènes actifs. Malheureusement, avec le temps, les patients développent un cancer androgènes dont l'issue est fatale.

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), second messenger ubiquitaire, est impliqué dans de nombreux processus tels que l'apoptose ou la prolifération. Le Réticulum Endoplasmique (RE) est un acteur essentiel de la signalisation calcique. Ainsi, l'étude de canaux calciques réticulaires est fondamentale dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les travaux effectués ont permis d'identifier deux nouvelles protéines sur le RE : le translocon et le canal TRPM8 (Transient Receptor Potential Melastatin 8). Ces deux protéines seraient des éléments majeurs de la signalisation calcique en régulant la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE. Par ailleurs, l'étude de l'évolution de la signature calcique au cours de la cancérogenèse prostatique a permis de mettre en évidence qu'Orai1 (identifié ici comme étant la protéine responsable de l'Entrée Capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$ ) est moins exprimée dans les cancers les plus agressifs. A l'opposé, TRPV6 (Transient receptor potential Vanilloid 6), canal calcique impliqué dans l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$ , est surexprimé dans des stades avancés de cancer. Ainsi, les variations d'expression de ces protéines seraient responsables respectivement d'un défaut d'apoptose ou d'une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes. Ceci permettrait d'expliquer l'évolution du cancer de la prostate vers des stades plus agressifs.

## **New regulation mechanisms of the reticular calcium concentration : involvement in prostate physiopathology.**

Prostate cancer is the second cancer-related cause of decease. Nowadays, treatments aim at decreasing the androgen action on this organ. Unfortunately, with time, patients develop an androgen-independent cancer with fatal issue.

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), an ubiquitary second messenger, is involved in several processes such as apoptosis and proliferation. Endoplasmic Reticulum (ER) is a major actor in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. Thus, the study of ER channels is critical for developing new therapeutic strategies.

Our work led to the identification of two new ER proteins: the translocon and TRPM8 channel (Transient Receptor Potential Melastatin 8). These two channels could represent fundamental elements of calcium signalisation by regulating  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the ER. Moreover, the study of  $\text{Ca}^{2+}$  signature evolution during prostate carcinogenesis led us to show that Orail (identified here as the main carrier of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry) expression is decreased in advanced prostate cancer. Reversely, TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid 6), a  $\text{Ca}^{2+}$  channel involved in constitutive  $\text{Ca}^{2+}$  entry, is over expressed in prostate cancer later stages. Thus, variations in these proteins expression could be responsible respectively for apoptosis resistance or an increase in prostate cancer cells proliferation. This might explain the evolution of prostate cancer to more aggressive stages.



A la mémoire de ma grande mère:

*Merci de m'avoir transmis ton savoir pour que je puisse exister.*

A ma mère :

**« Avec l'amour maternel, la vie vous fait à l'aube une promesse qu'elle ne tient jamais ».**

*La Promesse de l'aube, Romain Gary*

A mon père :  
**Ο κρητικός τον θάνατο τον έχει για παιγνίδι.  
Κι όταν ο χάρος τον κτυπά το μουστακάκι στρίβει.**

*Proverbe crétois.*

A Eléonore:  
*«L'amour sans éternité s'appelle angoisse ; l'éternité sans amour s'appelle l'enfer».*

*L'Ignorance étoilée, Gustave Thibon.*



Aux membres du Jury :

Dr. P. Marchetti, Pr. P. Paterlini-Bréchet, Dr. J. Cancela, Pr. J. Parys, Dr. F. Van Coppenolle, Dr. D. Gordienko, Pr. R. Skryma, Pr. N. Prevarskaya.

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

Ayant bien conscience du temps nécessaire que vous avez consacré à la lecture et à l'analyse critique de ce travail, j'espère, humblement, avoir participé à l'enrichissement de vos connaissances sur les canaux calciques réticulaires et leur implication dans la physiopathologie de la prostate.

**Monsieur le Président**, c'est pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de présider ce jury.

**Madame le Pr. P. Paterlini-Bréchet et Monsieur le Dr. J. Cancela,**

Recevez toute ma gratitude pour votre lecture critique de ce manuscrit de thèse, pour laquelle vous avez accepté de consacrer votre temps.

**Monsieur le Professeur J. Parys et Messieurs les Docteurs F. Van Coppenolle et D. Gordienko,**

Veuillez accepter mes remerciements pour votre participation à ce jury. J'espère que mon travail dans le domaine de l'homéostasie calcique réticulaire constitue un socle pour nos collaborations futures.

**Monsieur le Professeur R. Skryma,**

Merci pour votre participation à ma thèse et pour votre aide indispensable dans les périodes les plus difficiles.

**Madame le Professeur N. Prevarskaya,**

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

## Remerciements généraux

Beaucoup de personnes ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail et ne peuvent être citées, faute de place. Qu'elles trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et plus particulièrement les membres de l'unité INSERM U800.

Pr. Prevarskaya, avec enthousiasme, disponibilité, efficacité et sympathie, vous avez encadré ces années de recherche. Vous avez pris une part prépondérante dans ma formation de jeune chercheur et m'avez donné l'envie d'aller plus loin. L'excellence est assez rare pour que l'on puisse la souligner. Vous resterez à jamais un exemple pour moi.

Je tiens à remercier le Dr. F. Van Coppenolle pour m'avoir formé à de nombreuses techniques qui m'ont permis de me passionner pour la recherche. Son soutien ainsi que ses conseils m'ont été très précieux pour entamer cette thèse sur des bases solides.

Je remercie également le Pr. Skryma pour m'avoir soutenu. Grâce à son esprit critique et sa philosophie, il représente en quelque sorte le « *pater familias* » du laboratoire.

Gabriel, plus connu aujourd'hui sous le nom de sykharot (?), comme tu le disais dans ta thèse, dommage que l'on ait travaillé ensemble aussi tard....Mais bon je suis sûr que l'on va se rattraper dans l'année qui vient.

Loïc, quand Stef m'a parlé de la première fois de ton esprit critique, je pensais qu'elle exagérerait.....et bien même pas ! Enfin bon, je le note ici tes quelques erreurs comme ça on aura tous des preuves : a *marmot* est une marmotte, a *beaver* est un castor, a *beattle* est un scarabée. Pour tous ces bons moments et pleins d'autres merci.

Stef et Monsieur le Dr LF, vous avez participé à votre façon dans cette thèse, l'un pour la pause *pint* et l'autre pour la pause-café.... Vivement votre retour au labo !!!!

Mirto, je te remerciais dans la future Taverna à l'ombre des oliviers et avec le chant doux des cigales qui nous berce!

Alan, comme je te l'ai sûrement déjà dit, je te voyais parfois plus que certains de mes collègues. En tout cas j'espère qu'avec tout les « élixirs » que j'ai bus au Tirnanog, j'aurais le droit à la jeunesse éternelle !

Benjamin, tu sais que ce n'est pas dans ces quelques lignes que je dirai ce que je pense de toi et ce n'est pas ici non plus que je ferais la métaphore du médicament .... Je sais que tu voulais que je passe ma thèse à la St Marguerite mais bon, la St Odile c'est bien non ? Cette thèse aura au moins le mérite d'être à la base de notre amitié. Je ne sais pas très bien ce que la vie nous réserve, mais j'ai confiance et je sais que tôt ou tard on fera quelque chose de bien ensemble.

Merci à ma petite famille : papa, maman, sophiaki. Vous m'avez supporté pendant cette thèse et plus largement pendant toutes mes études. Sans vous je ne serais pas là aujourd'hui. MERCI.

Eléonore, tu es la seule qui soit capable de briser ma carapace et de savoir ce que je ressens. Donc, je suis sûr que tu sais très bien ce qui se passe dans ma petite tête quand j'écris cette petite phrase. Boubourouki va....

# Table des matières

<b>GLOSSAIRE</b> -----	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b> -----	<b>18</b>
<b>I) Physiologie et physiopathologie de la prostate</b> -----	<b>19</b>
I.A) La prostate : organe exocrine-----	19
I.A.1) Anatomie générale-----	19
I.A.2) Histologie-----	21
I.A.2.a) Le stroma-----	21
I.A.2.b) Le tissu glandulaire-----	21
I.B) Fonctions de la prostate-----	22
I.B.1) Ejaculation :-----	22
I.B.2) Sécrétion :-----	22
I.C) Aspects cliniques-----	22
I.C.1) Pathologies prostatiques-----	22
I.C.1.a) La prostatite-----	23
I.C.1.b) L'adénome ou hyperplasie bénigne-----	23
I.C.1.c) L'adénocarcinome de la prostate-----	23
I.C.1.d) Le cancer prostatique neuroendocrine pur-----	25
I.C.2) Traitements anti-androgéniques-----	25
I.C.3) Traitements par alpha-bloquants-----	28
I.D) Conclusion :-----	29
<b>II) Rôle du calcium à l'échelle cellulaire</b> -----	<b>30</b>
II.A) Le Calcium : second messenger ubiquitaire-----	30
II.B) Distribution du calcium dans la cellule-----	30
II.B.1) Le calciosome-----	30
II.B.1.a) Protéines présentes sur la membrane plasmique-----	32
II.B.1.b) Les protéines intracellulaires-----	33
II.B.2) La signature calcique-----	33
II.B.2.a) Espace (Localisation)-----	34
II.B.2.b) Temps (Cinétique)-----	34
II.B.2.c) Intensité (Amplitude)-----	35
II.B.3) Conclusion-----	35
II.C) Le réticulum endoplasmique : principale source intracellulaire de calcium-----	37
II.C.1) Maintien du gradient de calcium par les SERCAs-----	38
II.C.1.a) Expression-----	38
II.C.1.b) Structure-----	39
II.C.1.c) Régulation-----	39
II.C.2) Protéines de liaison au calcium réticulaire-----	39
II.C.3) Libération de calcium par les récepteurs-canaux connus-----	40
II.C.3.a) Canaux sensibles à l'IP <sub>3</sub> -----	40
II.C.3.b) Canaux sensibles à la ryanodine-----	41
II.C.3.c) Récepteur au NAADP-----	43
II.C.4) Nouveaux types de récepteurs-canaux identifiés au niveau de la membrane du RE : les canaux TRPs-----	44
II.C.4.a) Polycystin-1 et Polycystin-2-----	49
II.C.4.b) TRPV1-----	50
II.C.4.c) TRPM2-----	50
II.C.4.d) TRPM8-----	51
II.C.5) Fuite de calcium à partir des stocks intracellulaires : une énigme de la signalisation calcique-----	52
II.C.5.a) Pompes SERCAs-----	52
II.C.5.b) Bcl-2-----	53
II.C.5.c) Canaux sensibles à l'ATP-----	54

II.C.5.d) Le complexe ribosome-translocon. -----	54
II.C.6) L'Entrée Capacitive de Calcium -----	55
II.C.6.a) STIM1 : senseur calcique indispensable à l'activation du SOC -----	57
II.C.6.b) Nature moléculaire des canaux CRAC -----	59
II.C.6.c) Orai1/CRACM1 est-il le seul responsable du CRAC ?-----	61
II.C.6.d) Mécanisme d'activation de l'ECC -----	61
II.C.6.e) Rôle des canaux SOCs -----	63
II.C.6.f) Canaux SOC et prostate-----	64
II.D) Conclusion-----	66
<b>PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS -----</b>	<b>67</b>
<b>MATERIEL ET METHODES -----</b>	<b>70</b>
<b>I) Culture cellulaire -----</b>	<b>71</b>
<b>II) Technique de microscopie par fluorescence -----</b>	<b>72</b>
II.A) Mesure de la concentration de calcium libre -----	72
II.A.1) Equipement optique -----	73
II.A.2) Charge des cellules en Fura-2/AM -----	73
II.A.3) Le Fura-2-----	73
II.B) Mesure des variations de calcium par microscopie confocale -----	74
II.B.1) Equipement optique-----	76
II.B.2) Mesure de la concentration de calcium cytoplasmique.-----	77
II.B.3) Mesure de la concentration de calcium réticulaire. -----	77
II.B.3.a) Le Mag Fluo-4 -----	78
II.B.3.b) Brefeldin A Bodipy. -----	78
II.B.4) Mesure de la concentration de calcium intra-mitochondriale.-----	79
II.B.4.a) Le Rhod-2 -----	79
II.B.4.b) Le Mitotracker-----	80
<b>III) Electrophysiologie -----</b>	<b>82</b>
III.A) Patch Clamp -----	82
III.B) Solutions utilisées -----	83
<b>IV) Immunodétection -----</b>	<b>84</b>
IV.A) Western Blot -----	84
IV.B) Technique d'immunofluorescence-----	85
<b>RESULTATS-----</b>	<b>87</b>
<b>I) Identification du canal de fuite majoritaire des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines. -----</b>	<b>89</b>
I.A) Article 1 -----	89
I.B) Conclusion -----	98
<b>II) Etude du rôle de TRPM8 dans la vidange calcique réticulaire. -----</b>	<b>99</b>
II.A) Article 2 : -----	100
II.B) Conclusion. -----	117
II.C) Résultats préliminaires : localisation de TRPM8 dans des jonctions fonctionnelles entre le RE et les mitochondries. -----	118
II.D) Article 4-----	124
<b>III) Evolution de la signalisation calcique durant la cancérogenèse prostatique -----</b>	<b>135</b>
III.A) Article 5 -----	135
III.B) Article 6 -----	156

<b>DISCUSSION</b>	<b>164</b>
<b>I) Le translocon : canal de fuite majoritaire des cellules cancéreuses prostatiques humaines.</b>	<b>165</b>
I.A) Conditions physiologiques pendant lesquelles a lieu la fuite passive de calcium	165
I.B) Le translocon est impliqué dans la vidange de calcium réticulaire induite par la thapsigargine	167
I.C) La vidange transitant par le translocon active un courant calcique de type SOC	168
I.D) Conclusion	168
<b>II) Rôle de TRPM8 dans la physiopathologie prostatique.</b>	<b>170</b>
II.A) Rôle de TRPM8 membranaire	171
II.B) Rôle de TRPM8 réticulaire	173
II.B.1) Dans les cellules musculaires lisses.	173
II.B.2) Dans les cellules épithéliales.	174
<b>III) Evolution de la signalisation calcique durant la cancérogenèse prostatique</b>	<b>176</b>
III.A) Orail et résistance à l'apoptose	177
III.B) TRPV6 et prolifération	178
III.C) Conclusion	179
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>180</b>
<b>I) Régulation de la fuite de Ca<sup>2+</sup> par le translocon</b>	<b>181</b>
I.A) Lors de la synthèse protéique	181
I.B) Lors d'un stress réticulaire	181
I.C) Par interaction avec les SERCAs	181
<b>II) Description du(es) rôle(s) physiologique(s) de TRPM8 dans la prostate.</b>	<b>182</b>
<b>III) Implication de TRPM8 dans la métastase des cellules de la prostate</b>	<b>183</b>
<b>IV) Régulation de l'activité du canal TRPM8.</b>	<b>183</b>
<b>V) Etude du mécanisme d'activation des canaux SOC</b>	<b>185</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>186</b>
<b>PUBLICATIONS</b>	<b>188</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>190</b>
<b>I) Rôle des canaux de type TRP dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques.</b>	<b>192</b>
<b>II) Résultats préliminaires : caractérisation moléculaire du Calcium Induced Factor (CIF).</b>	<b>204</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>213</b>

# Glossaire

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ -DiHydroTestostérone
[Ca <sup>2+</sup> ]	Concentration calcique
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	Concentration calcique cytosolique
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>m</sub>	Concentration calcique mitochondriale
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RE</sub>	Concentration calcique intra-réticulaire
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADPKD	Autosomal Dominant Polycystotic Kidney Disease
AR	Androgen Receptor
ARN	Acide Ribonucléique
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	Adénosine Monophosphate cyclique
cADP	cyclic ADP ribose
CIF	Calcium Influx Factor
CRAC	Calcium Release Activated Ca <sup>2+</sup> Channel/Current
DAG	Diacylglycérol
DHP	Dihydropyridine
DHPR	Dihydropyridine Receptor
EGF	Epidermal Growth Factor
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK	Human Embrionic Kidney
HBP	Hyperplasie Bénigne de la Prostate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hSMC	human Smooth Muscle Cells
IP <sub>3</sub>	Inositol TrisPhosphate
IP <sub>3</sub> R	Inositol TrisPhosphate Receptor
iPLA2	Phospholipase A2 Ca <sup>2+</sup> -indépendante

La <sup>3+</sup>	Lanthane
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LPC	Lysophosphatidyl Choline
LPI	Lysophosphatidyl Inositol
LPs	Lysophospholipides
Mg <sup>2+</sup>	Magnésium
MT	Menthol
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells
NGF	Nerve Growth Factor
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase
PCa	Prostate cancer
PrPCa	Prostate Primary Cancer cells
PrPE	Prostate Primary Epithelial cells
PSA	Prostate Specific Antigen
RE	Reticulum endoplasmique
ROC	Receptor Operated Channel
RyR	Ryanodine Receptor
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
siRNA	small interferent RNA (petits ARN interférants)
SMOC	Second Messenger Operated Channel
SOC	Store Operated Channel
STIM	STromal Interacting Molecule
TG	Thapsigargin
TGFb	Tumour Growth Factor
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Transient receptor potential Ankyrin
TRPC	Transient receptor potential Canonical
TRPM	Transient receptor potential Melastatin
TRPML	Transient receptor potential Mucolipin
TRPN	Transient receptor potential « NOMPC »
TRPP	Transient receptor potential Polycystin

TRPV                      Transient receptor potential Vanilloid  
VOC                      Voltage Operated Channel



# Introduction

*Pour être le meilleur, il suffit parfois que les autres soient moins bons.*

*Philippe Geluck*

*Extrait de Le chat*

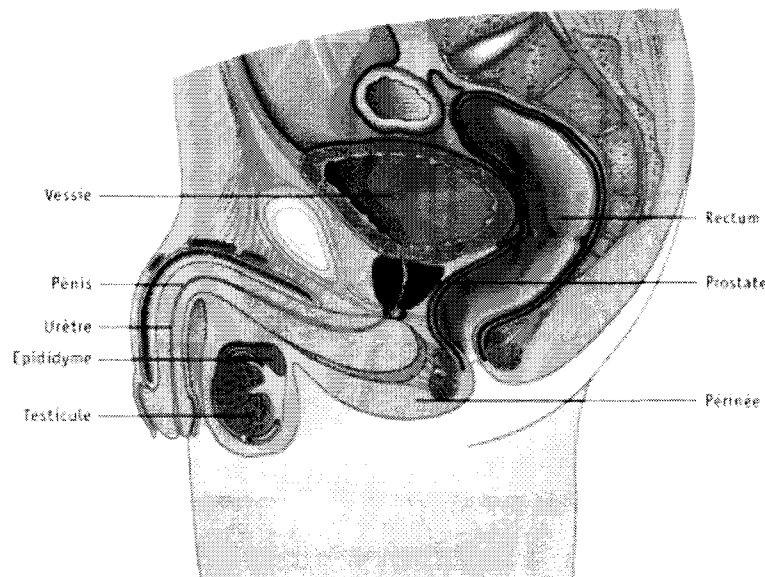
## **I) Physiologie et physiopathologie de la prostate**

### **I.A) La prostate : organe exocrine**

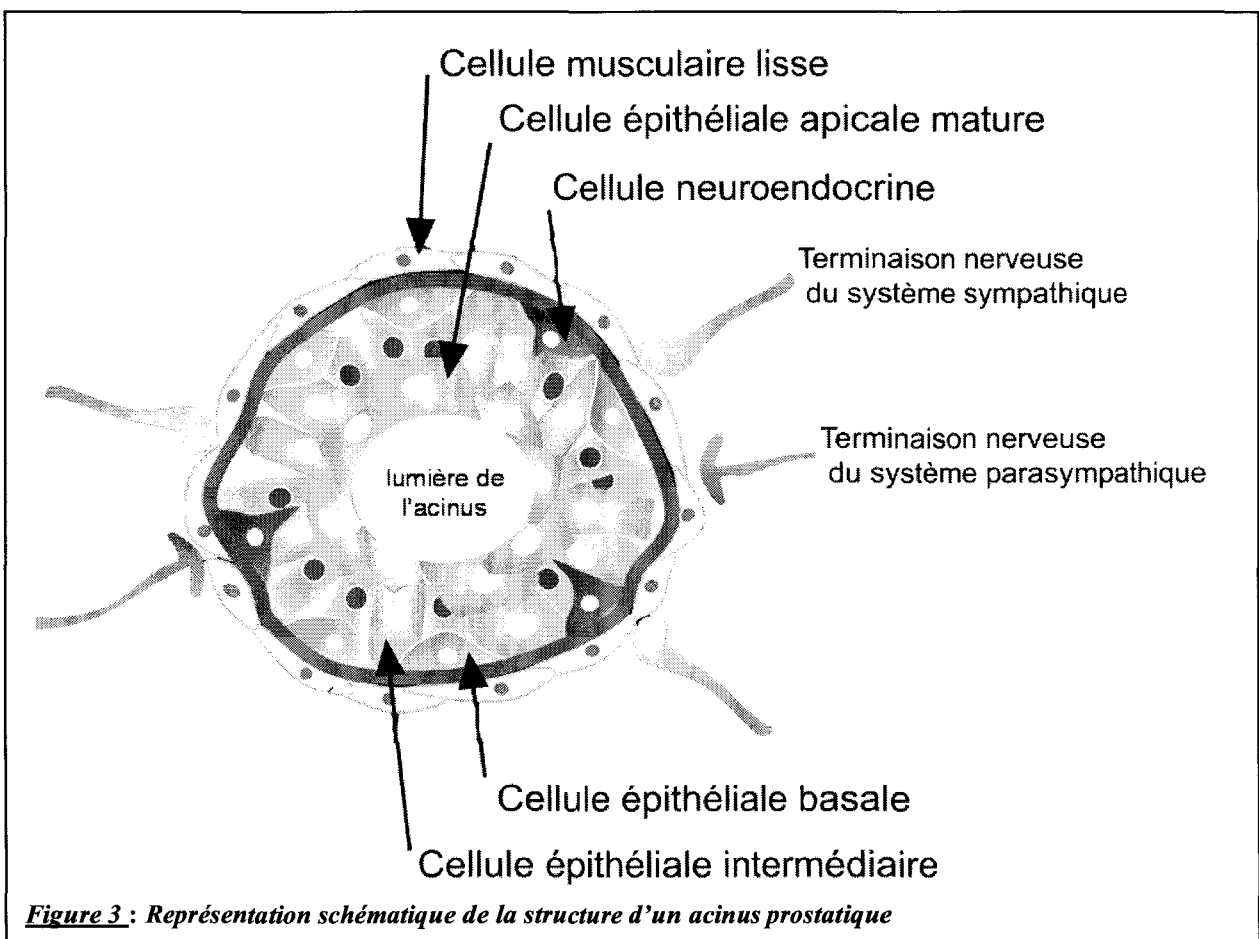
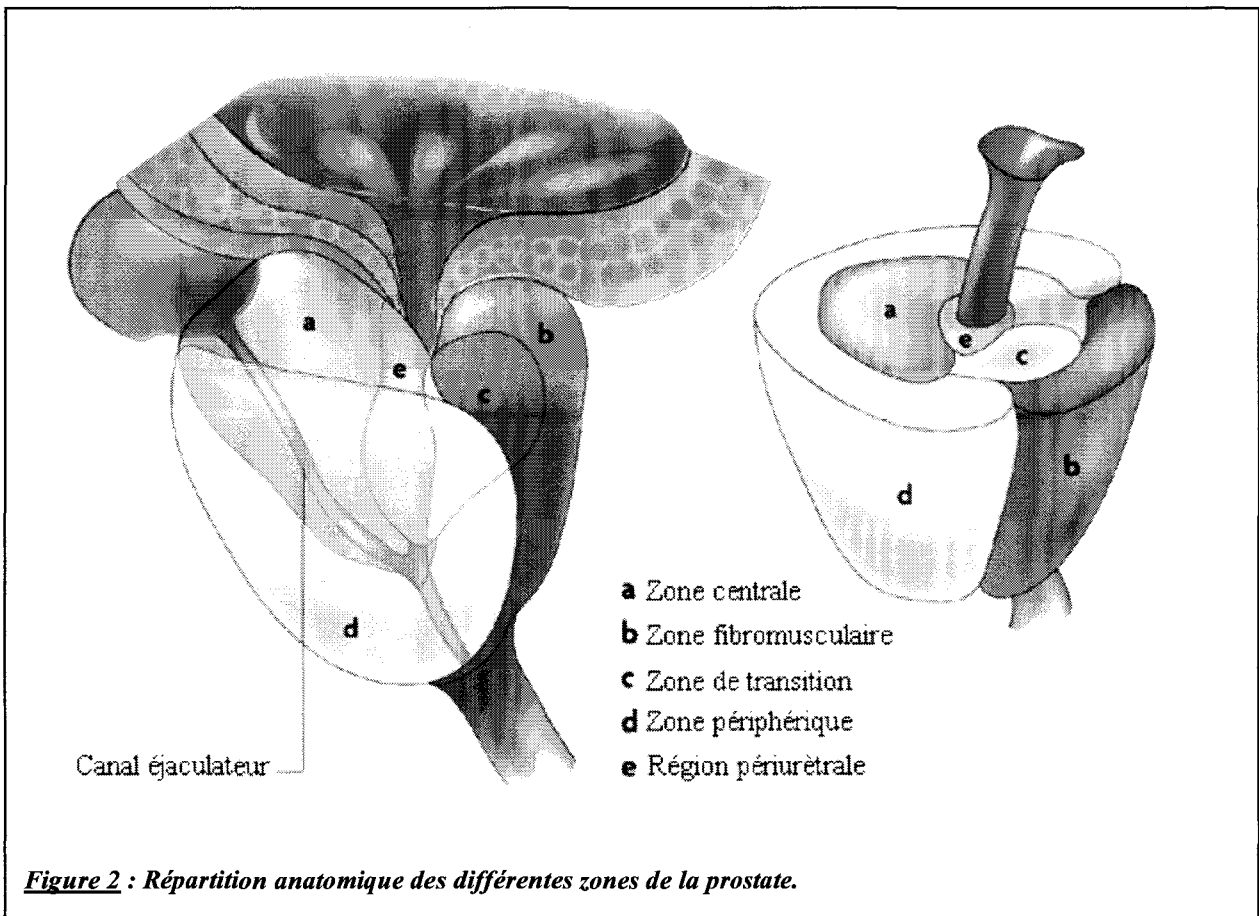
#### **I.A.1) Anatomie générale**

La prostate est un petit organe situé en dessous de la vessie et en avant de la vésicule séminale (figure 1). Cette glande exocrine, appartenant à l'appareil génital masculin, englobe le canal éjaculateur et la partie supérieure de l'urètre. Anatomiquement, la prostate est divisée en trois zones distinctes (figure 2) : (i) la zone centrale (entoure l'urètre et occupe 25 % du volume prostatique) ; (ii) la zone périphérique, plus volumineuse (englobe 70 % de la glande) et (iii) la zone pré-prostatique ou zone de transition, fine couche de tissu glandulaire, située de part et d'autre de l'urètre au centre de la prostate (ne représente que 5 % de la glande).

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



**Figure 1. Localisation de la prostate au sein de la sphère uro-génitale (coupe sagittale)**



## I.A.2) Histologie

La prostate est composée de deux couches histologiques principales : le stroma fibromusculaire et le tissu glandulaire consistant en un épithélium pseudo-stratifié. Ces deux tissus sont séparés l'un de l'autre par une lame basale (figure 3).

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

Le stroma correspond à un mélange complexe de fibroblastes et de cellules musculaires lisses. Ces dernières permettent, grâce à leur contraction, l'évacuation du liquide prostatique. 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 par la sécrétion de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF $\beta$  (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).

### I.A.2.b) *Le tissu glandulaire*

Les canaux et les acini présents dans ce tissu sont séparés du stroma par une membrane basale fine et continue sur laquelle repose l'épithélium prostatique. Le tissu glandulaire est composé de trois types de cellules : les cellules basales, les cellules luminales ou sécrétrices et les cellules neuroendocrines (figure 3).

- **Les cellules basales** sont considérées comme le compartiment de réserve de l'épithélium prostatique. 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. 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 androgéno-dépendantes (elles nécessitent des androgènes pour leur prolifération et leur survie) (Isaacs and Coffey 1989). La différenciation de ces cellules est séquentielle, ainsi lors de leur différenciation en cellules épithéliales apicales, les cellules épithéliales basales acquièrent progressivement le récepteur aux androgènes et donnent naissance à des cellules dites cellules épithéliales intermédiaires.

- **Les cellules sécrétrices** (ou cellules épithéliales apicales) 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 récepteur aux androgènes et sont dépendantes de son activation pour leur viabilité et leur capacité sécrétoire (Isaacs 1999).

- **Les cellules neuroendocrines**, présentes dans tous les compartiments glandulaires de la prostate, produisent des substances semblables aux neurohormones comme la calcitonine, la sérotonine, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et renferment également des granules sécrétoires. D'autre part, elles expriment des marqueurs de type neuroendocrinien tels que la NSE (neuron-specific enolase), un marqueur couramment utilisé pour caractériser ce type de cellules (Schmechel *et al.* 1978), ainsi que la chromogranine A (Karlsson 2001). Le rôle précis de ces cellules dans la physiologie de la prostate reste flou, mais certains travaux suggèrent que les cellules neuroendocrines participeraient au maintien de la différenciation des autres types cellulaires.

## I.B) Fonctions de la prostate

### I.B.1) Ejaculation :

Comme elle est localisée sous la vessie et entoure l'urètre, la prostate bénéficie d'une place privilégiée pour intervenir dans le processus mictionnel. Ces sphincters intraprostatiques, situés autour de l'urètre, ferment l'urètre lors de l'éjaculation.

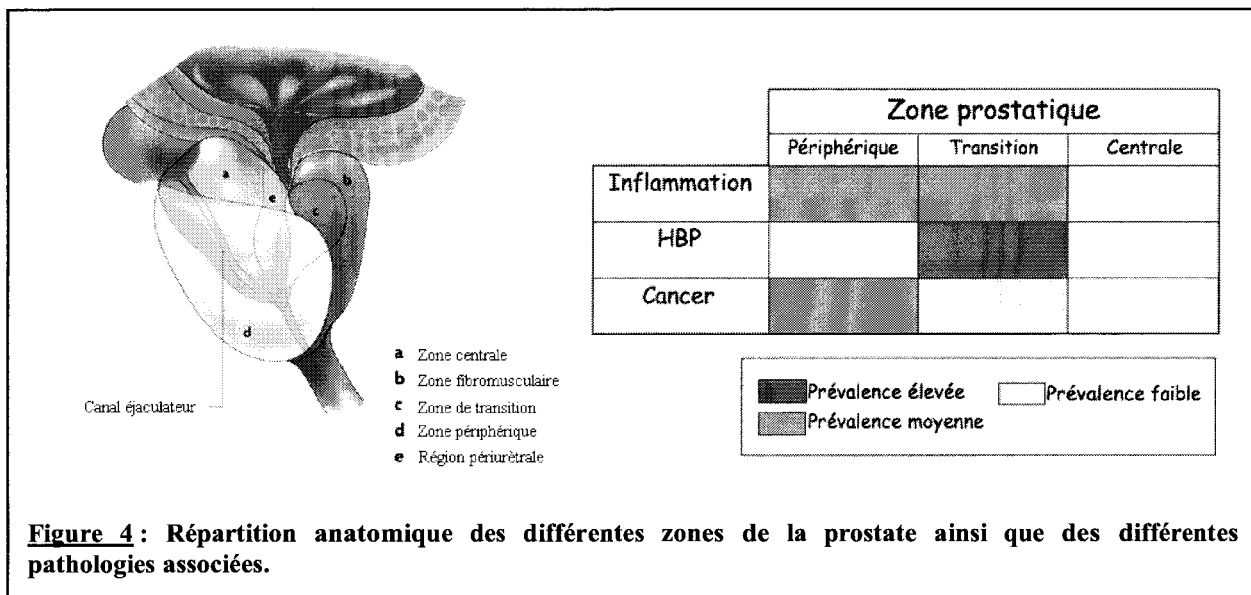
### I.B.2) Sécrétion :

La partie glandulaire de la prostate est le siège d'une sécrétion exocrine intense représentant environ 30% du sperme. Les composés du liquide prostatique sont nombreux; parmi ceux-ci, le zinc, le PSA et la neutral  $\alpha$ -glucosidase interviennent directement dans l'activation des spermatozoïdes (Elzanaty *et al.* 2002; Carpentier *et al.* 2004). La prostate possède donc un rôle, souvent méconnu, dans la reproduction.

## I.C) Aspects cliniques

### I.C.1) Pathologies prostatiques

Les pathologies prostatiques les plus fréquentes sont les prostatites (inflammations d'origine bactérienne), les adénomes (hyperplasies bénignes de l'épithélium) et les adénocarcinomes (cancers de l'épithélium). Il existe une dernière pathologie moins connue du fait de sa rareté : le cancer prostatique neuroendocrine pur.



### I.C.1.a) La prostatite

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

### I.C.1.b) L'adénome ou hyperplasie bénigne

L'adénome, ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP), est une tumeur bénigne touchant de nombreux hommes vers la cinquantaine. Cette pathologie touche principalement la zone transitionnelle et la zone périphérique de la glande (figure 4). L'adénome est caractérisé par une augmentation de la taille des cellules glandulaires ce qui entraîne le grossissement de la prostate. Cette transformation de la glande prostatique provoque une irritation ainsi qu'une obstruction de l'urètre entraînant une gêne symptomatique lors de la miction.

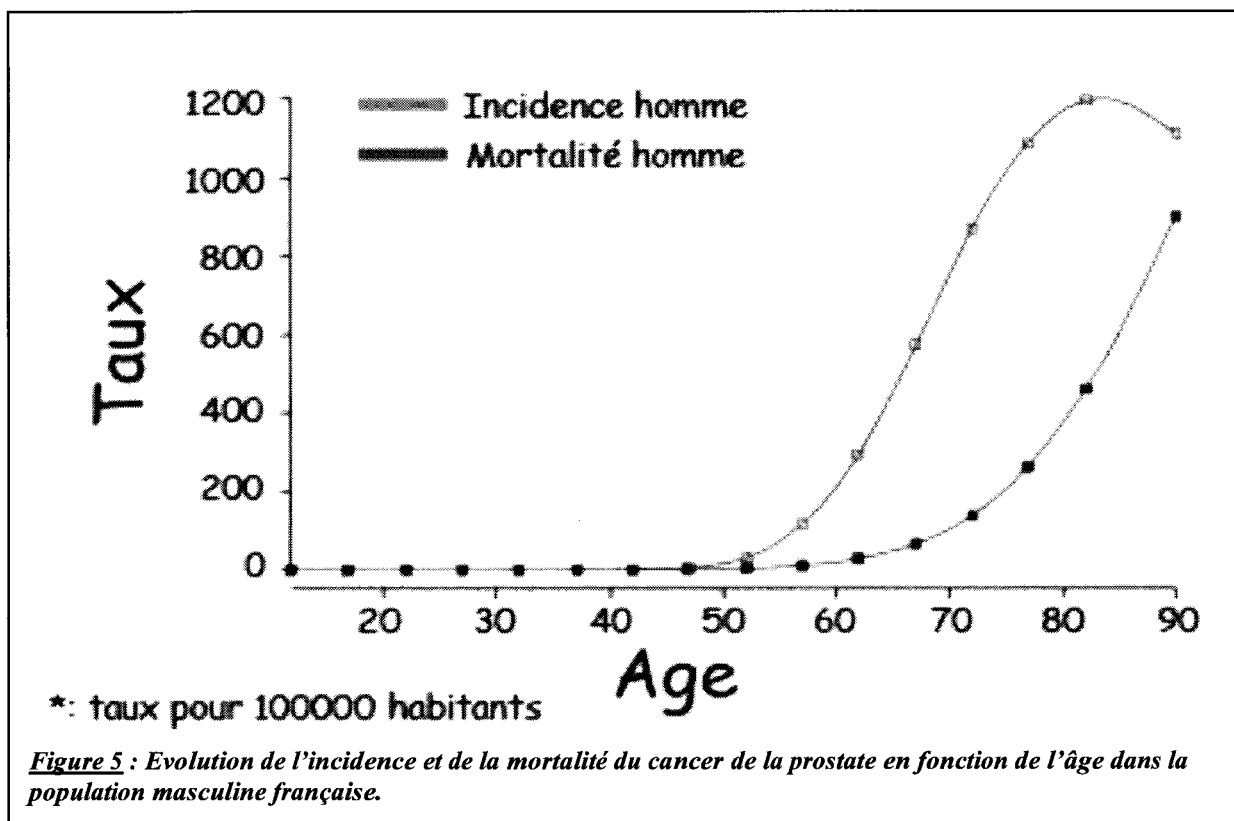
### I.C.1.c) L'adénocarcinome de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'individu de sexe masculin et représente la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme après le cancer du poumon. Dans les pays développés, l'incidence du carcinome de la prostate augmente exponentiellement avec l'âge (figure 5) et le nombre de cas déclarés croît avec l'allongement de l'espérance de vie dans les sociétés occidentales.

Des études récentes ont mis en exergue, outre les facteurs génétiques (à San Francisco, la population noire présente une incidence 2 fois supérieure à la population blanche), l'importance de facteurs environnementaux sur l'incidence de ce cancer tel que le mode alimentaire, (réf : livre, « pourquoi ce lourd tribut payé au cancer »). Ainsi, pour une classe d'âge de 35 à 64 ans, l'incidence du cancer de la prostate est 11 fois inférieure au Japon par rapport à la population Hawaïenne. Par contre, des individus d'origine japonaise vivant à

Hawaii ont une sensibilité au cancer de la prostate identique aux individus d'origine hawaïenne.

Ce cancer glandulaire se développe principalement dans la zone périphérique de l'organe, ainsi que dans la zone transitionnelle (15%) et pour 5% des cas dans la zone centrale (figure 4). D'évolution plutôt lente, ce cancer, tout d'abord in situ, peut sortir de la capsule dans les stades plus avancés pour donner des métastases locorégionales puis lointaines. Le diagnostic de ce cancer est généralement basé sur un toucher rectal, un dosage du PSA circulant, une échographie avec biopsie et une étude histopathologique pour caractériser le grade et le stade cancéreux en fonction du score de Gleason. Ce score repose sur le degré de différenciation des cellules et sur l'anaplasie cellulaire. Les scores de Gleason de 2 à 4 caractérisent des cancers de bas grades, les scores 5-7 représentent les grades médians alors que les scores supérieurs à 7 définissent les cancers les plus avancés.



Concernant le PSA, la présence de plus de 4 ng/ml de PSA total circulant (seuil de risque maximal) est généralement associée à un risque tumoral. Cependant ce dosage est souvent sujet à de nombreux faux positifs et faux négatifs. En effet, un taux de PSA entre 2 à 4 ng/ml peut être associé à un cancer. De même un taux de PSA supérieur à 4ng/mL n'est pas obligatoirement lié à un cancer prostatique. Bien qu'ayant considérablement amélioré le

dépistage du cancer de la prostate, le dosage du PSA n'est donc pas suffisant pour affirmer la présence d'un cancer.

#### *I.C.1.d) Le cancer prostatique neuroendocrine pur*

Cette pathologie rare (<5% de tous les cancers de la prostate) touche les sujets plus précocement que l'adénocarcinome (entre 30 et 40 ans) et est généralement associée à un très mauvais pronostic (Freschi *et al.* 2004). Les causes de la transformation de ces cellules neuroendocrines sont inconnues et les traitements anti-androgéniques sont sans effets, les cellules neuroendocrines étant hormono-indépendantes.

Actuellement, l'utilisation d'agents anti-androgéniques dans les thérapies contre le cancer de la prostate ainsi que d'alpha-bloquants dans la prévention des symptômes de l'HBP représente les principaux traitements de choix. Voyons dans un premier temps le traitement anti-androgénique.

#### **I.C.2) Traitements anti-androgéniques**

La découverte de l'androgène-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 dihydrotestostérone (DHT) plus précisément, dans la cancérogenèse de la prostate (Huggins *et al.* 1941).

Dans la prostate saine, les androgènes permettent par l'activation de leur récepteur nucléaire, le maintien de l'homéostasie tissulaire par un équilibre entre les taux de prolifération cellulaire et d'apoptose (ou mort cellulaire programmée, MCP) (Amirghofran *et al.* 2004). L'épithélium prostatique est hiérarchisé : les cellules basales androgène-indépendantes, en nombre limité, se divisent en cellules basales androgène-sensibles. Ces cellules ont besoin des androgènes pour proliférer, mais ne meurent pas en leur absence. Sous l'effet des androgènes, elles se différencient en cellules luminales (ou sécrétrices) androgène-dépendantes. Le nombre de ces cellules est alors important et leur taux de prolifération est en équilibre avec leur taux d'apoptose de sorte qu'il n'y ait ni régression prostatique ni prolifération excessive. Dans ces conditions, la prostate est composée d'une population cellulaire hétérogène, comprenant des cellules épithéliales androgène-indépendantes, androgène-sensibles et androgène-dépendantes. Par contre, en absence d'androgènes, les cellules sécrétrices ne se différencient pas, les cellules basales androgène-sensibles ne prolifèrent plus mais leur nombre se maintient puisque leur survie ne dépend pas des androgènes.



La croissance pathologique de la prostate est également sous contrôle androgénique. C'est la raison pour laquelle les traitements actuels des tumeurs de la prostate ont pour objectif de diminuer les taux sériques d'androgènes (castration ou privation par agoniste de la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) et anti-androgènes stéroïdiens ou non stéroïdiens), afin de ralentir la progression tumorale. En effet, le retrait des androgènes, par castration chimique et/ou chirurgicale, entraîne la mort cellulaire programmée des cellules prostatiques androgéno-dépendantes (Colombel *et al.* 1996).

Le retrait des androgènes, efficace dans un premier temps, aboutit quasi systématiquement à un échappement thérapeutique dû à l'évolution des cellules tumorales d'un état androgéno-dépendant vers un état androgéno-indépendant. A partir de ces cellules tumorales, se développe une tumeur résistante à la privation hormonale et à la chimiothérapie. De tels cancers sont très agressifs et échappent à tout traitement actuellement connu.

Le récepteur aux androgènes est impliqué à différents niveaux dans la capacité du cancer prostatique à se développer indépendamment des androgènes. D'une part, l'expression des récepteurs aux androgènes croît afin d'utiliser plus efficacement les taux d'androgènes résiduels (Visakorpi *et al.* 1995). D'autre part, les récepteurs aux androgènes subissent des mutations qui leur permettent de lier d'autres ligands comme l'œstradiol ou des antiandrogènes. Ces mutations permettent également la phosphorylation de ce récepteur (étape obligatoire pour la translocation nucléaire) par la protéine kinase A activée par des facteurs de croissance comme l'IGF ou EGF (Gaddipati *et al.* 1994; Culig *et al.* 1996; Culig *et al.* 1996) (Prinsloo and Van Aswegen 2000).

Les mécanismes proposés pour expliquer l'échappement thérapeutique sont principalement liés soit à (i) un défaut d'apoptose, (ii) à la perturbation de la prolifération cellulaire, ou (iii) à la différenciation neuroendocrine.

#### **(i) Défaut d'apoptose :**

L'apoptose est un mécanisme physiologique tenant un rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (McConkey and Orrenius 1997). En effet, dans les tissus capables de se renouveler grâce à la division cellulaire par mitose, l'apoptose s'oppose à ce mécanisme pour éliminer les cellules en excès et maintenir ainsi leur nombre constant. Ce processus contrôlé génétiquement est activé par des stimuli physiologiques, intra ou extracellulaires, mais aussi par des stimuli pathologiques qui portent atteinte au bon fonctionnement de la cellule, tels qu'une infection virale, un choc thermique, un stress oxydatif ou des dommages causés à l'ADN. Cependant, ce mécanisme physiologique peut s'altérer et conduire à diverses pathologies dont le cancer, notamment celui de la prostate

(Thompson 1995). Ce défaut d'apoptose des cellules cancéreuses est généralement lié à des mutations ou à une expression anormale de gènes spécifiques, comme le gène *p53* (le gardien du génome, à action pro-apoptotique) qui est fréquemment inactivé par mutation dans les tumeurs (Sionov and Haupt 1999). A l'inverse, l'oncogène *bcl-2* (B-cell lymphoma-2), qui exerce un rôle protecteur contre la MCP, est souvent surexprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques entre autres. Cette surexpression entraîne donc un défaut d'apoptose (Chaudhary *et al.* 1999) donnant un avantage en terme de survie aux cellules tumorales par rapport aux cellules saines (Raffo *et al.* 1995).

### **(ii) Perturbation de la prolifération :**

Le développement du cancer de la prostate a été plus souvent considéré comme résultant d'un défaut d'apoptose. Néanmoins, des altérations de la prolifération seraient également impliquées dans le processus de cancérisation. En effet, parallèlement à l'échappement thérapeutique aux androgènes, une évolution du phénotype paracrine de l'épithélium vers un phénotype autocrine est observée. Il est de surcroît démontré que les tumeurs androgéno-indépendantes prolifèrent plus que celles qui demeurent sensibles aux androgènes (Zhou *et al.* 2004). Ceci est corrélé à une augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance (EGF, NGF, bDNF, NT3, NT4/5 etc...) et du nombre de récepteurs tyrosine kinases (Fong *et al.* 1992; Prewett *et al.* 1996; Montano and Djamgoz 2004). Les travaux de Stattin *et al.* décrivent notamment que l'IGF-1 qui accroît la prolifération et diminue l'apoptose des cellules prostatiques est présent à un taux élevé dans les tumeurs prostatiques et pourrait donc être un bon marqueur pronostic du cancer de la prostate (Stattin *et al.* 2004). Des travaux de notre laboratoire ont montré que l'EGF induit une augmentation de la prolifération cellulaire corrélée entre autres à une hausse du taux de calcium réticulaire (Legrand *et al.* 2001).

De plus, lors de la cancérisation, de nombreux autres facteurs tels que stat-3, NFkB, la vitamine D voient leur expression varier dans le sens d'une augmentation de la prolifération (Lee *et al.* 2004; Stewart and Weigel 2004; Suh and Rabson 2004). Ces facteurs sont connus pour réguler la prolifération des cellules prostatiques tant au niveau de l'entrée dans le cycle cellulaire, de l'induction d'apoptose, des voies de signalisation des facteurs de croissance suscités. Un travail récent du laboratoire a de surcroît démontré que l'ATP extracellulaire, *via* les récepteurs purinergiques de type P2Y couplés à la PLC (phospholipase C), induit un arrêt de la croissance des cellules épithéliales cancéreuses androgéno-indépendantes (Vanoverberghe *et al.* 2003). Actuellement, les études s'orientent donc vers : (i) la recherche

et la confirmation de nouvelles cibles (ii), le développement de nouveaux outils pharmacologiques tels que des analogues de la vitamine D3 qui inhibe la prolifération prostatique.

**(iii) La différenciation neuroendocrine :**

Depuis peu, un intérêt croissant s'est porté sur la différenciation neuroendocrine dans le cancer de la prostate car elle semble avoir une signification pronostique bien que les avis à ce sujet soient divergents (Abrahamsson 1999). Les cancers de la prostate avec différenciation neuroendocrine sont en effet associés à de très mauvais pronostics. Plusieurs phénomènes pourraient être à l'origine de cette différenciation neuroendocrine. Des études récentes montrent que les traitements anti-androgéniques augmentent le nombre de cellules neuroendocrines dans les tumeurs (Abrahamsson 1999). Les traitements ne feraient donc que sélectionner des cellules neuroendocrines androgéno-indépendantes aux dépens des cellules androgéno-dépendantes. Une autre hypothèse propose que les cellules neuroendocrines tumorales, présenteraient un dysfonctionnement de sécrétion (défaut ou hyper sécrétion), et pourraient par une stimulation paracrine anormale des cellules saines, rendre ces dernières également tumorales (Nakada *et al.* 1993). Enfin, il a été suggéré que l'acquisition des caractéristiques neuroendocrines s'effectue au cours de la progression tumorale. Ainsi, suite à une transformation maligne, une cellule épithéliale ou basale développerait des caractéristiques neuroendocrines et serait alors régulée par des mécanismes androgéno-indépendants.

### I.C.3) Traitements par alpha-bloquants

Utilisés dans le traitement de l'HBP, les alpha-bloquants provoquent la relaxation des cellules musculaires lisses en inhibant la voie de la PLC, impliquant la vidange des stocks calciques via l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) (Huang *et al.* 1999). Des travaux récents montrent qu'en plus de cet effet de relaxation, les alpha-bloquants peuvent induire l'apoptose des cellules musculaires lisses et épithéliales prostatiques (Kyprianou *et al.* 1998).

Des études récentes du laboratoire ont mis en évidence dans les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines l'expression de récepteurs alpha1A-adrénergiques fonctionnels, couplés à des canaux cationiques non sélectifs *via* l'action directe du diacylglycérol (DAG), et démontrent que ces récepteurs régulent la prolifération cellulaire.

Ainsi, la stimulation chronique des récepteurs alpha1A-adrénergiques entraînerait une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines.

#### **I.D) Conclusion :**

**La compréhension des phénomènes moléculaires impliqués dans l'évolution des cellules tumorales vers l'échappement hormonal représente un axe de recherche essentiel pour le développement de nouvelles thérapeutiques efficaces contre ce cancer. La recherche de nouveaux marqueurs et cibles thérapeutiques pour pallier à cet échappement s'avère donc cruciale. Des études récentes indiquent que les altérations de l'homéostasie calcique et de la modulation du fonctionnement des canaux ioniques pourraient jouer un rôle important dans la régulation des processus contrôlant la prolifération, la différenciation et l'oncogenèse. Dans la prochaine partie, nous allons présenter l'importance de l'homéostasie calcique et de sa régulation par les canaux ioniques.**

## **II) Rôle du calcium à l'échelle cellulaire**

### **II.A) Le Calcium : second messenger ubiquitaire**

Le choix du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), en tant que second messenger intracellulaire au cours de l'évolution, s'est probablement imposé du fait de la flexibilité de cet ion en tant que ligand. Il est donc se lier de façon réversible à des molécules complexes, en particulier les protéines, dans des conditions correspondant à un environnement intracellulaire (Williams 2002).

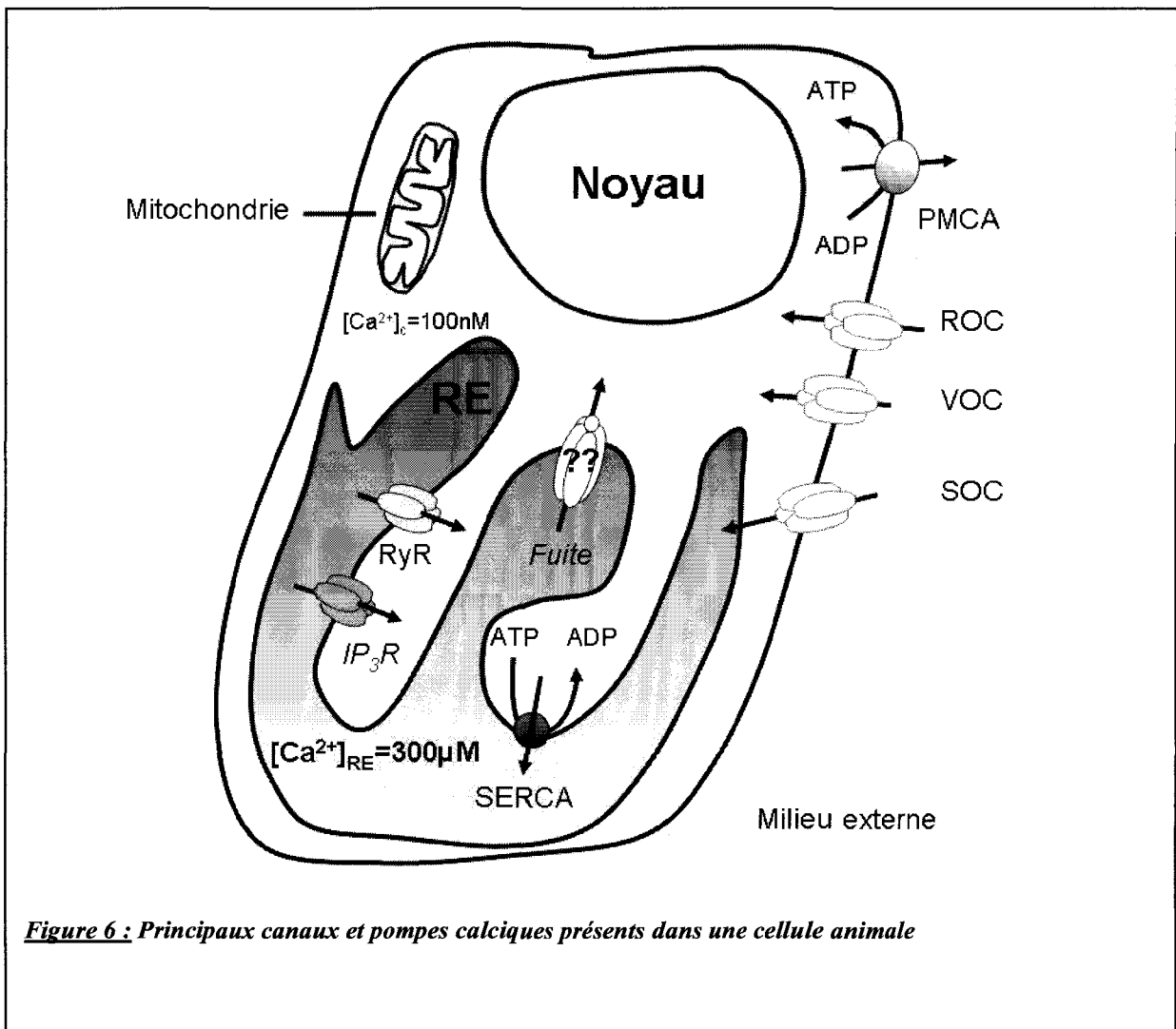
### **II.B) Distribution du calcium dans la cellule**

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est l'ion dont la concentration est la plus finement régulée au niveau de la cellule. Globalement, sa concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) est de l'ordre de 1 mM dans le milieu extracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ ) et dans le réticulum endoplasmique (RE), mais oscille de 100 nM à plus de 1  $\mu\text{M}$  dans le cytosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ). La cellule maintient donc un fort gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}=1/10000$ ). Pour cela, les cellules utilisent des pompes calciques et des échangeurs, au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des organites (ex : RE et mitochondries). Ceci confère aux organites intracellulaires un rôle majeur de tampon calcique dans la cellule.

La répartition du  $\text{Ca}^{2+}$  n'est pas homogène. On distingue le  $\text{Ca}^{2+}$  sous une forme dite libre et sous une forme chélatée par des protéines. Cette dernière correspond à un état d'interaction avec une protéine qui empêche le  $\text{Ca}^{2+}$  d'interagir avec d'autres acteurs sensibles à ce cation. Ces protéines chélatrices sont présentes aussi bien dans les organites tels que le RE (ex : la calréticuline, la calbindine) que dans le cytosol (ex : la calmoduline, la calcineurine) (figure 5). La compartimentation du  $\text{Ca}^{2+}$  et sa concentration cytosolique sont donc stables dans le temps, d'où le terme d'homéostasie calcique.

#### **II.B.1) Le calciosome**

Le « *calciosome* » se définit comme l'ensemble des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique et/ou dans les signaux calciques. Le calciosome est constitué de trois types de protéines: les transporteurs assurant la diffusion des ions d'un compartiment cellulaire à un autre, les protéines chélatrices permettant de contrôler le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  libre au sein d'un compartiment et les protéines senseur de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 6 :** Principaux canaux et pompes calciques présents dans une cellule animale

L'homéostasie calcique cellulaire est, par définition, l'équilibre entre les entrées (influx), les sorties (efflux) et le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'homéostasie calcique est donc directement responsable du maintien de la compartimentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule et ainsi du maintien de la possibilité pour cet ion de jouer le rôle de second messager. En effet, au repos, les différents acteurs impliqués dans l'homéostasie calcique maintiennent une concentration de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  très faible par rapport au milieu extracellulaire et aux stocks intracellulaires.

Un signal calcique correspond donc à un ou plusieurs flux de  $\text{Ca}^{2+}$  entre compartiments à l'origine d'un message à l'échelle moléculaire qui conduit à la modulation d'une fonction cellulaire. Dès qu'un canal laissant passer du  $\text{Ca}^{2+}$  s'active, l'ion accède au cytoplasme de la cellule et peut interagir avec des protéines partenaires sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces acteurs spécifiques intègrent le signal, entraînant l'activation ou la modulation d'une fonction cellulaire. Afin d'illustrer cette cascade d'événements, nous pouvons citer le cas des

cardiomyocytes dans lesquels les influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par les récepteurs à dihydropyridines (DHPR) couplés à la vidange des stocks calciques réticulaires induisent une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique qui active directement la troponine C (TnC). Cette dernière, une fois liée au  $\text{Ca}^{2+}$ , initie alors la contraction de la fibre musculaire cardiaque.

De nombreuses protéines présentes sur la membrane plasmique ou au niveau intracellulaire permettent de réguler de façon spécifique la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans la cellule. Parmi celles-ci, voyons tout d'abord les protéines présentes sur la membrane plasmique.

### *II.B.1.a) Protéines présentes sur la membrane plasmique.*

Tout d'abord la membrane plasmique possède des pompes appelées PMCAs (pour Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) et des transporteurs (comme l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) pour faire sortir le  $\text{Ca}^{2+}$  hors de la cellule et ainsi maintenir le gradient de concentration des ions calciques de part et d'autre de la membrane plasmique.

Il existe également des canaux calciques classés en fonction de leur stimulus d'activation (figure 6) :

#### **Les canaux de type ROC (Receptor-Operated Channels)**

Ce sont par définition des récepteurs-canaux. L'exemple le plus connu est le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (ACh) dont l'ouverture est stimulée directement par la fixation du ligand sur son récepteur. L'ouverture du canal n'est donc pas tributaire de voies de signalisation intracellulaires.

#### **Les canaux de type VOC (Voltage-Operated Channels)**

Il s'agit de canaux dont l'ouverture se produit consécutivement au changement du potentiel de membrane. Ces canaux interviennent en particulier dans la création du potentiel d'action (PA) des cellules excitables, mais jouent également un rôle dans les cellules dites « non-excitables » (ne générant pas de PA). Notons enfin que les canaux voltage-dépendants sont directement activés par une variation de potentiel membranaire et ne sont pas uniquement modulés par le potentiel. En effet, l'ensemble des canaux ioniques lorsqu'ils sont activés génère des courants ohmiques, c'est-à-dire directement proportionnels au potentiel de membrane.

#### **Les canaux de type SMOC (Second Messenger-Operated Channels)**

Il s'agit des canaux activés par l'intermédiaire de seconds messagers générés suite à l'activation d'un récepteur membranaire. Par exemple, l'activation des récepteurs muscariniques de type M1 (M1, M3 et M5) par l'acétylcholine entraîne l'activation de la

PLC qui catabolise le  $\text{PIP}_2$  et forme de l' $\text{IP}_3$  et du DAG. Le DAG peut alors agir comme second messenger et activer un canal SMOC.

### Les canaux de type SOC (Store-Operated Channels)

Il s'agit, par définition, de canaux ioniques activés consécutivement à la déplétion des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  libre du RE et sont responsables de l'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$  (ECC), aussi appelée SOCE (Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry), qui constitue l'entrée principale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules non-excitables (§ II. C.6).

Outre les protéines présentes sur la membrane plasmique, il existe également des protéines intracellulaires permettant de réguler la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

#### II.B.1.b) Les protéines intracellulaires

Au niveau du réticulum endoplasmique, d'autres canaux et pompes calciques contrôlent les flux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  entre le cytosol et le milieu intra-réticulaire (Berridge 1996). En effet, la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans le réticulum est critique pour certaines fonctions majeures telles que la maturation des protéines ou l'apoptose. La cellule régule donc finement la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans cet organite (Breckenridge *et al.* 2003; Brostrom and Brostrom 2003). Ainsi, plusieurs mécanismes sont impliqués: (i) la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  est maintenue grâce aux  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA pour Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) qui pompent le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme vers le RE et grâce à la fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RE par des protéines chaperonnes comme la calréticuline ou la calnexine (Ihara *et al.*, 1999 ; Saito *et al.*, 1999) ; (iii) libération provoquée de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à l'activation du récepteur  $\text{IP}_3$  et/ou du récepteur ryanodine en réponse à différents stimuli agissant sur des récepteurs membranaires ou libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par d'autres récepteurs canaux présents sur le RE; (iv) fuite passive et continue de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE grâce à des canaux encore non identifiés appelés « canaux de fuite » (v) enfin, l'Entrée capacitive de calcium : influx de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu extracellulaire permettant de remplir le RE suite à une vidange calcique du RE. (§ II. C 6)

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'homéostasie calcique revêt donc un intérêt primordial. En effet, il est bien établi que l'activité des canaux calciques régule de nombreuses voies de signalisation.

#### II.B.2) La signature calcique

La « signature calcique » d'une fonction cellulaire désigne les propriétés d'un ou plusieurs signaux calciques à l'origine de cette fonction. La signature calcique est définie par



3 paramètres fondamentaux caractérisant cette modification de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, à savoir la localisation, la cinétique, et l'amplitude du flux calcique. (figure 7)

### *II.B.2.a) Espace (Localisation)*

On distingue deux grands types de signaux calciques : ceux provenant du milieu extracellulaire et ceux provenant des stocks intracellulaires. Les premiers correspondent à l'activation de protéines canaux au niveau de la membrane plasmique de la cellule. Les seconds sont la conséquence de la synthèse de certains seconds messagers capables de mobiliser les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires.

Il est important de noter que la vidange de  $\text{Ca}^{2+}$  peut également se produire spécifiquement dans un organite tel que le noyau. En effet, la continuité des membranes nucléaires et réticulaires définit un ensemble de citernes. La localisation spécifique des canaux ioniques sur la membrane nucléaire permet de limiter spatialement l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  et garantit donc la spécificité du signal.

Au-delà de l'origine intra- ou extracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$ , on distingue ensuite l'étendue du signal dans la cellule, qui définit directement la spécificité des mécanismes induits (Clapham *et al.* 1993). Les événements confinés à de petites régions pré-membranaires interviennent dans des processus fins comme la sécrétion de neurotransmetteurs par les neurones. Les événements de plus grande amplitude spatiale, tels que les vagues calciques intracellulaires, correspondent à de plus grandes variations de  $\text{Ca}^{2+}$  et à l'activation de protéines réparties dans toute la cellule. De tels signaux régulent de grandes fonctions cellulaires telles que la sécrétion dans les cellules épithéliales polarisées (Cancela *et al.* 2002) ou la contraction des cardiomyocytes. On distingue enfin des signaux de plus grande amplitude, touchant plusieurs cellules adjacentes, telles que les vagues intercellulaires. Ces dernières sont liées à l'expression de protéines intercellulaires spécifiques (ex : les connexines). Ces signaux sont responsables d'une synchronisation entre les cellules permettant par exemple la contraction efficace d'un ensemble de fibres musculaires, et le bon fonctionnement d'un organe contractile comme le coeur.

### *II.B.2.b) Temps (Cinétique)*

Au-delà de la régulation spatiale, la régulation temporelle des signaux calciques est le deuxième élément de codage du signal calcique. Il est généralement admis que des signaux calciques transitoires modulent des fonctions telles que la sécrétion ou la prolifération (Dolmetsch *et al.* 1998), tandis qu'une augmentation soutenue de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique ou mitochondriale déclenche l'apoptose des cellules (Vanoverberghe *et al.* 2004). Une

diminution de la  $[Ca^{2+}]$  dans un compartiment code également un signal. Ainsi, l'apoptose des cellules peut également être provoquée par une diminution de la  $[Ca^{2+}]$  dans la lumière du réticulum endoplasmique (Pinton *et al.* 2001).

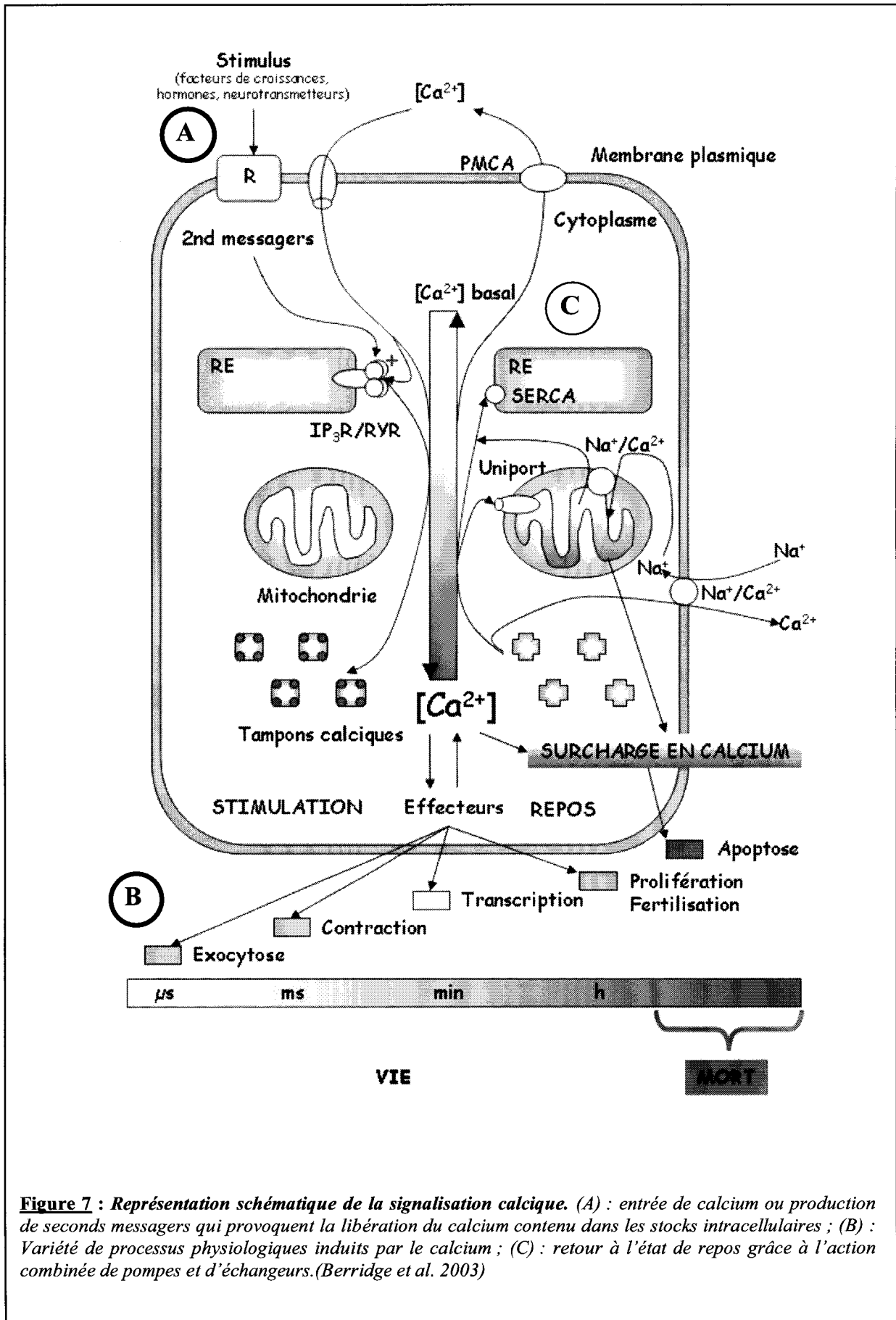
La régulation temporelle du signal calcique est un phénomène complexe qui fait intervenir tous les types d'acteurs de l'homéostasie calcique. Concernant l'ECC, dont nous avons détaillé l'origine précédemment, elle correspond à un phénomène soutenu qui peut perdurer plus d'une heure, alors que la vidange du réticulum endoplasmique qui l'active ne dure pas plus d'une dizaine de minutes (Lewis 2001). Une étude récente a démontré que cette prolongation de l'activité de l'ECC était en partie due au relargage lent du  $Ca^{2+}$  absorbé par les mitochondries lors de la déplétion initiale des stocks réticulaires de  $Ca^{2+}$  (Hoth *et al.* 2000). Ceci est une parfaite illustration de la complexité des signaux calciques et la multiplicité des acteurs impliqués.

### *II.B.2.c) Intensité (Amplitude)*

Un signal calcique peut être décomposé en événements calciques élémentaires. On peut donc considérer que c'est l'intégration de ces signaux en un signal d'amplitude supérieure au seuil d'activation des protéines effectrices qui déclenche une fonction cellulaire. On observe en effet que chaque protéine sensible au  $Ca^{2+}$  possède une affinité spécifique pour cet ion qui détermine à la fois la  $[Ca^{2+}]$  à partir de laquelle suffisamment de protéines effectrices pourront être activées pour déclencher une fonction cellulaire et à la fois la  $[Ca^{2+}]$  au-delà de laquelle ces protéines ne sont plus activées de façon spécifique. Il apparaît alors logique qu'en fonction de la  $[Ca^{2+}]$  atteint par le signal, celui-ci activera certaines protéines effectrices et pas d'autres.

### **II.B.3) Conclusion**

L'ion calcique est donc impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la sécrétion, la prolifération ou l'apoptose. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'homéostasie calcique est donc primordiale. Dans ce cadre, les protéines les plus étudiées sont les protéines présentes sur la membrane plasmique. Cependant, un nombre croissant d'études semble indiquer un rôle très important du RE dans la physiologie cellulaire. En effet, le RE représente la principale source de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Ainsi, l'étude des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique intra-réticulaire est très importante.



**Figure 7 : Représentation schématique de la signalisation calcique.** (A) : entrée de calcium ou production de seconds messagers qui provoquent la libération du calcium contenu dans les stocks intracellulaires ; (B) : Variété de processus physiologiques induits par le calcium ; (C) : retour à l'état de repos grâce à l'action combinée de pompes et d'échangeurs. (Berridge et al. 2003)

## II.C) Le réticulum endoplasmique : principale source intracellulaire de calcium

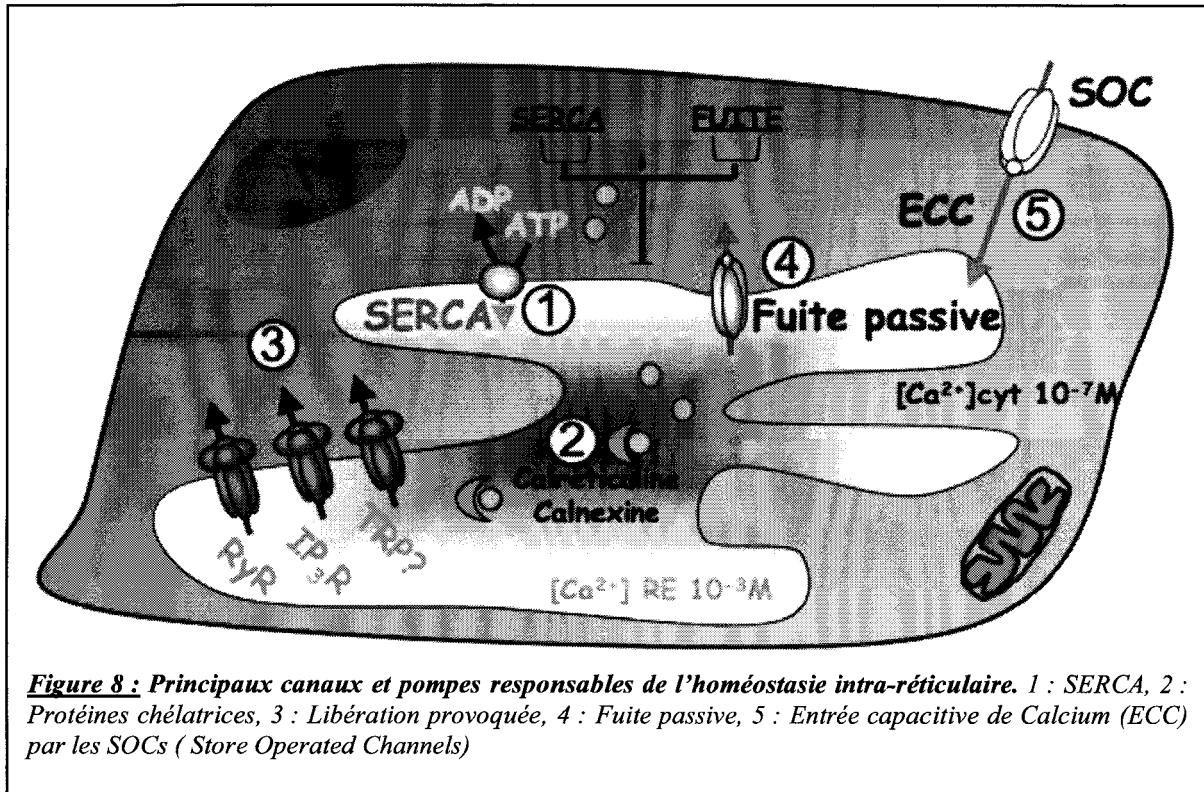
De nombreux organites intracellulaires comme les mitochondries, le noyau, l'appareil de Golgi, servent de réserves calciques intracellulaires mais le RE constitue la majeure partie de cette réserve calcique. La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du RE ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ) est de l'ordre du mM (Bastianutto *et al.* 1995). Ainsi, pour la signalisation calcique, outre le  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu extracellulaire, les cellules ont accès à une source majeure de  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans le réticulum endoplasmique (Figure 6).

Le rôle du RE ne se limite pas à sa participation dans l'homéostasie calcique intracellulaire. En effet, la lumière du RE est également un environnement parfaitement adapté pour la synthèse, les modifications post-traductionnelles et la conformation des protéines. Le maintien d'une concentration élevée en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum est essentiel pour l'exécution de ces processus (Pour revue voir (Michalak *et al.* 1998)). En outre, des altérations au niveau des concentrations calciques du RE peuvent déstabiliser cet équilibre physiologique et provoquer l'apoptose.

C'est pourquoi l'homéostasie calcique au niveau du RE est finement régulée. Elle est le résultat de l'équilibre entre la sortie et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RE. Ainsi, plusieurs mécanismes sont impliqués: (i) la capture du  $\text{Ca}^{2+}$  qui est séquestré dans le RE par les  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA pour Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase); (ii) la fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RE par des protéines chaperonnes comme la calréticuline ou la calnexine (Ihara *et al.* 1999; Saito *et al.* 1999); (iii) la libération provoquée de  $\text{Ca}^{2+}$  par le récepteur  $\text{IP}_3$  et/ou le récepteur ryanodine en réponse à différents stimuli agissant sur des récepteurs membranaires ou la libération provoquée de  $\text{Ca}^{2+}$  par d'autres récepteur canaux présents sur le RE; (iv) la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE grâce à des canaux encore non identifiés appelés « canaux de fuite » (Figure 8). Enfin, il existe un dernier mécanisme essentiel à l'homéostasie intra-réticulaire : l'Entrée capacitive de calcium (ECC) : cet influx de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu extracellulaire permet de remplir le RE suite à une vidange.

Ainsi, pour participer à l'homéostasie calcique et au maintien de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire, différents canaux et pompes calciques permettent de réguler les échanges calciques au travers du réticulum endoplasmique.

Voyons tout d'abord les protéines SERCA, principales responsables de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme vers le RE.



## II.C.1) Maintien du gradient de calcium par les SERCAs

### II.C.1.a) Expression

Trois principales isoenzymes de SERCA (SERCA1, 2, et 3) ont été clonées et leurs différentes isoformes identifiées (Lytton and MacLennan 1988; Burk *et al.* 1989; Lytton *et al.* 1989; Gunteski-Hamblin *et al.* 1992). Le gène *SERCA1* code pour deux isoformes, SERCA1a (chez l'adulte) et SERCA1b (chez le fœtus) exprimées principalement dans les muscles squelettiques à contraction rapide (MacLennan *et al.* 1985). Le gène *SERCA2* code également pour deux isoformes : SERCA2a exprimée principalement dans le cœur et les muscles squelettiques à contraction lente. SERCA2b, quant à elle, est exprimée dans de nombreux tissus dont les muscles lisses et également dans la plupart des tissus non musculaires (Lytton, Zarain-Herzberg, Periasamy *et al.* 1989; Gunteski-Hamblin, Clarke and Shull 1992). Enfin, deux isoformes ont également été identifiées pour le gène *SERCA3* et sont principalement exprimées dans les cellules endothéliales, épithéliales et hématopoïétiques (Burk, Lytton, MacLennan *et al.* 1989; Wu *et al.* 1995).

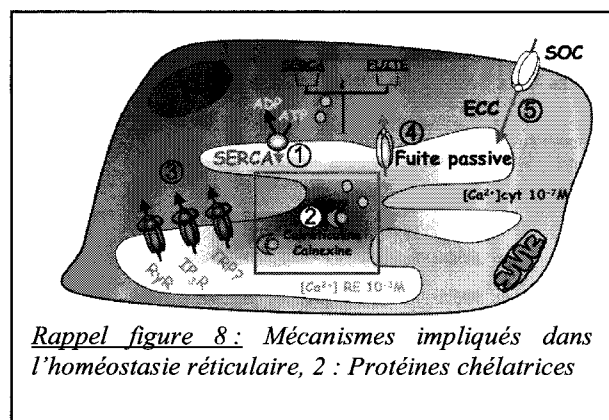
### II.C.1.b) Structure.

La structure et le mécanisme de fonctionnement des différentes SERCAs sont similaires (Inesi *et al.* 1990; MacLennan *et al.* 1997). La fixation de deux ions calciques du cytosol sur chaque molécule de SERCA à l'état inactivé permet la phosphorylation de l'enzyme par l'ATP. Cette phosphorylation provoque un changement de conformation de la pompe provoquant la libération dans la lumière du RE des deux ions calciques. En échange, la pompe capture deux protons dans la lumière du RE. La régénération des sites de haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  s'effectue après hydrolyse de l'enzyme et la libération des deux protons dans le cytosol.

### II.C.1.c) Régulation

L'expression des SERCAs peut être modulée par différents facteurs comme des hormones (Rohrer *et al.* 1991), des facteurs de croissance (Magnier *et al.* 1992), ou encore des seconds messagers comme le monoxyde d'azote (Cohen *et al.* 1999).

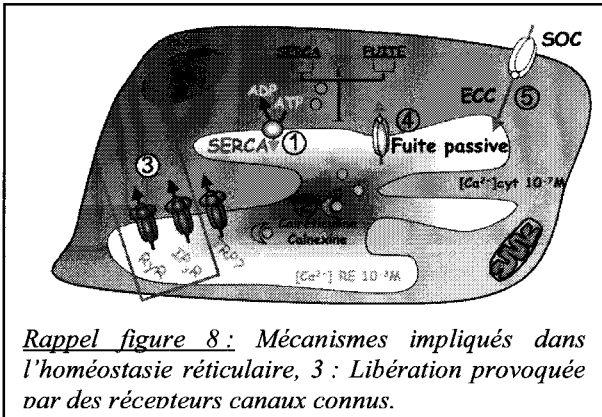
## II.C.2) Protéines de liaison au calcium réticulaire



Différentes protéines réticulaires comme la calnexine ou la calréticuline sont capables de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  dans la lumière du RE (Arnaudeau *et al.* 2002). Ces protéines se caractérisent par leur faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ordre de 1 mM. Ces protéines sont présentes dans le RE en quantité

La calréticuline est une protéine chaperonne qui possède un site de haute affinité et 25 sites de faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Nash *et al.* 1994). Au niveau de la prostate, son expression est sous le contrôle des androgènes. En effet, le gène codant la calréticuline est un gène de réponse précoce aux androgènes. De ce fait, cette protéine est impliquée dans des processus cellulaires dépendants des androgènes comme l'apoptose des cellules prostatiques (Zhu and Wang 1999).

### II.C.3) Libération de calcium par les récepteurs-canaux connus.



Une fois que le  $\text{Ca}^{2+}$  est stocké dans le RE, plusieurs voies de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  sont possibles. Voyons tout d'abord les voies de libérations provoquées connues.

#### II.C.3.a) Canaux sensibles à l' $\text{IP}_3$

La famille des récepteurs à l' $\text{IP}_3$  constitue la seconde famille de récepteurs canaux impliquée dans l'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks réticulaires. De nombreux récepteurs des hormones ou des neurotransmetteurs sont couplés aux phospholipases C par l'intermédiaire de protéines G ou à des tyrosines kinases. En présence d'agonistes, ces phospholipases produisent notamment l' $\text{IP}_3$  qui peut alors diffuser jusqu'à son récepteur situé sur la membrane du réticulum.

Ce récepteur est particulièrement exprimé dans les neurones de Purkinje du cervelet. C'est un tétramère constitué de quatre sous-unités identiques dont chacune lierait de manière équivalente une molécule d' $\text{IP}_3$ . Des expériences de délétions ont permis une étude structure-fonction de ce récepteur et une mise en évidence de trois domaines fonctionnels (Patel *et al.* 1999) : le domaine N-terminal, cytosolique, possède le site de fixation spécifique à l' $\text{IP}_3$  ; le domaine C-terminal est constitué de régions hydrophobes permettant au récepteur de s'insérer dans la membrane. La région « P » située entre la cinquième et la sixième région transmembranaire constitue le pore du canal. Le domaine C-terminal est également impliqué dans la tétramérisation du récepteur ; un domaine régulateur qui possède de nombreux sites de fixation à de petites molécules et protéines régulatrices comme l'ATP, des kinases (Protéine Kinase C), la Calcium Calmoduline Kinase II (CamKII) et des protéines de liaison au cytosquelette (ankyrine)

Le récepteur  $\text{IP}_3$  est surtout exprimé au niveau de la membrane du RE (Pozzan *et al.* 1994) mais également au niveau de l'enveloppe nucléaire (Mak and Foskett 1997), l'appareil de Golgi (Pinton *et al.* 1998), les vésicules de sécrétion (Blondel *et al.* 1994) et même au

niveau de la membrane plasmique en association avec les cavéolines (Fujimoto *et al.* 1992). Trois types de récepteurs IP<sub>3</sub> (type I, II, III) codés par 3 gènes distincts ont été identifiés chez les mammifères. De plus, les transcrits de ces gènes peuvent subir un épissage alternatif donnant naissance à des sous-familles.

La vitesse de dissociation de l'IP<sub>3</sub> est influencée par divers facteurs comme androgènes et les cations bivalents. Lorsqu'il est activé, ce récepteur se comporte comme un canal calcique, dont l'ouverture induit une libération massive d'ions calciques. A des valeurs proches de la concentration cytosolique en ions Ca<sup>2+</sup>, de l'ordre de 10 à 300nM, le Ca<sup>2+</sup> est un coactivateur des récepteurs à l'IP<sub>3</sub>. En revanche, lorsque la concentration cytosolique en ion Ca<sup>2+</sup> augmente au-delà de 500nM, le Ca<sup>2+</sup> devient inhibiteur. Les récepteurs IP<sub>3</sub> sont également régulés par le Ca<sup>2+</sup> réticulaire. En effet, de nombreux sites de liaison au Ca<sup>2+</sup> sur ces récepteurs sont impliqués dans ces rétrocontrôles : le domaine N-terminal possède deux sites cytosoliques dont la liaison au Ca<sup>2+</sup> permet de moduler l'affinité du récepteur pour l'IP<sub>3</sub> (Pietri *et al.* 1990) : le domaine C-terminal, au niveau de la région « P », est capable de fixer le Ca<sup>2+</sup> et l'activité des récepteurs IP<sub>3</sub> est alors régulée par la concentration en Ca<sup>2+</sup> réticulaire. Une surcharge du RE en Ca<sup>2+</sup> augmenterait la sensibilité des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> alors qu'une chute de la concentration en Ca<sup>2+</sup> réticulaire diminuerait cette sensibilité (Missiaen *et al.* 1992).

### II.C.3.b) Canaux sensibles à la ryanodine

Les récepteurs à la ryanodine (RYR) ont été mis en évidence et caractérisés d'abord au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS) des fibres musculaires striées cardiaques et squelettiques, où leur rôle dans le phénomène d'excitation-contraction a été bien caractérisé (Fleischer *et al.* 1985; Pessah *et al.* 1985; Missiaen *et al.* 1992; Sorrentino and Volpe 1993). Ces récepteurs sont également exprimés au niveau du RE des cellules non musculaires comme les cellules cérébrales (Ashley 1989), les cellules épithéliales (Socci *et al.* 1993) et en particulier les cellules prostatiques humaines (Mariot *et al.* 2000).

Le RYR présente de fortes homologies de structure avec le récepteur à l'IP<sub>3</sub>, mais les modalités d'activation de ces deux types de récepteurs sont très différentes. Le RYR est un récepteur canal formé de 4 sous-unités identiques de 560kDa, possédant des sites de liaison et d'activation pour la ryanodine, un alcaloïde végétal (pour revue, voir (Dulhunty *et al.* 1996)). Les parties C-terminales de chacune des isoformes interviennent dans la formation du canal calcique tandis que les parties N-terminales constituent une tête cytosolique. Ces quatre sous-unités forment une structure comprenant un pore central. Ces sous-unités sont issues de trois



gènes distincts (*ryr1*, *ryr2*, et *ryr3*) codant pour différentes isoformes de RYRs. On dénombre ainsi jusque neuf isoformes différentes de RYRs, dont trois majeures (RYR 1-3).

Chez l'homme, RYR1 est exprimé préférentiellement dans le muscle squelettique, RYR2 dans les cellules cardiaques, le cerveau et de nombreux autres types cellulaires et RYR3 dans le muscle lisse, le cerveau et les cellules non-excitables (Giannini *et al.* 1995; Bennett *et al.* 1996). Cependant, il n'est pas rare que plusieurs types de RYRs soient coexprimés au sein d'un même type cellulaire (pour revue, voir (Sutko and Airey 1996)). Par exemple, pour les cellules non excitables, ce sont surtout RYR2 et RYR3 qui sont exprimés (Ozawa 2001).

Les RYRs contiennent dans leur partie cytoplasmique un site de fixation à haute affinité ( $K_a < 1 \mu\text{M}$ ), et trois sites de fixation à faible affinité ( $K_a > 50 \mu\text{M}$ ) pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Meissner *et al.* 1997). La fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  au site de haute affinité ouvre le canal, tandis que la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  aux sites de faible affinité, le ferme (pour revue, voir (Sutko *et al.* 1997)). Ainsi, une faible augmentation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme à proximité des RYRs déclenche la libération du contenu des stocks calciques intracellulaires en stimulant le RYR. Ce processus appelé «  $\text{Ca}^{2+}$  Induced  $\text{Ca}^{2+}$  Release » (CICR) a été mis en évidence pour la première fois par Endo *et al.*, en 1970. Suite à l'ouverture du canal, il y a une rapide inactivation de celui-ci qui résulterait de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  aux calmodulines (CaMs) cytoplasmiques. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ainsi formé se lierait aux RYRs pour les inactiver (Fuentes *et al.* 1994). Il existe un deuxième mécanisme par lequel le  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans les stocks sensibles à la ryanodine peut être libéré. Au niveau des cellules musculaires, le fonctionnement des canaux RYR est souvent associé à celui des canaux calciques membranaires voltage dépendants (VOC). Dans la cellule cardiaque, l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants de type L engendre une élévation de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  qui ouvre les canaux-récepteurs de la ryanodine du RS. Cette coopération entre VOC et canaux du RS rend compte du couplage excitation-contraction dans le cœur. Dans le muscle squelettique, la dépolarisation membranaire provoque l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants de type L qui, ici, jouent le rôle de détecteur de potentiel. La dépolarisation entraîne alors un changement de conformation du canal VOC qui est transmis au RYR permettant son activation. Ce mécanisme est appelé « Depolarization-Induced Calcium Release » et c'est un contact physique qui permet la coopération entre VOC et canal du RS.

D'autres travaux montrent également que ces récepteurs sont sensibles à un dérivé du nicotinamide-adénine-dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ), l'adénine diphosphate-ribose cyclique (ADPR cyclique) (pour revue, voir (Ozawa 2001)). En effet, en 1987 Clapper *et al.* ont découvert que

l'ADPRc, métabolite du NAD<sup>+</sup>, libérait du Ca<sup>2+</sup> à partir des microsomes d'oursins de mer désensibilisés à l'IP<sub>3</sub>. L'enzyme qui forme l'ADPRc est l'ADPribosyl cyclase. L'ADPRc agirait sur le RYR stimulant ainsi le « Ca<sup>2+</sup> Induced Ca<sup>2+</sup> Release ». Cependant, l'ADPRc semble agir sur le RYR par l'intermédiaire d'une protéine non encore identifiée. Finalement, l'action de l'ADPRc semblerait dépendre de la présence de la calmoduline.

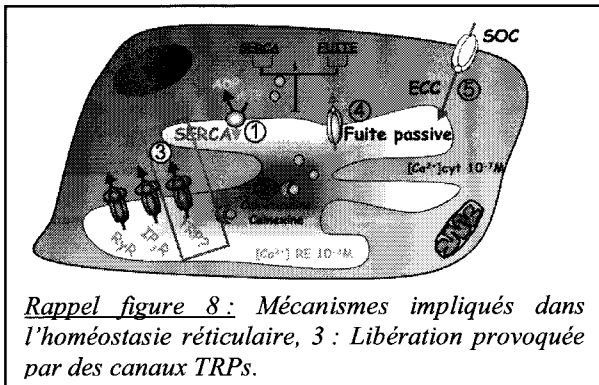
### *II.C.3.c) Récepteur au NAADP*

Des travaux récents montrent que le NAADP (métabolite du NADP<sup>+</sup>) peut provoquer une libération du Ca<sup>2+</sup> contenu dans le RE (Lee 2000). L'enzyme responsable de la synthèse du NAADP est l'ADPribosyl cyclase. Le NAADP libère du Ca<sup>2+</sup> d'une réserve insensible à la thapsigargine, réserve qui peut être physiquement séparée de celles mobilisées par l'IP<sub>3</sub> et l'ADPRc (Genazzani and Galione 1997; Lee and Aarhus 2000). Le récepteur au NAADP n'a pas encore été identifié, mais de nombreuses caractéristiques ont été mises en évidence suggérant l'existence d'un récepteur spécifique au NAADP.

Le rôle de ces trois types de récepteurs canaux dans l'homéostasie calcique intra-réticulaire est bien établi. Cependant, depuis quelques années, un nouveau type de canaux calciques a été mis en évidence. Les canaux TRPs (Transient Receptor Potential) ont été identifiés sur la membrane plasmique et sont impliqués dans une large gamme de processus physiologiques tels que la prolifération, la migration ou l'apoptose. Récemment, des études ont indiqué que certains de ces canaux TRPs peuvent également être exprimés sur la membrane du RE. Ainsi, l'étude de ces nouveaux canaux réticulaires revêt une importance primordiale pour la compréhension de l'homéostasie calcique intra-réticulaire.

De plus, certains de ces TRPs sont associés à des pathologies telles que le mélanome, la polykistose rénale ou certaines hypomagnésies. L'étude des mécanismes d'activation et de régulation de ces nouveaux canaux réticulaires pourrait être indispensable à la compréhension de la survenue de certaines pathologies comme le cancer de la prostate.

## II.C.4) Nouveaux types de récepteurs-canaux identifiés au niveau de la membrane du RE : les canaux TRPs.



Dans cette partie, nous allons étudier les différents canaux TRPs exprimés sur le RE.

La première utilisation du sigle « TRP » date de 1977 et désigne un mutant de la *Drosophile* présentant une altération du processus de photo-transduction (Minke 1977). Ce mécanisme a été étudié par l'utilisation de l'électrorétinogramme (ERG) traduisant l'activité électrique oculaire du nerf optique de la drosophile. Le mutant TRP était caractérisé par le caractère transitoire de la dépolarisation mesurée par ERG conduisant à l'altération de la vision. Chez la drosophile, le pigment photosensible, la rhodopsine, est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine Gq, responsable de l'activation d'une PLC-β. L'activité de cette enzyme régule à son tour l'ouverture d'une protéine-canal située sur la membrane plasmique. Ces drosophiles possédaient en fait une mutation sur le gène codant le canal ionique impliqué dans la transduction de l'information lumineuse. Ce gène fut appelé *trp* pour « Transient Receptor Potential » en raison du caractère transitoire de la dépolarisation sur l'ERG. Par la suite, différents travaux ont démontré que chez la drosophile, le canal TRP fonctionnait en synergie avec un autre canal qui fut désigné TRP-Like (TRPL) (Montell 1998).

Les recherches se sont ensuite portées sur la caractérisation des orthologues des canaux TRPs et TRPL chez les mammifères. Dans un premier temps, sept gènes furent clonés auxquels plus de vingt furent ajoutés en quelques années (Montell *et al.* 2002). Il faut également ajouter à ce nombre la possibilité d'ARNm alternatifs pour certains canaux TRPs ce qui augmente considérablement le nombre de protéines à classer dans cette superfamille (Vazquez and Valverde 2006).

L'analyse phylogénétique de tous ces gènes a permis de les classer par groupes (Montell, Birnbaumer and Flockerzi 2002).

Chez les Mammifères, les 32 gènes ont été classés en 7 sous-familles ((Pedersen *et al.* 2005), Figure 9).

TRPC (7 membres) pour « Canonique » ou « Classique » en raison de leur forte homologie avec la protéine TRP découverte initialement chez la drosophile ;

TRPV (6 membres) en référence au premier membre de cette famille (TRPV1 ou récepteur aux « Vanilloïdes ») ;

TRPM (8 membres) en référence également au premier membre de cette famille (TRPM1 ou « Mélastatine ») qui a été cloné à partir d'une lignée cellulaire murine de mélanome ;

TRPML (3 membres) pour les « MucoLipines » ;

TRPP (5 membres) issus à l'origine de deux gènes polycystic kidney diseases 1 et 2 (PDK1 pour TRPP1, et PDK2 pour TRPP2) ;

TRPN (1 membre) il se distingue des autres TRP par la présence au niveau de son extrémité amino-terminale de nombreux domaines ankyrines répétés (Montell 2003) ;

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

Les canaux d'un même groupe possèdent des structures protéiques primaires et secondaires proches. On observe ainsi une structure commune à l'ensemble des canaux TRPs, puis des éléments spécifiques à chaque sous-famille.

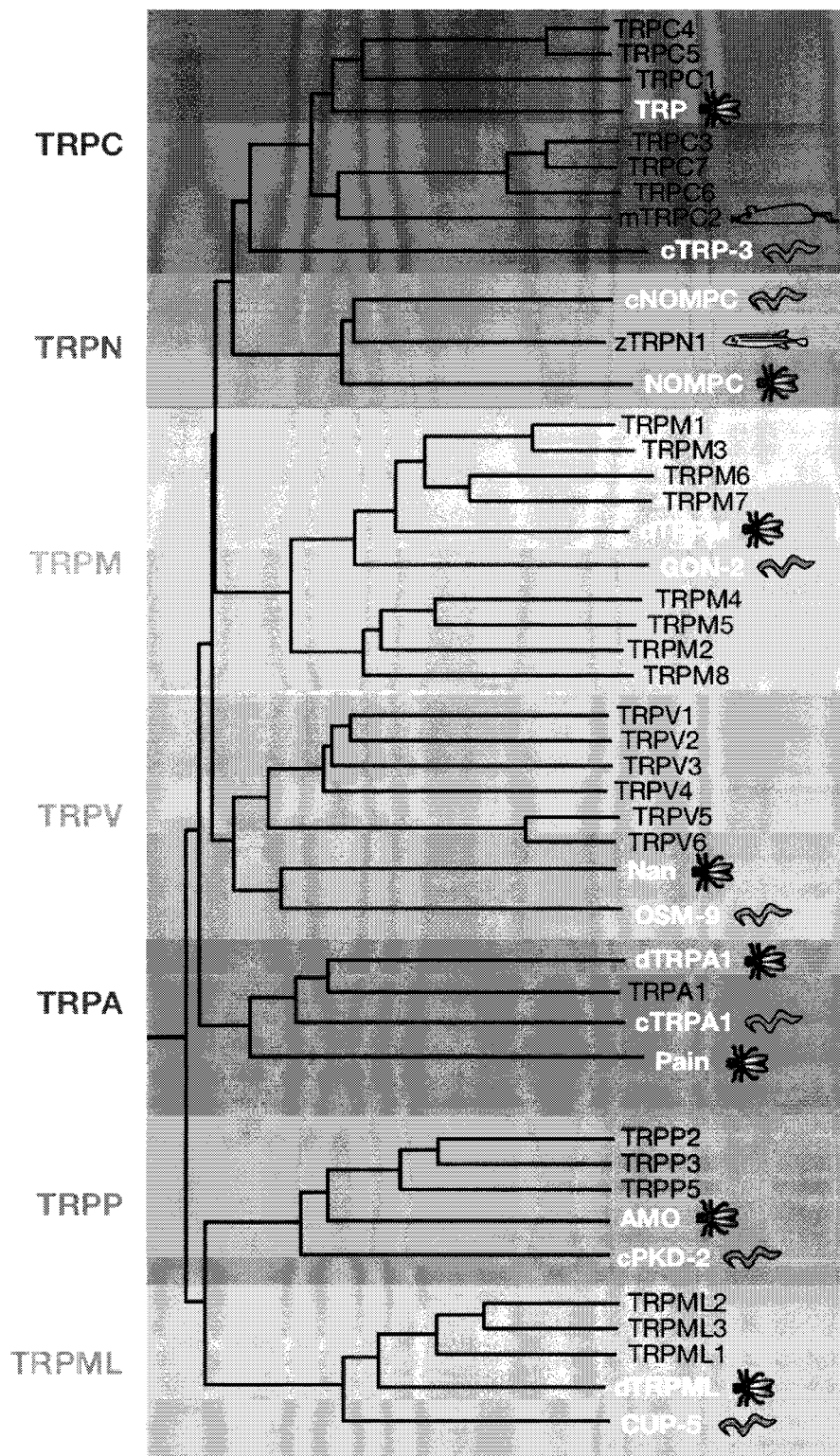
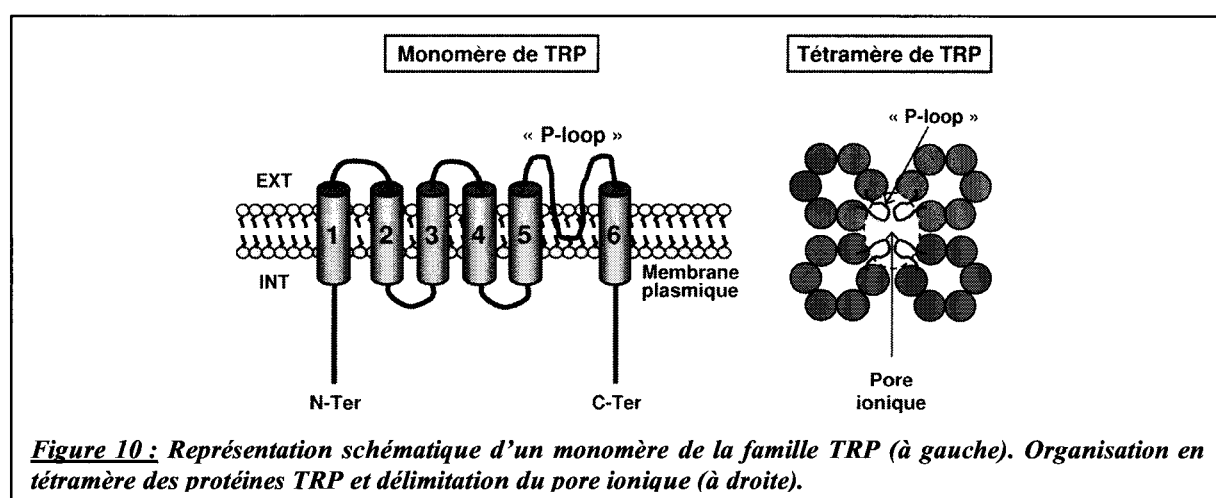


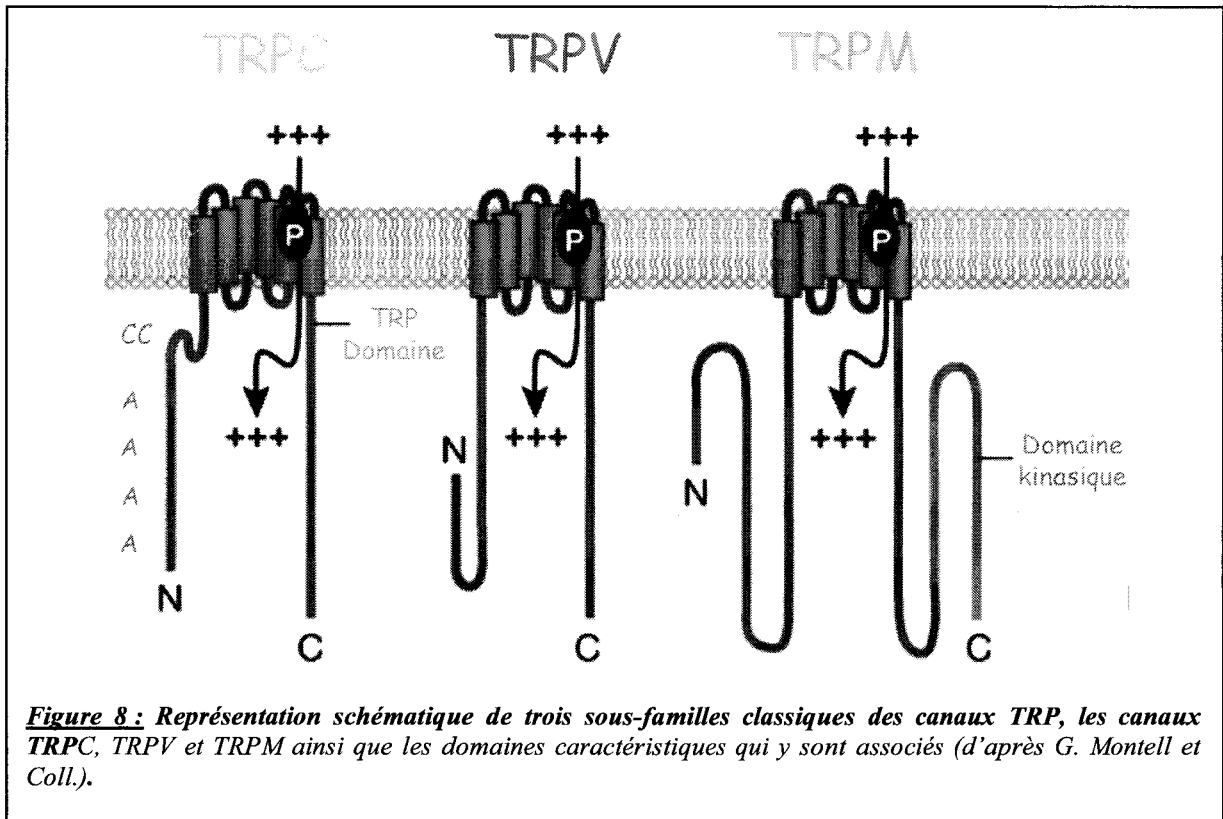
Figure 9 : Arbre phylogénétique représentant la superfamille des canaux TRP (d'après G. Montell et Coll.)

La structure générale d'un canal TRP comprend 6 segments transmembranaires hydrophobes, chacun séparé par de petites boucles hydrophiles (figure 10). Les deux boucles carboxy- et amino-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 5 et 6 comprend une boucle-P (« P-loop »), partiellement conservée par rapport à celle des canaux potassiques voltage-dépendants « Shaker », et forme le filtre de sélectivité du pore ionique. Contrairement aux canaux calciques voltage-dépendants, aucun senseur de voltage n'a été détecté dans le segment 4 des canaux TRPs. Cette analyse est en accord avec les résultats démontrant que les canaux de type TRP ne sont pas voltage-dépendants au sens classique du terme.



Concernant les spécificités propres à chaque sous-famille (figure 11), on distingue un domaine « TRP », adjacent au 6<sup>ème</sup> segment transmembranaire, qui est conservé dans les canaux TRPs et TRPL de la drosophile ainsi que dans les groupes C et M chez les mammifères. Il a été proposé que ce segment soit impliqué dans la régulation de l'activité des canaux par certains lipides comme le Phosphoinositol bisphosphate - PIP<sub>2</sub> (Lee *et al.* 2005; Hardie 2006; Nilius *et al.* 2006). On retrouve enfin des domaines ankyrines, principalement impliqués dans l'interaction des canaux avec le cytosquelette, conservés dans la boucle amino-terminale des familles TRPC et TRPV. La structure quaternaire des canaux TRPs a été déduite de leur homologie avec les canaux potassiques voltage-dépendants, puis démontrée pour le canal TRPV1 par western-blot en condition non dénaturante (Kedei *et al.* 2001). Ainsi, ces canaux seraient soit des homo- soit des hétérotétramères. Il a été en effet démontré que les monomères de TRPC1 peuvent s'associer avec les monomères de TRPC3, C4, C5 et C6 (Amiri *et al.* 2003), alors que les monomères de TRPM6 peuvent former un canal

fonctionnel en s'associant avec des monomères de TRPM7 (Chubanov *et al.* 2004). Il a également été montré que des monomères de TRPV5 et de TRPV6 pouvaient s'associer pour former des canaux fonctionnels (Hoenderop *et al.* 2003). L'association de monomères d'une même sous-famille a donc été démontrée, par contre, les auteurs s'accordent à penser qu'une telle association est très peu probable entre monomères de sous-familles différentes (ex : les TRPC avec les TRPV) compte tenu des importantes différences structurales observées entre ces dernières (Schaefer 2005).



Notons enfin que de nombreux ARNm alternatifs ont été clonés pour certains TRPs (jusqu'à 9 différents pour TRPM3) (Chu *et al.* 2005; Arniges *et al.* 2006). Ces ARNm issus d'épissage alternatif encodent soit des protéines tronquées soit des protéines présentant des insertions. Ces protéines isoformes se comportent soit comme des canaux fonctionnels à part entière soit comme des dominants négatifs bloquant la fonction de la forme « classique ». Ainsi, une petite isoforme de TRPM1, surexprimée dans le mélanome, est capable de s'associer à la forme complète pour bloquer la translocation du canal vers la membrane plasmique.

La majorité de ces canaux TRPs sont exprimés et sont fonctionnels sur la membrane plasmique. Cependant, parmi ces TRPs, certains ont été identifiés récemment sur le RE et participent à la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE.

### II.C.4.a) Polycystin-1 et Polycystin-2

A l'origine, Polycystin-2 et Polycystin-1 ont été identifiées comme deux protéines codées respectivement par le gène *PDK2* et *PDK1*. Des mutations de ces gènes sont à l'origine de la plus fréquente des maladies génétiques rénales (1 pour 400-1000 naissances) : l'autosomal polycystic dominant kidney disease (APDKD) (en français : la polykystose rénale). Cette maladie se traduit par la formation de kystes, remplis de liquide, localisés à l'intérieur du rein et du foie, entraînant une hypertrophie de ces organes et l'arrêt de la fonction rénale chez 50% des sujets atteints. Il s'est avéré par la suite que ces deux gènes appartenaient à la super-famille des canaux TRPs (Pour revue voir (Birnbaumer *et al.* 2003)).

Polycystin-2 et Polycystin-1 sont deux protéines transmembranaires qui peuvent interagir, par l'intermédiaire de leur extrémité C-terminale, suggérant la formation de complexes hétéro-multimériques avec une fonction de canaux ioniques (Qian *et al.* 1997). En fait, Polycystin-2 posséderait dans sa séquence une région formant un pore et présenterait des homologies avec les canaux de type TRP. Selon le modèle proposé par Hanaoka (Hanaoka *et al.* 2000), Polycystin-2 est adressée par Polycystin-1 au niveau de la membrane plasmique, Polycystin-1 servant en quelque sorte de protéine chaperonne. Néanmoins, de nouveaux travaux ont permis de proposer un second modèle selon lequel Polycystin-2 qui possède une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique serait localisée au niveau du RE. A ce niveau, Polycystin-2 serait en interaction avec Polycystin-1, localisée, elle, au niveau de la membrane plasmique. Néanmoins, le rôle de cette interaction entre Polycystin-2 et Polycystin-1 dans le mécanisme d'activation du canal n'est toujours pas connu. Dans ce modèle, les auteurs montrent également que Polycystin-2 fonctionne comme un récepteur-canal au niveau du RE et augmente l'amplitude des signaux calciques transitoires initiés par le récepteur IP<sub>3</sub> (Koulen *et al.* 2002).

Des études récentes montrent que Polycystin-2 exhibe des propriétés communes avec les récepteurs IP<sub>3</sub> et RYRs. En effet, Polycystin-2 est capable de former au niveau du RE un canal ionique perméable au Ca<sup>2+</sup> et dont la probabilité d'ouverture est augmentée par une élévation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique (Koulen, Cai, Geng *et al.* 2002). Il semblerait donc que Polycystin-2 soit un nouveau type de récepteur-canal, en plus des récepteurs IP<sub>3</sub> et RYR déjà largement décrits et dont les propriétés intrinsèques lui permettent de fonctionner selon un mode d'activation de type CICR.

Ce nouveau type de récepteur-canal peut également entrer en interaction physique avec TRPC1 (Tsiokas *et al.* 1999), suggérant un rôle de Polycystin-2 dans l'entrée capacitive de Ca<sup>2+</sup> et dans le couplage excitation-contraction (Koulen, Cai, Geng *et al.* 2002).



### *II.C.4.b) TRPV1*

D'autres membres de la super-famille des canaux TRPs constituent des récepteurs canaux au niveau de la membrane du RE. En effet, TRPV1, premier membre de la famille TRV, a tout d'abord été identifié au niveau de la membrane plasmique comme un canal activé par la chaleur ( $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ) (Caterina *et al.* 1997). TRPV1 est également activé par beaucoup d'autres composants chimiques : les endocannabinoïdes, l'anandamide (Zygmunt *et al.* 1999), le camphre (Xu *et al.* 2005), le principal composant irritant du piment rouge, la capsaïcine, la pipérine (composé principal du poivre noir) (McNamara *et al.* 2005) et l'allicin (composé principal de l'ail) (Macpherson *et al.* 2005). L'activité de TRPV1 est régulée par les protons. En effet, un  $\text{pH} \leq 5,9$  (acidose caractéristique des tissus au cours de l'inflammation) induit une baisse de la température seuil d'activation, ainsi dans ces conditions TRV1 pourrait être activée à température ambiante (Montell 2005). TRPV1 est donc un canal permettant d'intégrer de nombreux signaux générés par des stimuli douloureux.

De plus, des études récentes démontrent également un rôle de récepteur-canal pour TRPV1 au niveau de la membrane du RE (Turner *et al.* 2003; Wisnoskey *et al.* 2003). TRPV1 réticulaire semble être régulé par les mêmes stimuli que le TRPV1 membranaire.

### *II.C.4.c) TRPM2*

TRPM2 est un canalyon (un canal enzyme) possédant un domaine ADP ribose pyrophosphatase (le domaine NUDT9) en Cterminal (Perraud *et al.* 2001; Sano *et al.* 2001). TRPM2 est un canal cationique non sélectif activé par l'ADP ribose intracellulaire, les nucléotides pyrimidiques et le NAD (Perraud, Fleig, Dunn *et al.* 2001; Sano, Inamura, Miyake *et al.* 2001). Ce canal constitue un senseur d'oxydo-réduction car il est activé par le peroxyde d'hydrogène et d'autres agents issus du stress oxydatif (Hara *et al.* 2002). Cette activation par des agents oxydatifs nécessite la fixation de l'ADPr sur le domaine NUDT9 (Perraud *et al.* 2003). L'activité de TRPM2 semble être régulée positivement par l'acide arachidonique et par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Hara, Wakamori, Ishii *et al.* 2002; McHugh *et al.* 2003; Kolisek *et al.* 2005). Par ailleurs, des études ont démontré l'existence d'une petite isoforme de TRPM2 caractérisée par l'absence des 4 derniers domaines transmembranaires et du domaine Cterminal. Cette petite isoforme agirait comme dominant négatif vis-à-vis de la forme classique (Zhang *et al.* 2003).

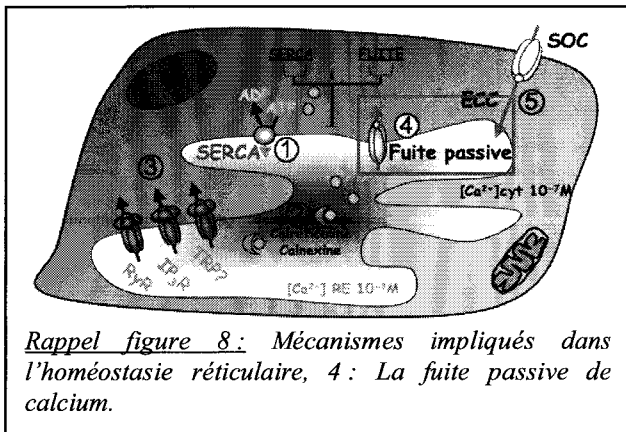
De plus, des études menées par l'équipe du Dr. Penner semblent indiquer que TRPM2 serait également présent sur la membrane du RE des cellules bêtas du pancréas, et participerait à la production d'insuline (communication orale).

#### II.C.4.d) TRPM8

Le canal TRPM8 est exprimé dans les fibres afférentes Ad et C des ganglions de la racine postérieure de la moelle épinière ainsi que dans les neurones afférents des ganglions trigéminaux (innervant l'arrière de la bouche) et fonctionne comme récepteur au froid et au menthol dans ces neurones (McKemy *et al.* 2002; Peier *et al.* 2002; Kobayashi *et al.* 2005). L'activation du canal TRPM8 par la diminution de température (initiée vers 30°C, maximale entre 10 et 15°C) dans les neurones thermosensoriels induit une dépolarisation membranaire qui, lorsqu'elle dépasse le seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants, provoque le déclenchement d'un message nerveux sous forme de train de potentiel d'action (de la Pena *et al.* 2005). Des études récentes réalisées au sein du laboratoire semblent indiquer que TRPM8 est exprimé sur la membrane du RE des cellules cancéreuses prostatiques. Ainsi, parmi les canaux TRPs identifiés sur la membrane du RE, le canal TRPM8 semble être le candidat idéal permettant de faire un lien entre l'homéostasie intra-réticulaire et la physiopathologie prostatique.

En effet, le premier article traitant du gène *trpm8* (précédemment appelé *trp-p8*) reportait le clonage de ce gène à partir de lots de prostate saine et de lots de prostate cancéreuse (Tsavaler *et al.* 2001). L'analyse de la structure hypothétique de la séquence protéique prédisait que la protéine produite devait être un canal ionique appartenant à la famille des TRPs. Tsavaler *et coll* démontrèrent, dans leur article fondateur, l'expression de TRPM8 dans la prostate, les testicules, et faiblement dans le sein. Sa surexpression en cas de cancer a été détectée dans la prostate, le sein, le poumon, le mélanome et l'adénocarcinome colorectal (Tsavaler, Shapero, Morkowski *et al.* 2001). D'autres études utilisant d'autres techniques ont confirmé la surexpression de TRPM8 dans le cancer de la prostate intracapsulaire (Fuessel *et al.* 2003; Kiessling *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2006). En outre, Henshall *et coll* ont mis en évidence l'androgéno-dépendance de TRPM8, ce qui a été confirmé par Zhang *et coll* (Henshall *et al.* 2003; Zhang and Barritt 2004). Des études menées au sein du laboratoire ainsi que par l'équipe de Barritt, ont permis de mettre en évidence l'expression de ce canal sur la membrane du RE des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ces études tendent à montrer que TRPM8 est un candidat majeur pouvant participer à la mobilisation de  $Ca^{2+}$  à partir du RE. De plus, TRPM8 peut être également exprimé sur la membrane plasmique des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines. Ainsi, le rôle de TRPM8 réticulaire de même que la régulation de la localisation de ce canal au cours de la cancérogenèse prostatique restent à étudier.

## II.C.5) Fuite de calcium à partir des stocks intracellulaires : une énigme de la signalisation calcique



Les pompes calciques ATP dépendantes de la famille SERCA importent du  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du RE. Cet influx continu de  $\text{Ca}^{2+}$  créé par les SERCAs est contrebalancé par une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE permettant d'équilibrer les

Ce processus de fuite du  $\text{Ca}^{2+}$  constitue l'un des processus les plus énigmatiques de l'homéostasie calcique puisque la nature moléculaire du canal de fuite n'a toujours pas été identifiée. Cependant de nombreux candidats ont été envisagés.

### II.C.5.a) Pompes SERCAs

Le processus de fuite du  $\text{Ca}^{2+}$  est fréquemment étudié en mesurant les variations de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire après application d'inhibiteurs des pompes SERCAs. Un autre moyen d'étudier le processus de fuite en incluant le mode de fonctionnement inverse des SERCAs consiste à diminuer la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique à un niveau ne permettant plus aux SERCAs de transporter le  $\text{Ca}^{2+}$ . Dès lors, le fonctionnement des SERCAs en mode pompe est bloqué et seul le fonctionnement en mode « inverse » est possible. De plus, le fonctionnement des SERCAs en mode pompe peut être inhibé en supprimant androgènes du milieu intracellulaire. Le fonctionnement en mode « inverse » quant à lui n'est pas altéré. De tels protocoles ont permis l'étude de la participation du mode de fonctionnement « inverse » des SERCAs dans le processus de fuite du  $\text{Ca}^{2+}$ . Différents travaux ont montré que cette participation diffère énormément en fonction du type cellulaire étudié. Dans le réticulum sarcoplasmique des muscles squelettiques, les inhibiteurs de SERCAs comme la TG ont un effet drastique sur la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la suppression de l'ATP cytosolique. Ces résultats montrent que dans le réticulum sarcoplasmique des muscles squelettiques, le fonctionnement en mode « inverse » des SERCAs contribue de façon majoritaire au processus de fuite du  $\text{Ca}^{2+}$ . De façon intéressante, des études structurales portant sur ces SERCAs ont montré que ces pompes pouvaient être à l'origine d'une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  importante, bloquée par l'utilisation de la TG (Toyoshima and Nomura 2002). D'autres études concernant le muscle

cardiaque ont montré le rôle crucial du fonctionnement en mode « inverse » des SERCAs qui contribue de façon majoritaire au processus de fuite du  $\text{Ca}^{2+}$  (Shannon *et al.* 2000). Cependant, dans d'autres types cellulaires, la TG n'a pas d'effet sur la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la suppression de androgènes cytosolique (Hofer *et al.* 1996; Beecroft and Taylor 1998). Ces résultats suggèrent que des processus autres que le fonctionnement en mode « inverse » des SERCAs sont impliqués dans la fuite. Ces résultats divergents peuvent être expliqués : (i) par l'expression de différentes isoformes de SERCAs ne possédant pas les mêmes propriétés de fuite ; (ii) par l'abondance des protéines SERCAs au niveau du RE des muscles striés par rapport au RE d'autres types cellulaires où le processus de fuite par le mode « inverse » des SERCAs est minoritaire.

Il apparaît donc que dans des conditions physiologiques, une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des SERCAs fonctionnant en mode « inverse » est à exclure (Pour revue voir (Camello *et al.* 2002)).

#### *II.C.5.b) Bcl-2*

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle fondamental dans l'intégration des signaux pro- et anti-apoptotiques. Différentes protéines de cette famille sont localisées au niveau des membranes intracellulaires et contrôlent les propriétés de perméabilité de ces membranes. Par exemple, Bcl-xL est exporté au niveau des mitochondries et protège l'intégrité de la membrane externe mitochondriale. Bcl-2, quant à lui, est exporté vers différentes membranes intracellulaires dont le RE où il semble jouer un rôle important dans le contrôle de la perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  du RE (Koopman *et al.* 2003). De plus, la surexpression de l'oncoprotéine Bcl-2 pourrait modifier le contenu des réserves calciques intra-réticulaires (Foyouzi-Youssefi *et al.* 2000; Pinton *et al.* 2000). Il est à noter que certains membres de la famille Bcl-2, dont Bcl-2 lui-même et Bcl-xL, ont une structure homologue à certaines toxines bactériennes et forment un pore ionique (Muchmore *et al.* 1996). En effet, Bcl-2 et Bcl-XL sont capables de former un canal ionique lorsqu'ils sont incorporés dans une membrane artificielle mais ne sont pas perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  (Minn *et al.* 1997; Schendel *et al.* 1998). Cependant, il est possible que dans des conditions physiologiques d'autres protéines soient nécessaires pour agir de concert avec Bcl-2 et permettre ainsi une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$ . Bcl-2 et d'autres protéines de la famille Bcl-2 pourraient donc interagir avec des canaux et des transporteurs et ainsi contrôler la perméabilité du RE.

Jusqu'à présent, aucun travail n'a permis de montrer clairement que Bcl-2 était capable de laisser fuir le  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE.

### *II.C.5.c) Canaux sensibles à l'ATP*

Certaines substances ont été montrées comme pouvant augmenter la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE. Cette fuite peut être stimulée par l'ATP dans certains types cellulaires (Hofer, Curci, Machen et al. 1996). Cependant, cet effet de l'ATP ne se retrouve pas pour tous les modèles cellulaires étudiés (Missiaen *et al.* 1997). Le glutathion, un tri-peptide jouant un rôle réducteur important dans le cytosol, est capable aussi de stimuler la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  (Missiaen *et al.* 1993). De plus, la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  est inhibée par le  $\text{Ni}^{2+}$ , lui-même connu pour bloquer différents types de canaux calciques. Ce résultat suggère que la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  est médiée par un canal calcique spécialisé (Wissing *et al.* 2002).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de preuve directe de l'existence d'un tel canal sur le RE.

### *II.C.5.d) Le complexe ribosome-translocon.*

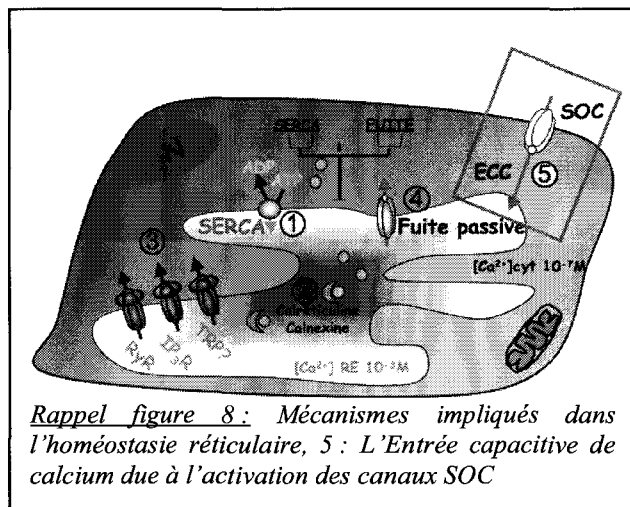
Le complexe ribosome-translocon, au niveau du RE, est impliqué dans la synthèse et la translocation de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse à l'intérieur du RE. A la fin des années 80 et au début des années 90, des études électrophysiologiques ont permis de démontrer que la puromycine, un antibiotique qui libère la chaîne polypeptidique en cours de synthèse du translocon, induit l'apparition d'une grande conductance au niveau du RE (Simon *et al.* 1989; Simon and Blobel 1991). De façon intéressante, ces auteurs ont observé des ouvertures spontanées du canal formé par le translocon. Ces données laissent supposer que le translocon lui-même pourrait jouer le rôle d'un canal de fuite universel au niveau du RE. De plus, lorsque le complexe translocon-ribosome est libre de la chaîne polypeptidique, il devient perméable aux ions et aux molécules neutres (Simon and Blobel 1991; Heritage and Wonderlin 2001). Au contraire, lorsque la chaîne polypeptidique occupe le complexe translocon-ribosome, celui-ci n'est plus perméable (Simon and Blobel 1991).

Le complexe translocon-ribosome présente une grande perméabilité pour les molécules neutres. Le  $\text{Ca}^{2+}$  en association avec de petites molécules pourrait former des complexes neutres. Ceux-ci diffuseraient du RE vers le cytosol via le complexe translocon-ribosome. Cependant, physiologiquement, la cellule tente de créer une protéine-canal imperméable au passage des ions calciques. En effet, dans la configuration de synthèse de la chaîne polypeptidique, le complexe translocon-ribosome n'est plus perméable. Dans la configuration alternative, c'est-à-dire lorsque le ribosome se détache du translocon après synthèse de la chaîne polypeptidique, le pore du translocon est alors bloqué par une protéine intra-réticulaire, la protéine BiP (Hamman *et al.* 1998). La fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait alors

s'expliquer par une imperfection du mécanisme de fermeture du pore du translocon. Certains ribosomes continueraient de s'associer au translocon après la fin de la synthèse protéique (Potter and Nicchitta 2002). Ce type de complexe translocon-ribosome libéré de la chaîne polypeptidique pourrait jouer un rôle important dans le processus de fuite de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Une étude réalisée au sein du laboratoire semble impliquer le complexe ribosome-translocon dans la fuite passive de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE des cellules cancéreuses prostatiques humaines (Van Coppenolle *et al.* 2004). Ainsi, le translocon semble être le candidat idéal permettant d'expliquer la fuite passive.

Néanmoins, l'implication du complexe translocon-ribosome dans la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  n'a jamais été clairement démontrée. Des études supplémentaires semblent donc être nécessaires afin de valider cette hypothèse.

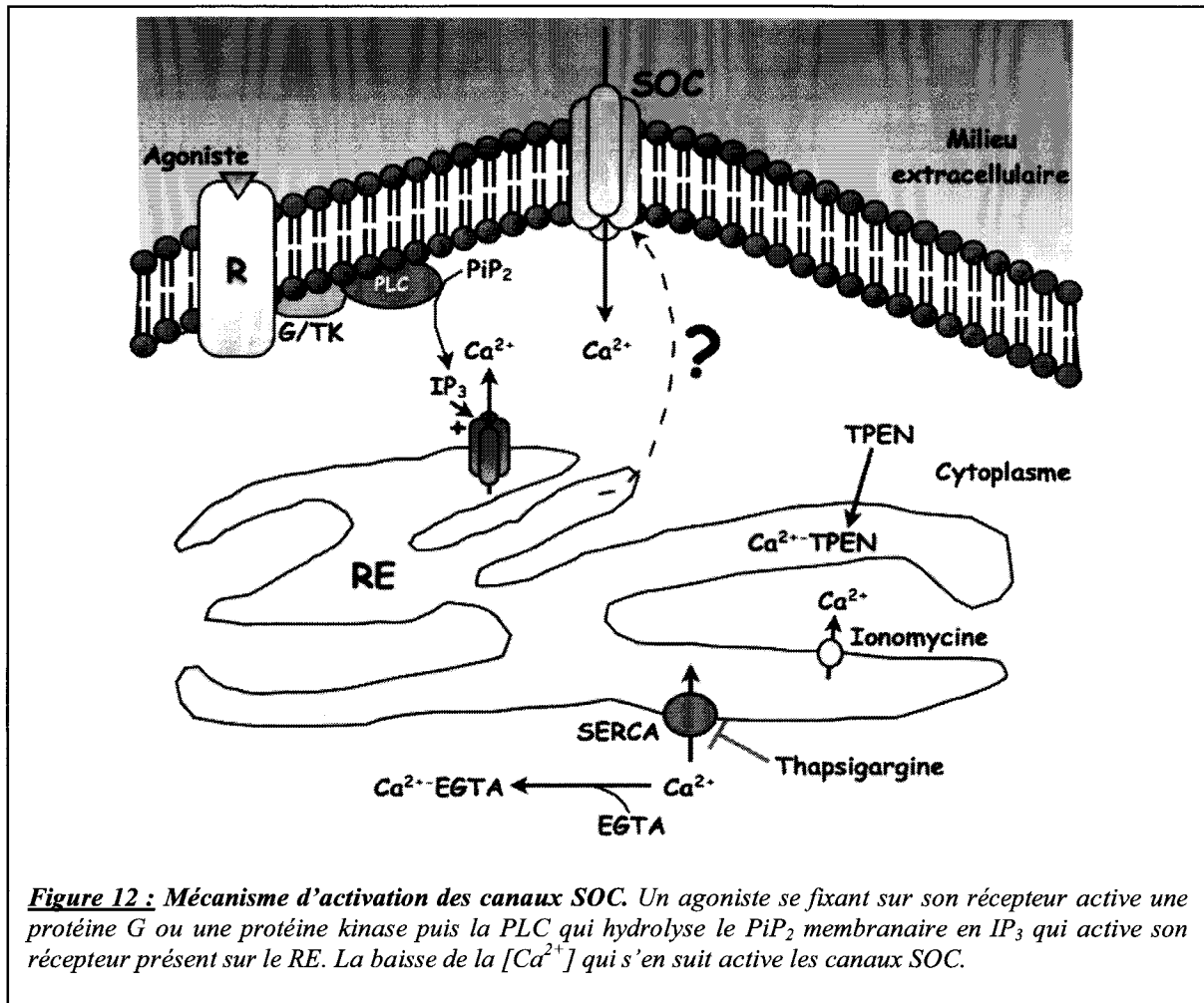


Dans les quatre parties précédentes, nous avons étudié les mécanismes réticulaires permettant soit de faire entrer ou de faire sortir du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE. Dans cette dernière partie, nous allons voir quels sont les mécanismes impliqués dans l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du milieu extérieur afin de faire rentrer du  $\text{Ca}^{2+}$  pour remplir le RE suite à une vidange calcique.

## II.C.6) L'Entrée Capacitive de Calcium

Les récepteurs membranaires activant la PLC créent une modification de l'homéostasie calcique. Les influx calciques proviennent à la fois du milieu intra- ou extracellulaire. Dans un premier temps, on observe une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  due à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks intracellulaires. Ce mécanisme a été décrit dès les années 1980 : cette libération est due à l'activation des récepteurs  $\text{IP}_3$  présents sur la membrane du RE par l' $\text{IP}_3$ , produit lors de l'activation de la PLC (Streb *et al.* 1983). Cependant, la phase suivante d'augmentation soutenue de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  est, quant à elle, beaucoup moins connue. En se basant sur ces travaux concernant la relation entre la vidange des stocks intracellulaires et les variations de  $\text{Ca}^{2+}$  intra-cytoplasmique, Putney a proposé en 1986 le modèle "d'Entrée

Capacitive de Calcium" (ECC) ou « Store Operated Calcium Entry » (SOCE) (Putney 1986). Dans ce modèle, il postule que c'est la vidange des stocks intracellulaires en elle-même qui active les canaux calciques de la membrane plasmique afin de remplir les stocks intracellulaires (figure 12).



Cette hypothèse a par la suite été consolidée notamment par de nombreux résultats obtenus en imagerie calcique sur des cellules excitables et non-excitables. Dans toutes ces cellules l'entrée capacitive peut être activée à la fois par des inhibiteurs de la recapture calcique dans le RE (thapsigargine, acide cyclopioazonique) ou par de l' $\text{IP}_3$  (Putney and Bird 1993). Toutes ces études ont par ailleurs permis de mettre en évidence le rôle de cette entrée capacitive dans la physiologie cellulaire. En effet, outre son rôle dans le remplissage des stocks, l'ECC intervient dans de nombreux processus comme la régulation de l'expression génique, le métabolisme et la survie cellulaire ou encore l'exocytose (Parekh and Putney 2005). Cependant la majorité des études portant sur androgènes furent réalisées en imagerie calcique, les variations de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  observées sont donc la conséquence de l'activité de toutes

les protéines intervenant dans l'homéostasie calcique (les canaux calciques eux-mêmes mais également les pompes, les transporteurs, les protéines chélatrices...). Ainsi, une étape importante dans l'identification moléculaire des protéines intervenant dans l'ECC fut la mise au point de la technique de patch-clamp. Cette technique a permis d'identifier et de caractériser dans les lymphocytes T le courant activé par la vidange des stocks calciques intracellulaires : le Store Operated current appelé « Calcium Release Activated Calcium » current ou  $I_{CRAC}$  (Hoth and Penner 1992). Par la suite, des études ont montré que le  $I_{CRAC}$  était différent de l' $I_{SOC}$  : même si ces deux courants sont activés par la vidange des stocks intracellulaires, le CRAC possède des caractéristiques biophysiques particulières (haute sélectivité au  $Ca^{2+}$ , conductance plus faible) et n'est présent que dans les lymphocytes T. Ces caractéristiques permettent de décrire le CRAC comme le « prototype de SOC » (Lewis and Cahalan 1989; Zweifach and Lewis 1993).

De nombreuses années de frustrations ont marqué la quête pour l'identification moléculaire des canaux responsables de l'ECC. Cependant, l'absence de ligands spécifiques, la présence de canaux endogènes dans les modèles de surexpression ainsi que l'absence d'homologie entre les canaux SOC et les canaux calciques déjà connus ont rendu ces études très délicates. De nombreux candidats ont été évoqués, y compris des protéines appartenant aux familles des TRPs, essentiellement TRPC1 (Parekh and Putney 2005). Cependant, dans la majorité des études, les propriétés biophysiques de ces canaux diffèrent de celles du courant CRAC. Ainsi, l'implication de ces protéines dans le CRAC reste peu claire.

Récemment, de nouvelles études basées sur des approches génétiques, ont permis de mettre en évidence de nouveaux candidats. En 2005, STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) a été identifié. Cette protéine serait le senseur calcique du RE (Liou *et al.* 2005; Roos *et al.* 2005). Puis en 2006, de nouvelles études ont permis de mettre en évidence le rôle de Orai1/CRACM1 dans le courant CRAC (Feske *et al.* 2001; Vig *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006). Ces études, ainsi que toutes les suivantes, ont révolutionné le petit monde des TRPs en permettant la découverte des canaux calciques responsables du courant SOC.

### *II.C.6.a) STIM1 : senseur calcique indispensable à l'activation du SOC*

Deux équipes ont identifié STIM1 grâce à des criblages de petits ARN messagers pour la suppression du SOC dans les cellules S2 de drosophiles (Roos, DiGregorio, Yeromin *et al.* 2005) ainsi que dans des cellules Hela (Liou, Kim, Heo *et al.* 2005). STIM est une protéine transmembranaire de type I de 77kDa et qui se trouve principalement dans le RE (Liou, Kim,



Heo et al. 2005; Wu *et al.* 2006) (figure 13). Le knock-down de STIM1 dans ces cellules diminue de façon significative l'amplitude de l'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les expériences de microscopie confocale et de TIRF (Total internal reflection fluorescence) ont mis en évidence que STIM1 se trouve de façon homogène sur toute la surface du RE quand les stocks intracellulaires sont pleins, lors de la vidange de ces stocks, STIM1 est redistribué en amas (dans des « punctae ») se trouvant à une distance très réduite de la membrane plasmique (Manji *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2005; Soboloff *et al.* 2006). La localisation exacte de ces punctae est encore soumise à débat. Certains groupes pensent que lors de la déplétion des stocks, STIM1 est transloqué au niveau de la membrane plasmique où il peut interagir directement avec les canaux SOCs afin de les activer (Zhang, Yu, Roos et al. 2005). Cependant, actuellement les expériences de biotinylation de STIM1 n'ont toujours pas permis de confirmer une augmentation de la présence STIM1 au niveau de la membrane plasmique (Zhang, Yu, Roos et al. 2005; Soboloff, Spassova, Hewavitharana et al. 2006). D'autres équipes suggèrent que STIM1 est localisé uniquement au niveau de la membrane du RE. L'utilisation de protéines STIM1 couplées à des peptides fluorescents n'a pas permis de mettre en évidence cette translocation au niveau de la membrane plasmique (Liou, Kim, Heo et al. 2005; Baba *et al.* 2006; Mercer *et al.* 2006; Wu, Buchanan, Luik et al. 2006; Xu *et al.* 2006). La localisation la plus précise de cette protéine a été effectuée en microscopie électronique grâce à une protéine de fusion STIM-HRP (horseradish peroxidase). Ces expériences montrent que lors de la vidange des stocks intracellulaires STIM1 s'accumulent dans des régions du RE qui se trouvent juste à côté de la membrane plasmique. Dans ces zones particulières la distance entre le RE et la membrane plasmique est comprise entre 10 à 25nm, ainsi STIM1 pourrait interagir avec les canaux SOC afin de les activer (Wu, Buchanan, Luik et al. 2006).

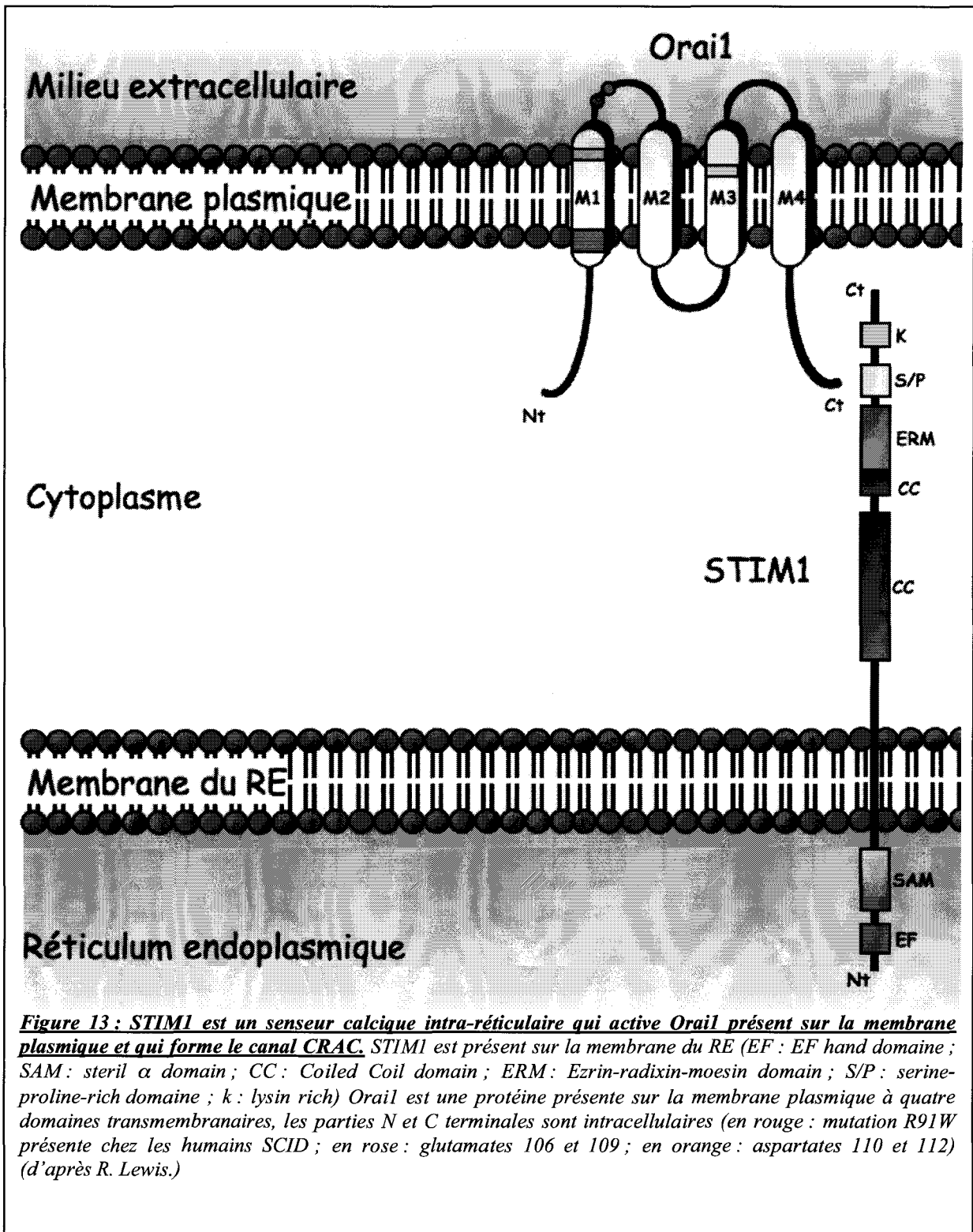
Même si la relocalisation de STIM1 dans ces punctae est longue, elle précède l'activation des SOCs de quelques secondes (Liou, Kim, Heo et al. 2005; Zhang, Yu, Roos et al. 2005), et elle est suffisamment rapide pour être une étape indispensable à l'activation des SOCs (Wu, Buchanan, Luik et al. 2006). Cette relocalisation semble être due au fait que STIM1 soit un senseur calcique. En effet, des mutations dirigées contre les résidus liant le  $\text{Ca}^{2+}$  du domaine EF hand diminue l'affinité de STIM1 pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , mimant ainsi la déplétion des stocks. Ces mutations provoquent une relocalisation spontanée de STIM1 en punctae et active constitutivement les canaux SOC même quand les stocks intracellulaires sont pleins (Liou, Kim, Heo et al. 2005; Zhang, Yu, Roos et al. 2005; Mercer, Dehaven, Smyth et al. 2006; Spassova *et al.* 2006). De plus, l'affinité du domaine EF hand de STIM1, mesurée in

vitro, est de 200 à 600 $\mu$ M (Stathopoulos *et al.* 2006). Ceci est en adéquation avec la gamme de concentration calcique connue pour le RE (200 à 600 $\mu$ M ) (Demaurex and Frieden 2003).

### *II.C.6.b) Nature moléculaire des canaux CRAC*

De façon surprenante, après une dizaine d'années de recherche intensive sur la nature moléculaire des SOC, trois groupes sont parvenus à découvrir ce qu'est le canal SOC. La première étude a commencé il y a environ 6 ans en étudiant les lymphocytes T de patients souffrant d'immunodéficience (SCID). Dans ces cellules, la vidange des stocks intracellulaires ne provoque pas d'entrée capacitive de Ca<sup>2+</sup>. Des analyses génétiques ont permis de mettre en évidence une région sur le chromosome 12 comportant environ 74 gènes (Feske, Giltman, Dolmetsch *et al.* 2001; Feske *et al.* 2005). En parallèle, un criblage des cellules S2 de drosophiles avec des siRNA a permis d'identifier un gène sur le chromosome 12 (*Orai1*) indispensable à la mobilisation de Ca<sup>2+</sup> dans ces cellules (Feske *et al.* 2006). Un autre criblage haut débit par des siRNA a mis en évidence l'homologue humain : CRACM1 (Vig, Peinelt, Beck *et al.* 2006; Zhang, Yeromin, Zhang *et al.* 2006).

Orai1/CRACM1 paraît différent des autres canaux ioniques connus. C'est une protéine ubiquitaire de 33kDa possédant 4 domaines transmembranaires (figure 13). Ainsi, chez l'homme, le syndrome d'immunodéficience (SCID) est expliqué par une seule mutation Orai1. De façon intéressante, la surexpression de la protéine native dans ces cellules permet de rétablir androgènes. Orai1 semble donc être essentiel pour l'activité du CRAC (Feske, Gwack, Prakriya *et al.* 2006). Deux homologues de Orai ont par ailleurs été identifiés. La fonction d'Orai2 et 3 reste peu connue, même si la surexpression de ces canaux dans des cellules HEK293 permet d'augmenter le courant SOC, la surexpression de ces protéines dans les lymphocytes d'humain SCID possédant la mutation d'Orai1 ne restaure pas le courant CRAC.



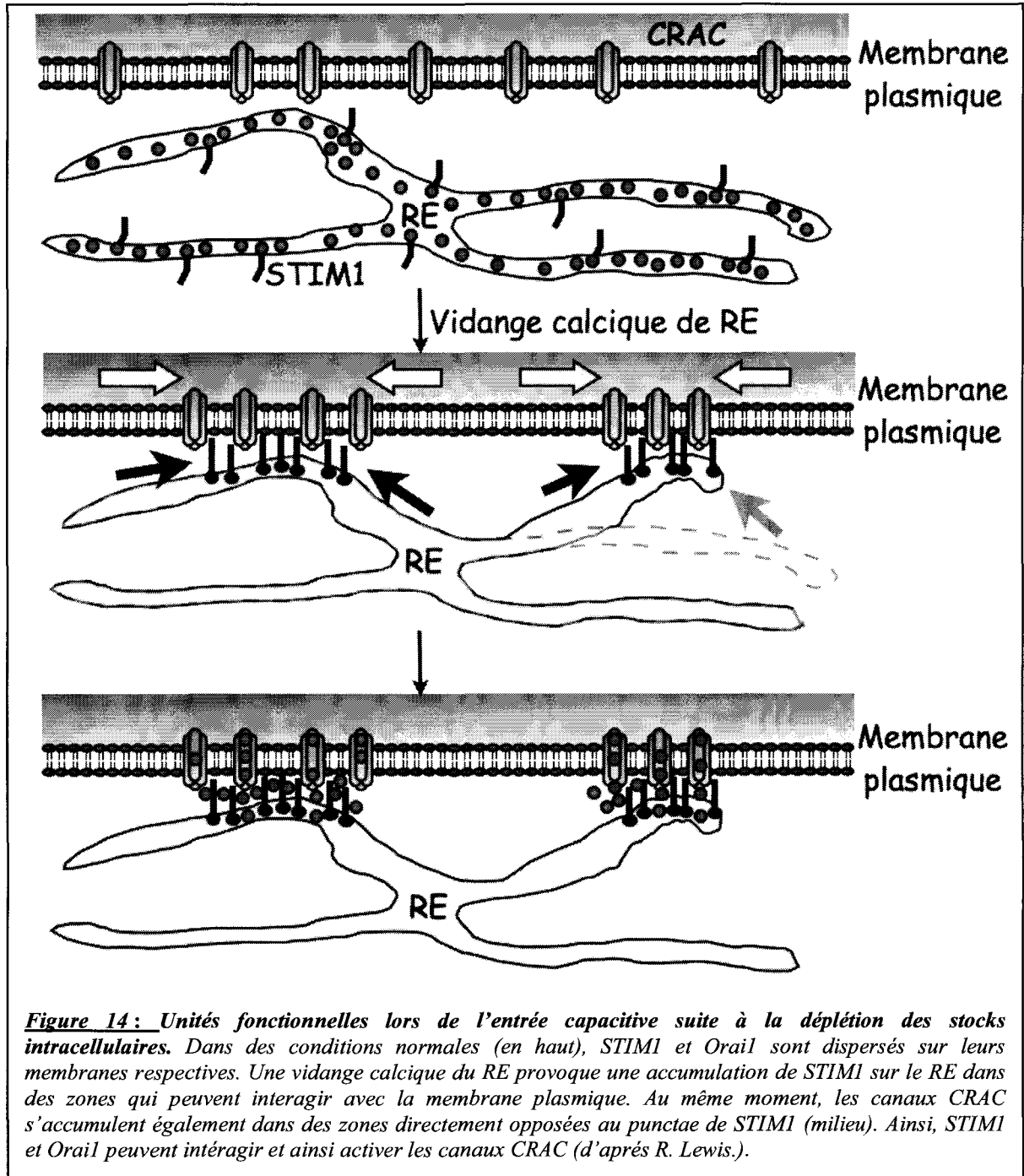
### II.C.6.c) *Orai1/CRACM1 est-il le seul responsable du CRAC ?*

La surexpression simultanée de STIM1 et d'Orai1 produit un courant CRAC (appelé « monster CRAC ») environ 100 fois plus grand que dans les cellules contrôles (Mercer, Dehaven, Smyth et al. 2006; Peinelt *et al.* 2006; Soboloff *et al.* 2006; Zhang, Yeromin, Zhang et al. 2006). Ceci semble indiquer que le gène *Orai1* pourrait coder pour une protéine partenaire du canal, ou pour une protéine régulatrice présente en quantité limitée. Pour répondre à ces questions, certaines équipes ont entrepris de muter certains acides aminés de la région putative du pore afin de modifier la sélectivité du canal. La mutagenèse dirigée d'Orai1 semble indiquer que deux glutamates sont cruciaux. La substitution du glutamate en position 106 par un aspartate diminue la sélectivité du canal au  $\text{Ca}^{2+}$  tout en augmentant la sélectivité au baryum et au césium (Prakriya *et al.* 2006; Yeromin *et al.* 2006). De même, la substitution du glutamate 190 par une glutamine diminue la sélectivité calcique et augmente la sélectivité au césium (Vig *et al.* 2006). De plus, la neutralisation des charges de deux aspartates de la boucle entre les domaines I et II (Asp 110 et 112) réduit l'inhibition par le  $\text{Gd}^{3+}$  (Yeromin, Zhang, Jiang et al. 2006), et modifie la rectification du courant (Vig, Beck, Billingsley et al. 2006). Ces résultats indiquent que ces charges négatives sont indispensables à l'accumulation des cations au niveau de l'entrée du pore. Ces dernières études permettent enfin d'expliquer l'extrême sélectivité des canaux CRAC, et sont les preuves irréfutables qu'Orai1/CRACM1 contribue au courant CRAC. Ainsi, étant donné que le courant au travers d'Orai1 ressemble fortement au courant CRAC, et que Orai1 forme des multimères (Prakriya, Feske, Gwack et al. 2006; Vig, Beck, Billingsley et al. 2006; Yeromin, Zhang, Jiang et al. 2006). Il semble que le courant CRAC soit Orai1 seul ou une combinaison avec Orai2 et/ou Orai3.

### II.C.6.d) *Mécanisme d'activation de l'ECC*

La découverte de STIM1 sur le RE et de Orai sur la membrane plasmique permet de reposer la question fondamentale : comment la vidange calcique du RE est couplée à l'activation des canaux présents sur la membrane plasmique. Comme je l'ai décrit précédemment, la déplétion calcique du RE est perçue par STIM1, ce qui provoque sa relocalisation dans des zones de jonction entre la membrane du RE et la membrane plasmique (figure 14). Les techniques de TIRF couplé à l'imagerie calcique ont permis de mettre en évidence que les augmentations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  sont co-localisées avec les punctae de STIM1, montrant ainsi que les canaux CRAC sont activés uniquement dans ces zones de forte densité en STIM1 (Luik *et al.* 2006). De plus, l'utilisation de protéines de fusion fluorescentes pour Orai1 et STIM1 a permis de mettre en évidence que la vidange calcique du RE provoque

l'accumulation de Orai1 dans des régions de la membrane plasmique directement opposées au punctae de STIM1 (Luik, Wu, Buchanan et al. 2006; Xu, Lu, Li et al. 2006).



En conclusion, toutes ces études décrivent pour la première fois le mécanisme d'activation de androgènes : le senseur calcique du RE forme des clusters qui s'opposent à des clusters de canaux CRAC (Orai1), ces clusters sont séparés par un petit espace de cytoplasme (Luik, Wu, Buchanan et al. 2006; Wu, Buchanan, Luik et al. 2006; Xu, Lu, Li et al. 2006). Ce mécanisme d'activation ressemble aux unités fonctionnelles de canaux calciques du RE des

cellules musculaires striées : les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique sont co-localisés avec les récepteurs à la dihydropyridine de la membrane plasmique (Franzini-Armstrong *et al.* 2005). Cependant il y a une différence notable, dans les cellules musculaires striées, les unités fonctionnelles sont formées de façon permanente (assurant ainsi un couplage excitation contraction rapide) alors que pour androgènes les unités fonctionnelles sont formées à la demande.

#### *II.C.6.e) Rôle des canaux SOC*

Physiologiquement, la libération du calcium du réticulum entraîne au niveau de la membrane plasmique de la cellule une entrée de calcium. Ce processus est retrouvé dans une grande variété de cellules non excitables (Parekh and Penner 1997) et permet à la cellule de reconstituer ses réserves calciques. Cette entrée de calcium est liée à l'ouverture des canaux SOC.

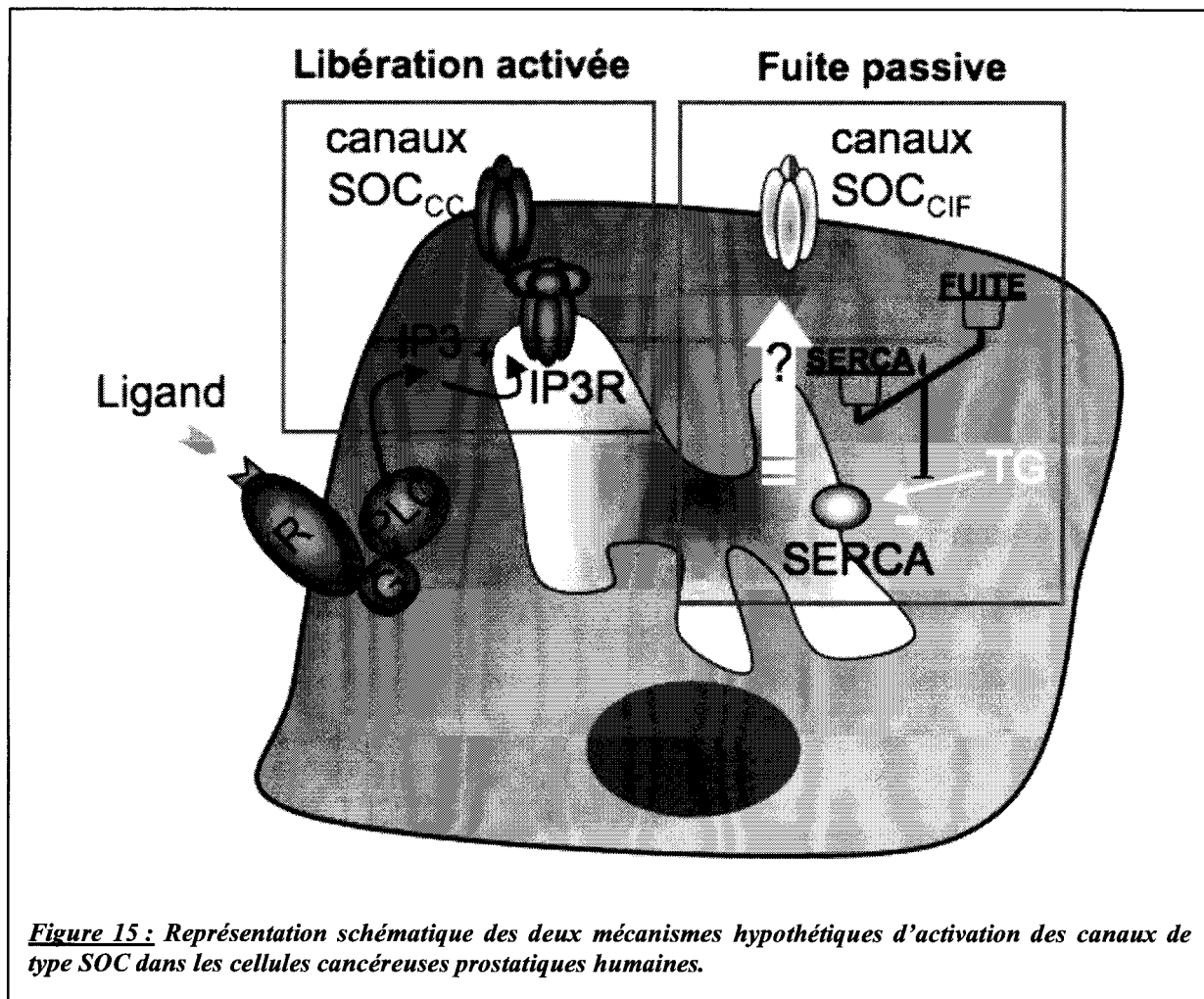
Le rôle des canaux SOC ne se limite pas au remplissage des réserves calciques intracellulaires. Plusieurs travaux montrent l'implication de ces canaux dans différentes fonctions physiologiques ou physiopathologiques essentielles : la sécrétion, la transcription de gènes, le cycle cellulaire, la prolifération, et également l'apoptose (Berridge 1995). Cependant, les travaux concernant l'implication des canaux SOC dans la MCP sont contradictoires. Actuellement, deux mécanismes sont proposés. Selon le premier, l'induction de l'apoptose serait provoquée par la vidange des réserves calciques uniquement contenues dans le RE (He *et al.* 1997). Une augmentation de la concentration en calcium cytosolique due à l'entrée capacitive ne serait pas requise. Cependant, l'entrée de calcium par les canaux SOC jouerait un rôle crucial en permettant un remplissage optimal des réserves calciques, ce qui préviendrait la MCP. Des travaux menés au laboratoire ont permis de mettre en évidence ce mécanisme dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes. En effet, le fait de bloquer l'entrée capacitive dans les cellules LNCaP potentialise l'induction de l'apoptose induite par la TG (Skryma *et al.* 2000). Le deuxième mécanisme, au contraire, attribue la MCP à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique jusqu'à une valeur critique grâce à l'entrée capacitive. C'est notamment le cas des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes (Furuya *et al.* 1994). Les modifications survenant dans le processus d'apoptose lors de la transition des cellules tumorales de l'état androgéno-dépendant vers l'état androgéno-indépendant pourraient donc être liées à des perturbations de l'homéostasie calcique impliquant les canaux SOC.

### *II.C.6.f) Canaux SOC et prostate*

Des études menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence dans les cellules cancéreuses androgéno-dépendantes de la prostate des réserves intracellulaires de calcium dans le réticulum endoplasmique (Skryma, Mariot, Bourhis et al. 2000). La libération du calcium contenu dans ces stocks entraîne au niveau de la membrane plasmique un influx d'ions calcium, grâce à des canaux SOC.

Plusieurs mécanismes différents ont été proposés et aucune possibilité n'est à exclure à l'heure actuelle (figure 15). Le premier mécanisme d'activation des canaux SOC proposé consiste en un couplage conformationnel entre le IP<sub>3</sub>R et les canaux SOC qui sont alors appelés SOC<sub>CC</sub> (Couplage Conformationnel). Ce mécanisme est analogue à celui du couplage entre les RYR sur la membrane réticulaire et les récepteurs à la dihydropyridine sur la membrane plasmique des cellules musculaires. D'après ce modèle, la fixation de l'IP<sub>3</sub> sur son récepteur au niveau de la membrane du RE provoquerait une variation de conformation de l'IP<sub>3</sub>R qui interagirait physiquement avec les canaux SOC sur la membrane plasmique. Ce changement de conformation serait responsable de l'activation du canal SOC partenaire de l'IP<sub>3</sub>R d'où l'appellation de couplage conformationnel. Parmi les canaux TRPs, certaines protéines ont été proposées comme canaux SOC potentiels, à savoir TRPC1, TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPC7 et TRPV6. De plus, une activation de TRPC1 par interaction conformationnelle avec l'IP<sub>3</sub>R *via* une protéine adaptatrice de la famille Homer a été reportée suggérant que l'hypothèse de ce type d'activation des SOC est probable (Yuan *et al.* 2003).

Le second mécanisme d'activation des SOC consiste en la libération d'un facteur diffusible de nature inconnue, le CIF (Calcium Influx Factor), consécutivement à la vidange des stocks calciques réticulaires. Ce composé serait responsable de l'activation des canaux SOC, alors appelés SOC<sub>CIF</sub>. D'après de récents travaux, le CIF serait en fait l'activateur de la phospholipase A2 calcium-indépendante (ou iPLA2 $\beta$ ) qui synthétise des lysophospholipides capables d'activer directement les canaux SOC (Smani *et al.* 2004). Il a en effet déjà été montré que ces lysophospholipides sont capables d'activer directement les canaux TRPs particulièrement TRPC5 (Flemming *et al.* 2006).



De nombreux travaux sont en faveur d'un modèle ou de l'autre. Il reste cependant très probable que tous deux existent et soient recrutés de façon différentielle en fonction du stimulus activateur. Une étude réalisée au sein du laboratoire a démontré que, dans les cellules épithéliales de la prostate, ces deux mécanismes coexistaient et recrutaient des canaux de la famille TRP différents (Vanden Abeele *et al.* 2004). Cependant l'implication de STIM et d'Orai1 dans l'activation des canaux SOC dans les cellules épithéliales prostatiques n'a jamais été étudiée. De plus, le rôle de ces deux protéines dans la cancérogenèse prostatique n'est pas connu.



## II.D) Conclusion

Toutes ces données montrent l'extraordinaire diversité des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le maintien de l'homéostasie calcique au niveau du RE. Des travaux menés au laboratoire ont permis de mettre en évidence l'importance du maintien de l'intégrité du RE dans le processus d'activation de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques humaines (Skryma et al., 2000). Cependant, à ce jour, très peu de données existent en ce qui concerne les mécanismes mis en jeu dans ces cellules pour le maintien de l'homéostasie calcique réticulaire. Par exemple, au niveau des cellules prostatiques, aucune étude approfondie n'existe en ce qui concerne l'implication du complexe ribosome-translocon dans la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE.

De plus, malgré l'importance grandissante donnée au RE comme régulateur de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques, et le nombre grandissant d'études montrant l'importance des canaux TRPs (notamment TRPM8) sur la membrane du RE, aucune étude ne s'est intéressée à l'implication de TRPM8 sur la vidange calcique du RE et du rôle de cette vidange dans la cancérogenèse prostatique.

Enfin, l'ECC, qui est couplée aux variations de l'homéostasie calcique du RE, joue un rôle essentiel dans la physiopathologie prostatique, cependant la nature moléculaire des canaux SOCs n'est toujours pas connue dans les cellules épithéliales prostatiques.

# Problématique et objectifs

*Le chemin le plus court d'un point à un autre c'est de ne pas y aller.*

*Philippe Geluck*

*Extrait de L'Excellent du chat*

Le cancer de la prostate est la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme. Actuellement, les traitements hormonaux visent à diminuer le taux androgènes actifs. Malheureusement, avec le temps, les patients développent un cancer androgéno-indépendant dont l'issue est fatale.

Le  $\text{Ca}^{2+}$ , second messager ubiquitaire, est impliqué dans de nombreux processus tels que l'apoptose ou la prolifération. Le RE est un acteur essentiel de la signalisation calcique. Ainsi, l'étude de canaux calciques responsables de l'homéostasie calcique réticulaire est fondamentale dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce cadre, ma thèse est basée sur trois thématiques principales :

- 1] L'homéostasie calcique du RE est finement régulée. Cependant, même si l'étude des canaux calciques impliqués dans l'homéostasie calcique du RE s'est intensifiée (par exemple pour les  $\text{IP}_3\text{R}$  ou les  $\text{RyR}$ ), certains mécanismes de régulation de la concentration calcique réticulaire sont indépendants de ces deux canaux et restent méconnus.
- 2] La vidange calcique réticulaire active les canaux SOC de la membrane plasmique responsable de l'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$  afin de remplir le RE. Cependant, la nature moléculaire de ces canaux ainsi que leurs rôles dans la cancérogenèse prostatique restent encore inconnus.
- 3] Des dérégulations du calciosome, couplées aux variations de l'homéostasie calcique du RE, pourraient être en partie responsables de l'apparition et de l'évolution du cancer de la prostate. Il est donc important d'étudier l'évolution de la signalisation calcique au cours de la cancérogenèse prostatique.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de faire avancer, je l'espère, ces différentes thématiques. Les résultats obtenus sont répartis comme suit :

### **Identification du canal de fuite majoritaire des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines.**

- Quelle est l'implication du complexe ribosome-translocon dans la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE des cellules cancéreuses prostatiques humaines ?

### **Rôle de TRPM8 dans la vidange calcique réticulaire des cellules prostatiques.**

- TRPM8 est-il présent et est-il fonctionnel sur la membrane du RE des cellules cancéreuses prostatiques humaines ?
- Quels sont les mécanismes de régulation de la localisation de TRPM8 dans ces cellules ?
- Quel est le rôle de TRPM8 réticulaire ?

### **Evolution de la signalisation calcique durant la cancérogenèse prostatique.**

- Quelle est la nature moléculaire des canaux SOC des cellules cancéreuses prostatiques humaines ?
- La nature moléculaire de ces canaux varie t'elle lors de l'évolution du cancer de la prostate ?

**L'objectif général de ma thèse fut donc d'identifier de nouveaux mécanismes de régulation de la concentration calcique réticulaire et de déterminer leur implication dans la cancérogenèse prostatique.**

# Matériel et méthodes

*« Pour voir qu'il fait noir, on n'a pas besoin d'être une lumière. »*

*Philippe Geluck*

*Extrait de la bande dessinée L'avenir du chat*

Nous allons dans cette partie décrire les différentes techniques utilisées dans les articles, mais également de façon plus générale, au cours de la thèse. A titre personnel, j'ai concentré mes efforts sur les techniques de microscopie confocale, d'électrophysiologie, et d'imagerie calcique. Les travaux de biologie moléculaire reportés dans ce manuscrit ainsi que la majorité des travaux de biologie cellulaire sont le fruit de collaborations internes.

Le « matériel et méthode » relatif à chaque article est associé à ce dernier dans la partie « Résultats » ; ce chapitre présente globalement l'ensemble des techniques utilisées au cours de la thèse.

## **I) Culture cellulaire**

Au cours de ces travaux, plusieurs types cellulaires ont été utilisés:

- Les cultures primaires de prélèvements humains (hyperplasies bénignes et cancers de la prostate).
- La lignée cancéreuse androgéno-dépendante LNCaP provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, USA). Il s'agit d'une lignée établie à partir d'une biopsie d'un ganglion sous-axillaire métastasé prélevé sur un homme de 50 ans atteint d'un carcinome prostatique. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes, sont caractérisées par leur androgéno-dépendance et nécessitent donc la présence d'androgènes dans leur milieu de culture. Ces cellules expriment également le PSA (prostate specific antigen).
- La lignée cancéreuse androgéno-indépendante PC3 provenant de l'ATCC.
- La lignée HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) qui est une lignée transformée dérivant de cellules rénales corticales d'embryon humain (Simmons 1990).

La lignée LNCaP est cultivée dans le milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en L-glutamine (5 mM, Sigma, L'Isle d'Abeau, France) et en sérum de veau foetal décomplémenté (10 %, Seromed, Strasbourg).

La lignée PC3 est cultivée dans le milieu DMEM-HG (Gibco) supplémenté en L-glutamine (5 mM), en sérum de veau foetal décomplémenté (10 %), en insuline (ITS-X) et en testostérone.

La lignée HEK est cultivée dans le milieu DMEM-HG (Gibco) supplémenté en L-glutamine (5 mM) et en sérum de veau foetal décomplémenté (10 %).

Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>. Lorsque ces cellules arrivent à environ 80 % de confluence, elles sont décollées par une brève trypsinisation (trypsine-EDTA, 0,25 %, ICN, USA). L'effet de la trypsine est inhibé par l'ajout de milieu de culture complet et les cellules sont placées dans de nouveaux flacons de culture à 50000 cellules/ml. Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les deux jours.

Les cultures primaires et les primocultures sont principalement cultivées dans le milieu KSF-SFM (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en L-glutamine (5 mM), en sérum de veau foetal décomplémenté (1 %), en extrait pituitaire bovin et en « epidermal growth factor » (Suppléments pour le milieu KSF-SFM Gibco, Life Technologies, France). Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>. Lorsque ces cellules arrivent à environ 80 % de confluence, elles sont décollées par une solution de PBS-EDTA (2 mM). Les cellules sont ensuite centrifugées. Les cellules sont placées dans de nouvelles boîtes de culture (Primaria, Becton Dickinson, φ 35mm) à 50x000 cellules/ml. Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les jours.

## **II) Technique de microscopie par fluorescence**

Plusieurs techniques de microscopie par fluorescence ont été utilisées au cours de ma thèse. J'ai ainsi réalisé des mesures de variations de concentration calcique au sein des cellules par microscopie par fluorescence traditionnelle et par microscopie confocale dynamique. La technique de microscopie confocale a également été utilisée pour effectuer les expériences d'immunofluorescence.

### **II.A) Mesure de la concentration de calcium libre**

La technique d'imagerie calcique par fluorescence est couramment utilisée pour mesurer avec précision la concentration de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme ([Ca<sup>2+</sup>]cyt). Cette technique a l'avantage de permettre de mesurer les variations de [Ca<sup>2+</sup>]cyt simultanément sur plusieurs dizaines de cellules et ainsi de déterminer si l'application ou le prétraitement des cellules avec une drogue donnée modifie l'homéostasie calcique. Cette technique est assez facile à réaliser et apporte rapidement un résultat brut. Ce dernier nécessite néanmoins un approfondissement par des techniques complémentaires telles que le patch clamp. En effet, l'homéostasie calcique est la conséquence de l'activité de nombreuses protéines comprenant les canaux ioniques transmembranaires, mais aussi, les échangeurs et les pompes. Il est donc fondamental dans notre stratégie d'utiliser la technique de patch clamp en complément afin

d'enregistrer spécifiquement le fonctionnement des canaux ioniques. Quoiqu'il en soit, du fait de son accessibilité et de sa rapidité d'exécution, cette technique reste donc un élément important dans l'étude préliminaire des canaux calciques.

### II.A.1) Equipement optique

L'équipement est composé d'un microscope à épifluorescence (Olympus IX 70), d'une lampe au xénon, d'un monochromateur Till Photonics, d'une caméra digitale CCD (Charge Coupled Device) 12 bits (MicroMax 5 MHz, Princeton) et d'un ordinateur dont le logiciel (Métafluor 5.0, Universal Imaging) permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des images. Les différentes longueurs d'ondes émises par la lampe à Xénon sont contrôlées par un monochromateur. Les UltraViolets émis sont dirigés par une fibre optique vers la préparation grâce à un miroir dichroïque. Sous stimulation de l'une ou de l'autre des deux longueurs d'onde d'excitation, les cellules chargées en fura-2 émettent de la fluorescence. Cette lumière est transmise au travers du miroir dichroïque vers la caméra CCD. La matrice de cette caméra est composée de l'assemblage de photodiodes dont les coordonnées x,y définissent un point dans le plan de l'image. Chaque photodiode convertit une intensité lumineuse en « niveau de gris » (z) par un convertisseur approprié. Un point image, est donc défini par trois valeurs x,y,z et est appelé pixel (picture element – littéralement, élément image). Ces trois valeurs sont codées en un signal numérique qui est traité par le logiciel d'analyse.

### II.A.2) Charge des cellules en Fura-2/AM

La charge est réalisée dans le milieu de culture à raison de 2,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  de Fura-2/AM pendant 45 minutes à température ambiante. Les cellules sont alors incubées durant 10 minutes supplémentaires avec du milieu de culture sans sonde afin de rincer le surplus celle-ci dans le milieu extracellulaire. Les cellules sont finalement rincées avec du milieu HBSS standard (Hank's Balanced Salt Solution) dont la composition est la suivante : 140 NaCl, 5 KCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 0.3  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ , 0.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4  $\text{NaHCO}_3$ , 5 glucose, et 10 HEPES. Le pH est ajusté à 7.4 avec du NaOH.

### II.A.3) Le Fura-2

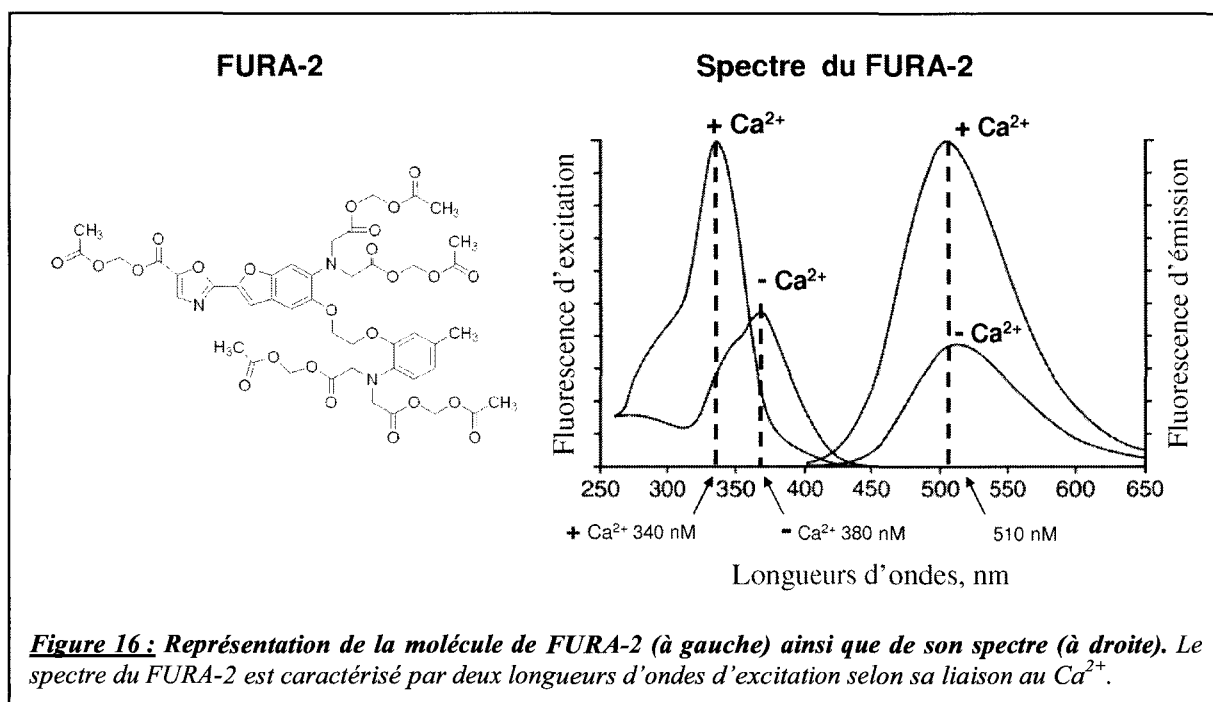
Le fura-2 est une sonde calcique dérivée du fluorophore stilbène possédant quatre fonctions carboxyles dont l'arrangement spatial octacoordonné est caractéristique des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA. Il existe deux formes de fura-2 : La forme libre, hydrophile, chargée négativement et acide. Sous cette forme, le fura-2 est fluorescent et cette propriété varie en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $K_d=225\text{nM}$ ).



Néanmoins, la forme libre du fura-2 est incapable de rentrer dans les cellules et il faut donc le microinjecter à l'aide d'une micropipette de verre.

La forme estérifiée, perméante et non-chargée, appelée acétoxyméthylester de fura-2 (Fura-2/AM). Le fura-2/AM est capable de pénétrer dans les cellules, où le groupement acétoxyméthylester est clivé par les estérases cytoplasmiques. Le clivage de cette fonction par les estérases stabilise la sonde sous sa forme acide dans le cytosol des cellules. La sonde est alors séquestrée dans le cytoplasme et émet de la fluorescence en fonction de la  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

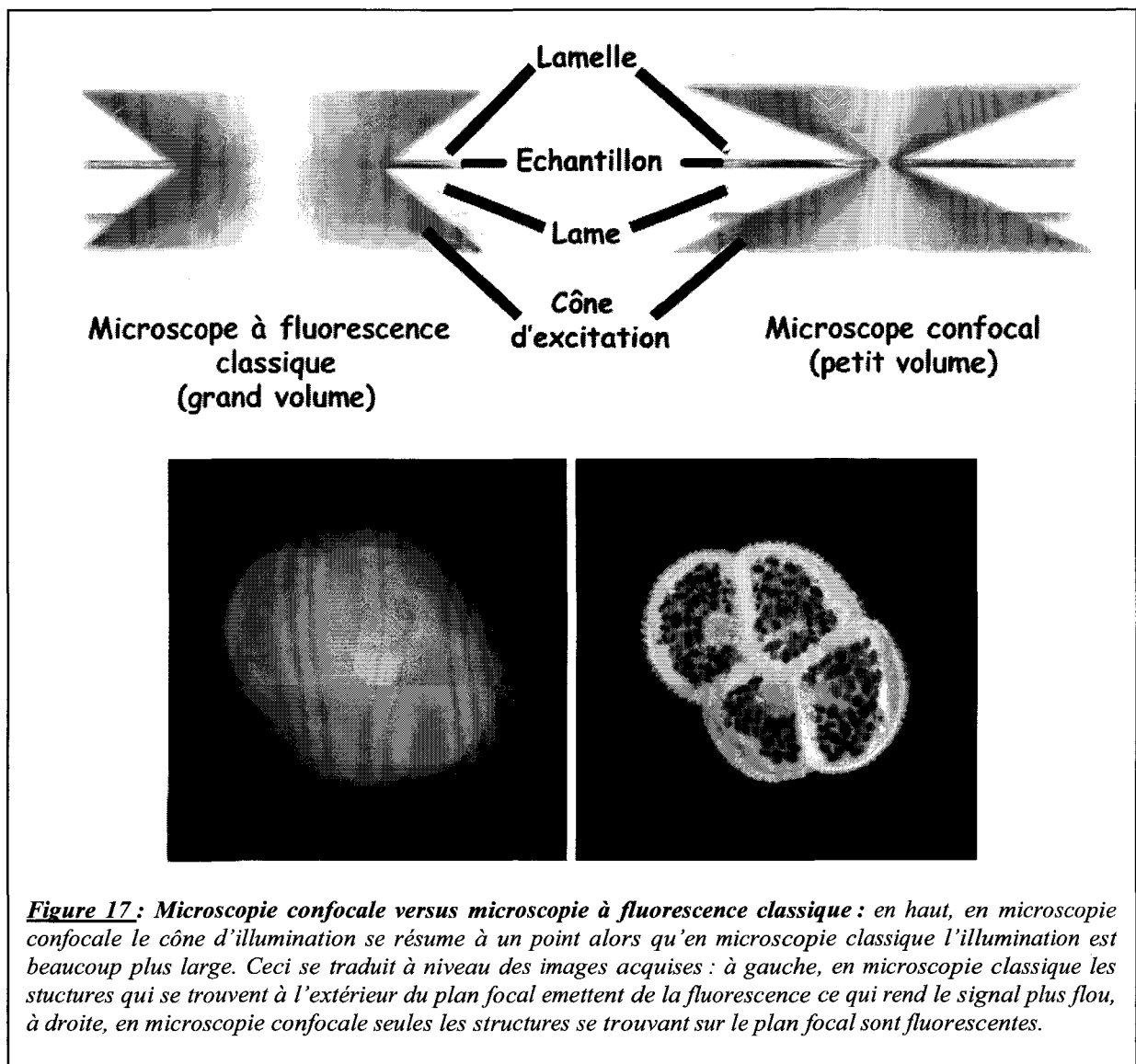
Le fura-2 est un fluorophore à double longueur d'onde d'excitation et à longueur d'onde d'émission unique (figure 16). Le fura-2 libre de  $Ca^{2+}$  a une longueur d'onde d'excitation maximale située à 380 nm alors que la longueur d'onde maximale d'excitation du Fura-2/ $Ca^{2+}$  est de 340 nm. Quelque soit la concentration de  $Ca^{2+}$ , la longueur d'onde d'émission du fura-2 est de 510 nm. Ainsi, lorsque le  $Ca^{2+}$  augmente dans le cytoplasme des cellules, ceci se traduit par une diminution de la fluorescence émise à 510 nm suite à une excitation à 380 nm alors que la fluorescence émise à 510 nm suite à excitation à 340 nm augmente.



## II.B) Mesure des variations de calcium par microscopie confocale

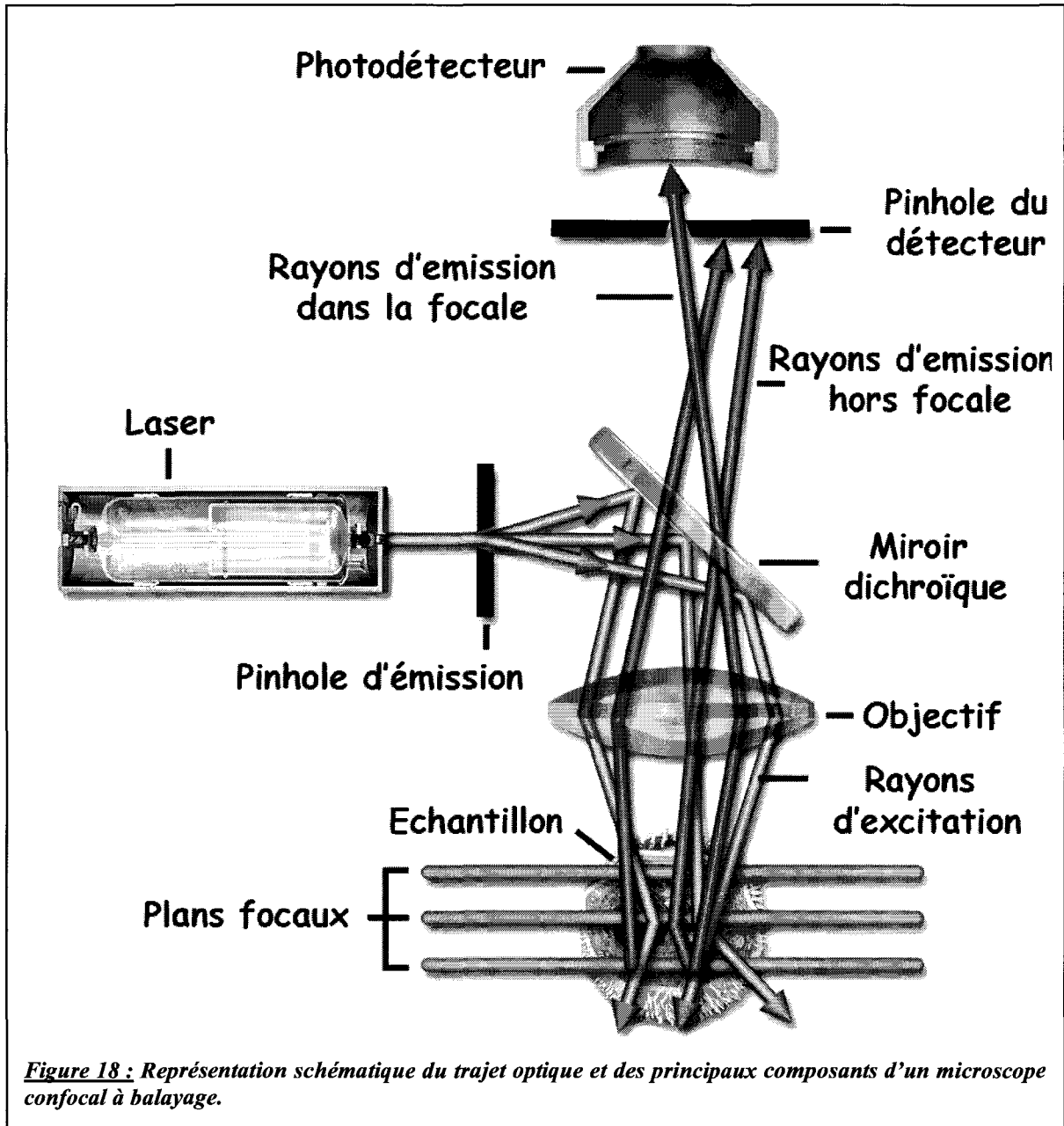
L'étude des variations de  $Ca^{2+}$  entre les différents compartiments calciques cellulaires a nécessité l'emploi d'une deuxième technique de microscopie par fluorescence, il s'agit de la microscopie confocale.

La microscopie confocale offre de nombreux avantages par rapport à la microscopie à fluorescence classique : le contrôle de la profondeur de champ, l'élimination ou la réduction du bruit de fond et la possibilité d'obtenir une série de coupe focale afin d'effectuer une reconstitution 3D de l'échantillon. Ainsi cette technique permet, du fait de sa très haute résolution spatio-temporelle, la mesure qualitative du  $\text{Ca}^{2+}$  dans différents organites (RE, mitochondrie). De plus, cette technique permet également la mesure des variations de calcium dans deux organites simultanément.



## II.B.1) Equipement optique

Le principe clé d'un microscope confocal est l'utilisation de filtres spatiaux (les pinholes : petits trous qui se trouvent sur le trajet optique) qui permettent d'éliminer tous les rayons lumineux qui sont émis en dehors du plan focal.



**Figure 18 :** Représentation schématique du trajet optique et des principaux composants d'un microscope confocal à balayage.

Le schéma général d'un microscope confocal est présenté en figure 18. Le laser émet des rayons lumineux qui traversent le pinhole d'excitation. Celui-ci permet de diriger les rayons sur le plan focal désiré (plus le pinhole est ouvert, plus la profondeur de champ est grande). Les rayons sont ensuite dirigés vers le spécimen grâce au miroir dichroïque. Les

structures fluorescentes du spécimen émettent ensuite des rayons qui traversent le miroir dichroïque puis le pinhole du détecteur. Ce dernier permet de sélectionner uniquement la fluorescence provenant du plan focal.

Au laboratoire, 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 (O.N=1,3) et 60x (O.N=1,4) associés à une unité contrôlant les lasers (unité confocale Zeiss). La fluorescence émise est ensuite reçue au niveau de photomultiplicateurs qui transforment l'information lumineuse en information numérique. Ces signaux sont alors traités grâce à un ordinateur doté d'un logiciel spécifique (AIM 3.2) qui recrée les images en fausses couleurs avec une résolution allant jusqu'à 2048\*2048 pixels.

L'avantage de la microscopie confocale est lié à sa haute résolution spatio-temporelle. Ceci permet de réaliser des mesures de variations calciques au sein d'un ou de plusieurs organites. Cette spécificité est également le fruit du développement de sondes fluorescentes ayant des caractéristiques très différentes liées à la nature des événements que l'on souhaite mesurer. Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler avec différentes sondes (voir figure 22 pour la structure) permettant de mesurer la concentration de  $Ca^{2+}$  dans différents organites (voir figure 23 pour des enregistrements caractéristiques).

### II.B.2) Mesure de la concentration de calcium cytoplasmique.

Il s'agit d'une sonde sensible au  $Ca^{2+}$  ( $K_d=345$  nm) aux caractéristiques proches des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA.

Contrairement au Fura2, cette sonde ne possède qu'une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda=494$ nm) et n'émet de la fluorescence que quand elle est liée au  $Ca^{2+}$  ( $\lambda=516$ nm). Le fluo-4 permet donc de mesurer les variations qualitatives de  $Ca^{2+}$  sans pouvoir mesurer sa concentration. Cette sonde, utilisée en microscopie confocale, permet ainsi de mesurer les variations de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme. Les variations qualitatives du contenu en  $Ca^{2+}$  du cytoplasme sont exprimées sous la forme du ratio de la fluorescence (F) divisé par la fluorescence initiale (F0) au cours du temps ( $f/f_0$ ) (figure 19).

La charge des cellules se fait à température ambiante, dans de l'HBSS contenant 2mM de  $Ca^{2+}$  avec 2.5 $\mu$ M de sonde pendant 25 minutes suivies d'un rinçage de 30 minutes.

### II.B.3) Mesure de la concentration de calcium réticulaire.

La mesure de la  $[Ca^{2+}]$  dans un organite particulier nécessite l'utilisation de deux sondes : la première sonde permet de localiser l'organite, la sonde permet de suivre les variations de la  $[Ca^{2+}]$  (respectivement pour le RE : la brefeldin A Bodipy et le Mag Fluo 4).

L'utilisation de filtres spécifiques permet de visualiser séparément les longueurs d'ondes d'émission de ces deux sondes (figure 19).

*II.B.3.a) Le Mag Fluo-4*

Cette sonde sensible au  $Ca^{2+}$  ( $K_d=22 \mu M$ ) et au magnésium ( $K_d=4,7 \text{ mM}$ ) permet de mesurer sélectivement les variations qualitatives de  $Ca^{2+}$  dans le réticulum endoplasmique. Cette sonde se localise préférentiellement dans le réticulum endoplasmique mais également dans le cytoplasme. Afin d'éviter la contamination de mesure calcique par des variations de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme, les cellules sont perméabilisées par un détergent, la digitonine, ce qui induit une fuite de la sonde Mag-Fluo4 résiduelle dans le cytoplasme (figure 23).

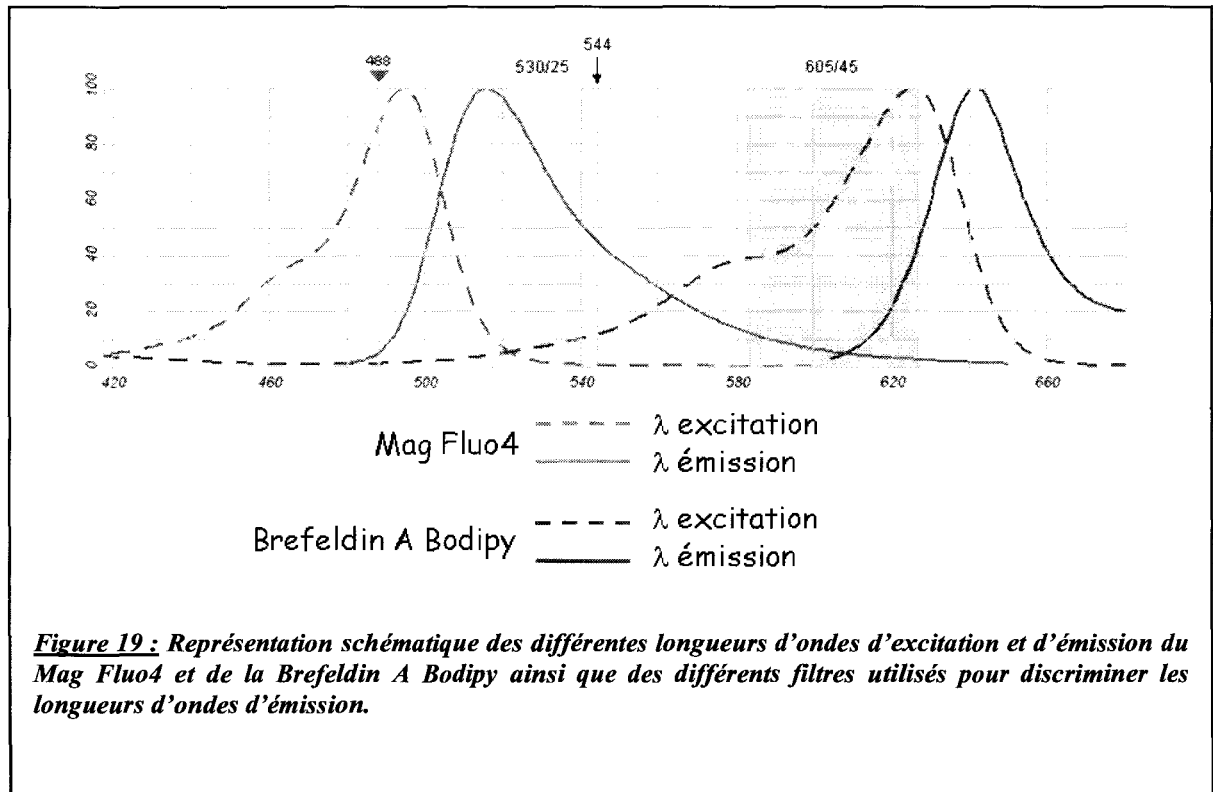
$\lambda_{Excitation} = 493 \text{ nm} / \lambda_{émission} = 517 \text{ nm}$

La charge des cellules se fait à température ambiante, dans de l'HBSS contenant 2mM de  $Ca^{2+}$  avec 2.5 $\mu M$  de sonde pendant 25-30 minutes suivies d'un rinçage pendant 1heure.

*II.B.3.b) Brefeldin A Bodipy.*

Cette sonde est principalement utilisée pour visualiser spécifiquement le RE. La brefeldin A est un inhibiteur réversible du transport protéique du RE vers le golgi. Son couplage avec le bodipy permet de visualiser le RE.

$\lambda_{Excitation} = 559 \text{ nm} / \lambda_{émission} = 568 \text{ nm}$



**Figure 19 :** Représentation schématique des différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du Mag Fluo4 et de la Brefeldin A Bodipy ainsi que des différents filtres utilisés pour discriminer les longueurs d'ondes d'émission.

## II.B.4) Mesure de la concentration de calcium intra-mitochondriale.

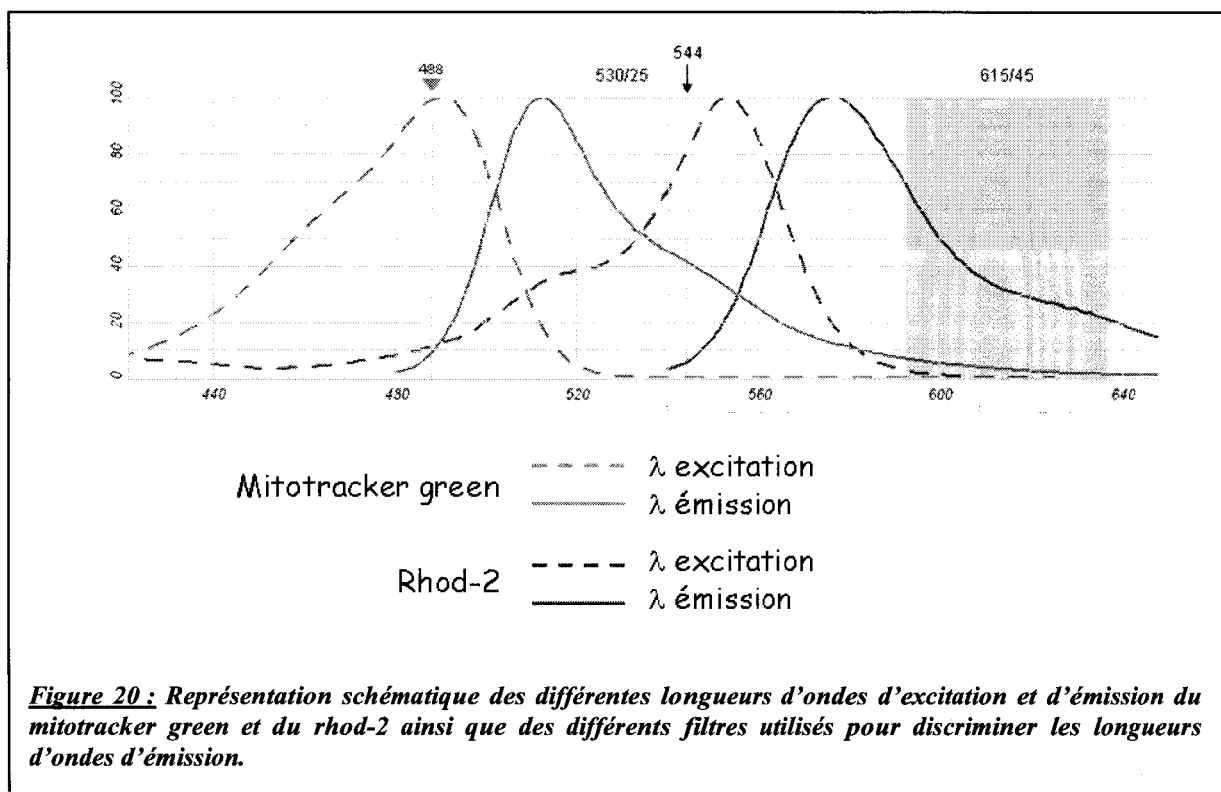
La mesure de la  $[Ca^{2+}]$  dans la mitochondrie nécessite l'utilisation de deux sondes : la première sonde permet de localiser l'organite, la sonde permet de suivre les variations de la  $[Ca^{2+}]$  (respectivement : le mitotracker green et le rhod-2). L'utilisation de filtres spécifiques permet de visualiser séparément les longueurs d'ondes d'émission de ces deux sondes (figure 20).

### II.B.4.a) Le Rhod-2

Le rhod-2 est une sonde marquant spécifiquement les mitochondries ayant un potentiel mitochondrial élevé. Il s'agit d'une sonde calcique rouge qui permet de mesurer les variations qualitatives de  $Ca^{2+}$  dans les mitochondries. L'affinité du rhod-2 pour le  $Ca^{2+}$  est très faible par rapport à celle du Fluo-4. Le Rhod-2 permet de mesurer uniquement des variations qualitatives de  $Ca^{2+}$  de grandes amplitudes. Ceci évite par ailleurs la contamination de l'enregistrement par des variations de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique mesurées par du Rhod-2 résiduel dans le cytosol.

$\lambda$ Excitation  $Ca^{2+}$  libre = 549 nm /  $\lambda$ Emission = pas d'émission en l'absence de  $Ca^{2+}$

$\lambda$ Excitation  $Ca^{2+}$  = 542 nm /  $\lambda$ émission  $Ca^{2+}$  libre = 581 nm



La charge des cellules se fait à température ambiante, dans de l'HBSS contenant 2mM de  $\text{Ca}^{2+}$  avec 2 mM de sonde pendant 5 minutes suivis d'un rinçage d'une heure.

L'utilisation du rhod-2 est généralement associée à l'utilisation d'une autre sonde : le mitotracker qui permet de valider que les variations de  $\text{Ca}^{2+}$  observé avec le rhod-2 sont spécifiques de la mitochondrie.

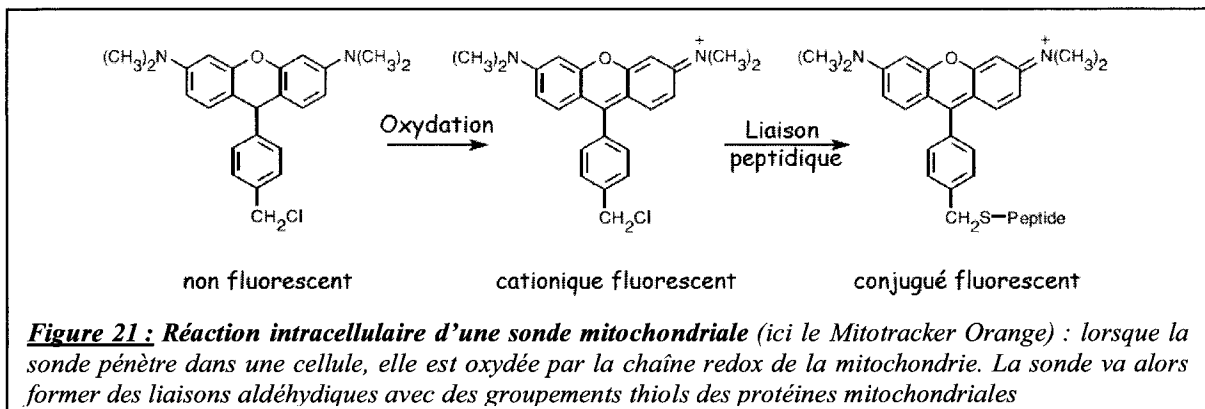
#### II.B.4.b) Le Mitotracker

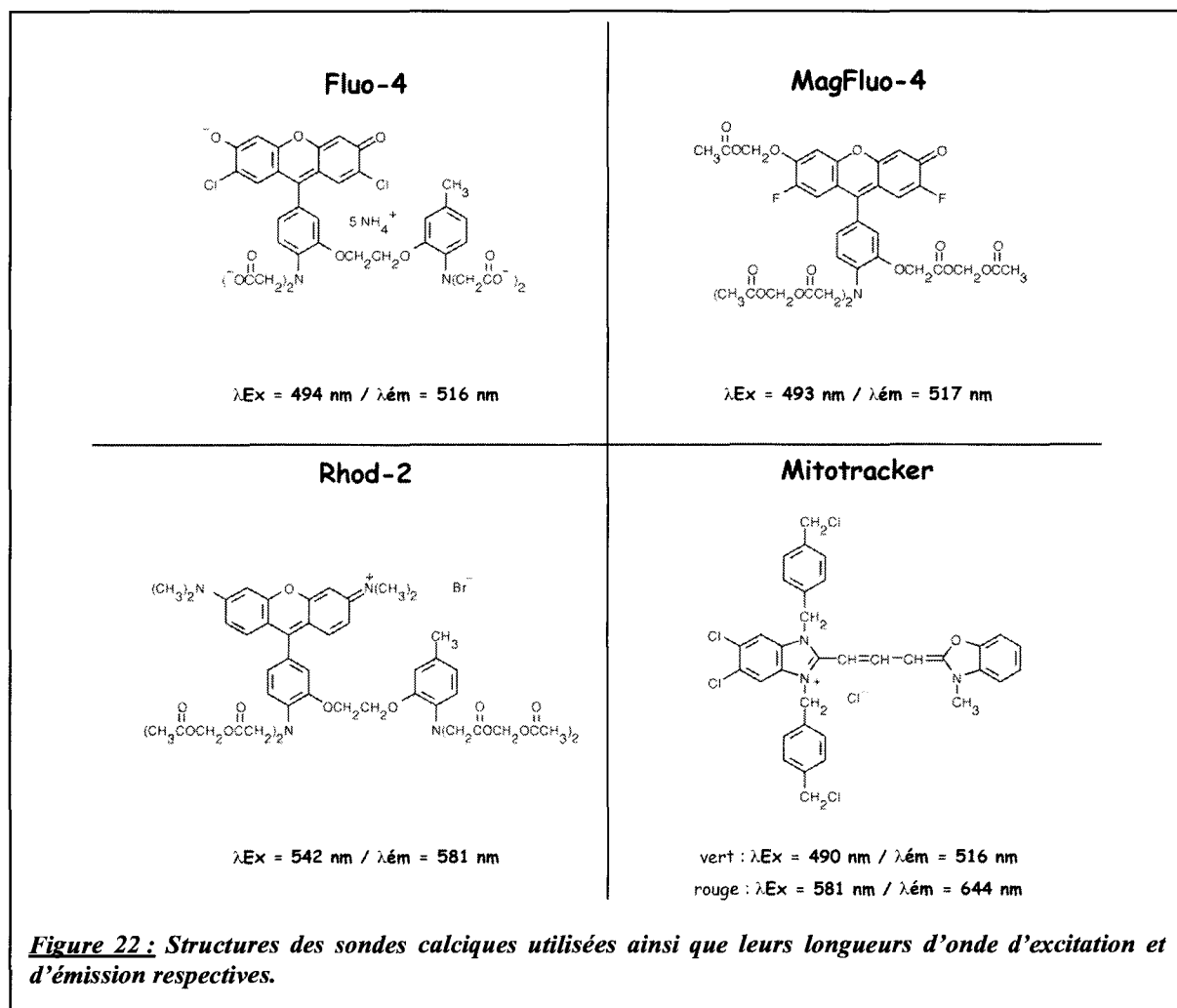
Le mitotracker est une sonde qui marque les mitochondries quelque soit le potentiel mitochondrial mais n'est pas sensible aux variations de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cet adressage spécifique est principalement dû aux liaisons aldéhydiques qui se forment entre le groupement chlorométhyl de la sonde oxydée et les groupements thiols des protéines intra-mitochondriales (figure 21). Cette sonde marque donc plus spécifiquement les mitochondries que le Rhod-2.

Pour le mitotracker vert :  $\lambda_{\text{Excitation}} = 490 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{émission}} = 516 \text{ nm}$

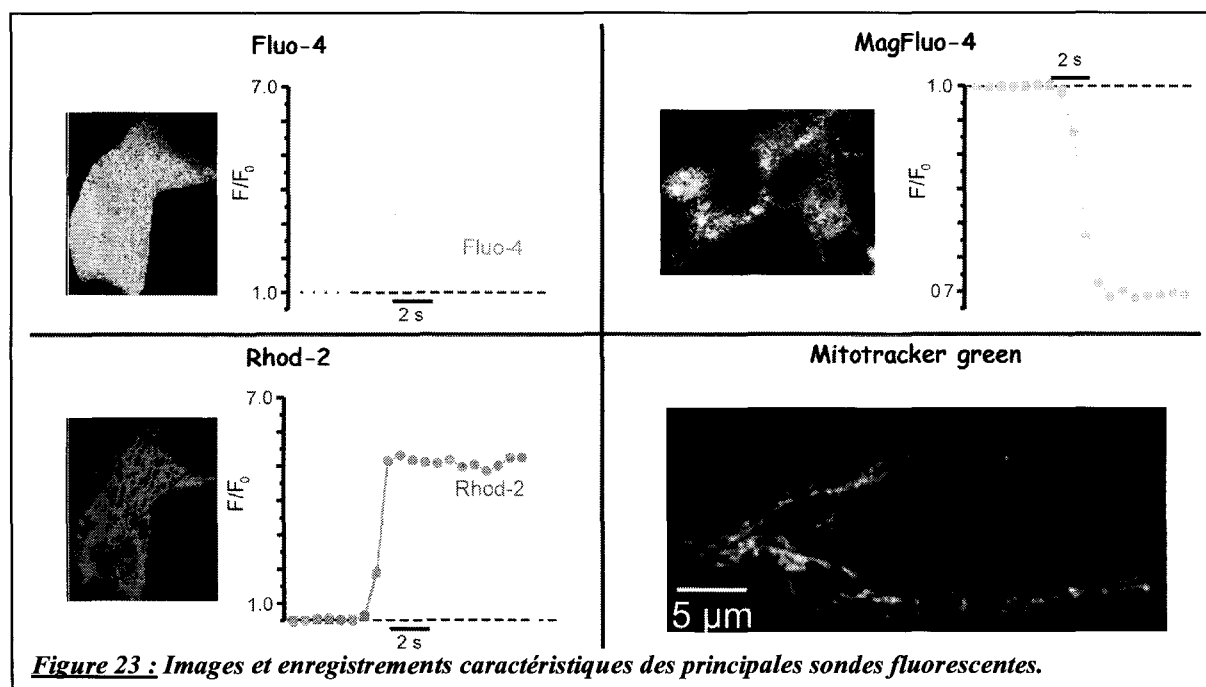
Pour le mitotracker rouge :  $\lambda_{\text{Excitation}} = 581 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{émission}} = 644 \text{ nm}$

La charge des cellules se fait à température ambiante, dans de l'HBSS contenant 2mM de  $\text{Ca}^{2+}$  avec 2-5 $\mu\text{M}$  de sonde pendant 30 minutes suivies d'un rinçage de 30 minutes.





**Figure 22 :** Structures des sondes calciques utilisées ainsi que leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives.



**Figure 23 :** Images et enregistrements caractéristiques des principales sondes fluorescentes.



### **III) Electrophysiologie**

#### **III.A) Patch Clamp**

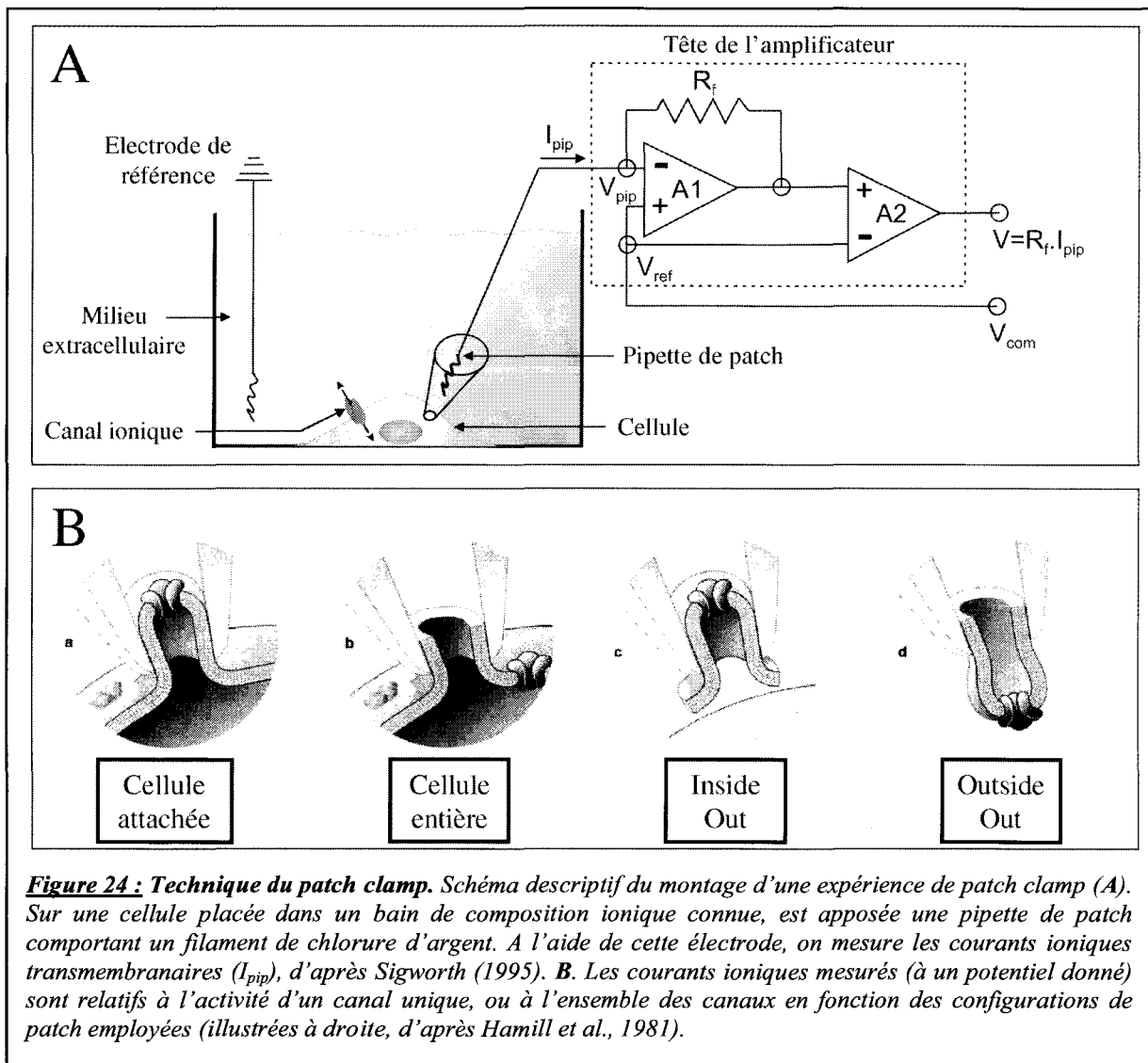
Les expériences électrophysiologiques sont réalisées à l'aide de la technique du « patch clamp » (figure 11A). Cette dernière consiste à isoler électriquement un fragment de membrane cellulaire (Patch en anglais) en apposant contre la cellule une pipette de verre d'un diamètre de l'ordre du micromètre ( $10^{-6}$  m). Puis, il faut appliquer une légère dépression dans cette pipette de verre afin d'obtenir une résistance de contact entre la pipette et la membrane cellulaire de l'ordre du gigaohm ( $G\Omega$  10<sup>9</sup> ohms). Ce protocole permet alors d'imposer un potentiel (Clamp en anglais) en mesurant simultanément des fluctuations de courant de l'ordre du picoampère (pA,  $10^{-12}$  A) avec une fréquence très élevée ( $> 1$  kHz).

Il existe plusieurs configurations d'étude (figure 11B) permettant d'enregistrer soit l'activité d'un seul canal ionique (enregistrements unitaires), à savoir les configurations « cellule attachée », « inside-out » et « outside-out » ; soit de tous les canaux situés dans la membrane plasmique c'est-à-dire la configuration « cellule entière ».

Historiquement, le Patch Clamp désigne les configurations d'enregistrement de canaux individuels (Single-channel Recording), cependant le terme de patch clamp désigne maintenant aussi la configuration cellule entière (Whole Cell Recording) qui permet la mesure de courants macroscopiques.

Dans la configuration cellule entière (ou whole cell), la pipette de patch ( $R \approx 4$  M $\Omega$ ) possédant un diamètre interne de l'ordre de  $1 \mu\text{M}$ , est apposée à la membrane d'une cellule. Une légère aspiration induit alors un contact intime entre la pipette de borosilicate et la membrane plasmique caractérisé par une très haute résistance électrique, qualifiée de « Giga seal » ( $R > 10$  Giga $\Omega$ ). Une légère aspiration supplémentaire induit alors une rupture du fragment membranaire situé immédiatement sous la pipette mettant ainsi en contacte la solution intrapipette et le cytoplasme de la cellule étudiée.

Les courants ioniques transmembranaires sont mesurés à l'aide d'un amplificateur EPC9 (HEKA Electronic, Allemagne). Les signaux sont visualisés sur un écran d'ordinateur, stockés directement sur le disque dur de l'ordinateur et analysés grâce au programme Origin 7.0 (Microcal, Northampton, MA).



Nous obtenons ainsi l'enregistrement de l'activité des canaux ioniques membranaires ainsi que leurs caractéristiques biophysiques. La caractéristique principale des courants ioniques est la relation courant (I) / potentiel (V), souvent désignée par le sigle I/V. En effet, cette relation est propre à chaque type de canal ionique et nous permet donc d'identifier avec plus ou moins de précision l'identité de la protéine impliquée dans la genèse du courant.

### III.B) Solutions utilisées

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé différentes solutions extracellulaires et intracellulaires. Les variations de composition de ces solutions sont liées au type de canal étudié. Les compositions ioniques de ces différentes solutions sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Sel	I <sub>TRPM8</sub>		I <sub>SOC</sub>	
	Extra	PIPETTE	Extra	PIPETTE
NaCl	140	8	145	-
CH <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SCs	-	-	-	120
CsCl	-	-	-	10
	5	145	5	-
KCl	2	0.5	10	-
CaCl <sub>2</sub>	2	0.1	1	6
MgCl <sub>2</sub>	0.4	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	-	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	10	10	10	10
HEPES	-	-	-	10
BAPTA	-	1	-	-
EGTA	5	-	5	-
Glucose	NaOH	KOH	NaOH	CsOH
pH adj				

Pour les solutions extracellulaires, le pH est ajusté à 7.4 par ajout de NaOH (ou HCl au besoin); l'osmolarité est ajustée à 330 mosm.l<sup>-1</sup> par ajout de D-mannitol.

Pour les solutions intracellulaires, le pH est ajusté à 7.2 par ajout de KOH, de CsOH, ou d'acide glutamique; l'osmolarité est ajustée à 295 mosm.l<sup>-1</sup> par ajout de D-mannitol.

#### IV) Immunodétection

Les expériences d'immunodétection sont principalement issues de collaborations internes.

##### IV.A) 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 de petite taille et/ou hydrophiles, sur un gel de PolyVinylidène Fluoride (PVDF) si elles sont de grande taille 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 sont présentés dans chaque article), 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 densitométrie, puis le rapport de l'intensité de la protéine d'intérêt divisée par l'intensité d'un rapporteur comme l'actine ou la calnexine permet de semi-quantifier l'expression de la protéine d'intérêt.

#### IV.B) Technique d'immunofluorescence

L'immunofluorescence indirecte consiste à détecter une protéine spécifique au sein de la cellule par l'intermédiaire de deux anticorps dont le second est couplé à un fluorophore. L'immunofluorescence nécessite tout d'abord de fixer les cellules. Deux techniques différentes de fixation, à savoir le PFA (ParaFormaldéhyde) et l'acétone ont été utilisées pour fixer les cellules. Le choix entre ces deux modes de fixation dépend des anticorps utilisés. Brièvement, la fixation avec l'acétone consiste à plonger la lamelle dans de l'acétone et à la laisser incuber 10 minutes à -20°C. La lamelle est ensuite rincée plusieurs fois avec du PBS. L'avantage de l'acétone est qu'il perméabilise les cellules en même temps qu'il fixe les molécules. La fixation au PFA est réalisée en incubant la lamelle 10 min sur la glace dans du PFA 4%. La lamelle est ensuite lavée 3 fois 10 min dans le PBS.

Les images des cellules ont été réalisées sur un microscope confocal (Zeiss). Les fluorochromes verts (excitation à 488 nm) sont excités par un laser Argon alors que les

fluorochromes rouges (excitation 546 nm) sont excités par un laser Hélium-Néon. La lumière est transmise à l'échantillon par le biais d'une fibre optique puis d'un miroir dichroïque.

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 (O.N=1,3) et 60x (O.N=1,4) associés à une unité contrôlant les lasers (unité confocale Zeiss). Les signaux sont traités à l'aide d'un logiciel spécifique (AIM 3.2).

# Résultats

*« Il vaut mieux se tromper et le reconnaître que ne pas se tromper et le nier !*

*Je me trompe ? »*

*Philippe Geluck*

Les résultats obtenus au cours des quatre dernières années seront présentés sous forme d'articles scientifiques (publiés, soumis à la publication ou en préparation) ou sous forme de résultats préliminaires.

Afin de faciliter la compréhension, les résultats sont présentés en trois parties :

**Identification du canal de fuite majoritaire des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines.**

**Rôle de TRPM8 dans la vidange calcique réticulaire des cellules prostatiques.**

**Evolution de la signalisation calcique durant la cancérogenèse prostatique**

⋮

## **I) Identification du canal de fuite majoritaire des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines.**

### **I.A) Article 1**

**“Passive calcium leak *via* translocon is a first step for iPLA<sub>2</sub>-pathway regulated Store Operated Channels activation”**

M. Flourakis, F. Van Coppenolle, V. Lehen'kyi, B. Beck, R. Skryma and N. Prevarskaya  
FASEB J. 2006 Jun;20 (8):1215-7 (inserm-00137702)

L'étude des mécanismes de régulation de la concentration de calcium intra-réticulaire se révèle particulièrement importante pour la compréhension de la régulation de la signalisation calcique. Actuellement, le mécanisme le plus énigmatique pour la régulation de la concentration calcique intra-réticulaire étant la fuite passive de calcium, nous nous sommes tout particulièrement intéressé au candidat le plus susceptible d'être un canal de fuite : le translocon.

En effet celui-ci est : (i) une protéine canal (Simon and Blobel 1991), (ii) perméable aux ions et aux petites molécules neutres (Roy and Wonderlin 2003), et (iii) est le plus large pore de la membrane du RE (Hamman et al. 1997).

C'est pour ces raisons que l'on peut émettre l'hypothèse que le translocon pourrait être un canal de fuite pouvant laisser passer le calcium de l'intérieur du RE vers le cytoplasme.

Les études effectuées ont permis de mettre en évidence par quels mécanismes physiologiques a lieu la fuite passive. Ainsi, nous verrons tout particulièrement le rôle du translocon en tant que canal de fuite. Nous étudierons également l'implication du translocon dans la fuite passive de calcium induite par la thapsigargine afin de découvrir son mécanisme d'action.



## Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA<sub>2</sub>-pathway regulated store operated channels activation

Matthieu Flourakis,<sup>1,2</sup> Fabien Van Coppenolle,<sup>1,2</sup> Vyacheslav Lehen'kyi, Benjamin Beck, Roman Skryma, and Natalia Prevarskaya<sup>1</sup>

INSERM U800, Villeneuve d'Ascq, France; Université Lille I, Villeneuve d'Ascq, France; and Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Villeneuve d'Ascq, France

**ABSTRACT** Calcium concentration within the endoplasmic reticulum (ER) plays an essential role in cell physiopathology. One of the most enigmatic mechanisms responsible for Ca<sup>2+</sup> concentration in the ER is passive calcium leak. Previous studies have shown that the translocon complex is permeable to calcium. However, the involvement of the translocon in the passive calcium leak has not been directly demonstrated. Furthermore, the question whether the passive store depletion via the translocon could activate SOC (store operated channels) replenishing the ER, remains still unresolved. In this study, for the first time, we show that thapsigargin and calcium chelators deplete ER via translocon. Indeed, using confocal imaging, we demonstrate that when the number of opened translocons was lowered neither thapsigargin nor calcium chelators could induce ER store depletion. We also demonstrate that calcium leakage occurring via the translocon activates store-operated current, which is, by its kinetic and pharmacology, similar to that evoked by thapsigargin and EGTA (but not IP<sub>3</sub>), thus highlighting our hypothesis that calcium leakage via the translocon is a first step for activation of the specific iPLA<sub>2</sub>-regulated SOC. As the translocon is present in yeast and mammalian cells, our findings suggest that translocon-related calcium signaling is a common phenomenon.—Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R., Prevarskaya, N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA<sub>2</sub>-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J.* 20, E409–E416 (2006)

*Key Words:* calcium leak • store-operated channels • translocon • iPLA<sub>2</sub> • calcium homeostasis

THE ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) is the largest calcium store in all types of cells, playing a major role in Ca<sup>2+</sup> signaling and cell physiopathology (1, 2). Tight regulation of ER lumen Ca<sup>2+</sup> concentration is essential for protein folding and maturation (3, 4).

Under resting conditions, ER Ca<sup>2+</sup> concentration results from a balance between the activity of SERCA pumps (sarcoplasmic and ER calcium ATP-ases), which

import calcium into the ER lumen and calcium leak that balances the influx created by the pumps. This balance between Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca<sup>2+</sup> leakage appears to be a common property of Ca<sup>2+</sup>-stores. However, if the SERCA pumps are now extensively studied, the passive calcium leak remains the most enigmatic of the processes involved in regulation of calcium homeostasis.

The main experimental way to study this passive calcium leak consists in pharmacological artificial shifting the ER calcium balance toward calcium leakage due to either suppression of ER Ca<sup>2+</sup> uptake (classical SERCA pump inhibitor thapsigargin), or to excessive cytosolic Ca<sup>2+</sup> buffering (calcium chelators as EGTA). Indeed, these commonly used drugs induce calcium release from the ER. Nevertheless, the mechanism responsible for this type of calcium leak and its molecular counterpart are still ill-defined and remain for a long time one of the most intriguing question of cell biology.

The studies of Wonderlin's group have shown that the permeability of the ER is dynamically coupled to protein synthesis and that polarized molecules could cross the ER membrane through the translocon, the complex implicated in protein translocation during translation (5, 6). Indeed, two previous studies of Lomax et al. (7) and of our group (8) have demonstrated that the translocon complex (opened by puromycin) is permeable to calcium and, therefore, the authors suggested that translocon could potentially play a role in calcium leakage. However, the involvement of the translocon in the passive calcium leak due to thapsigargin and calcium chelators has never been directly demonstrated.

Furthermore, it is well established that ER depletion could activate store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) (9).

<sup>1</sup> Correspondence: Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Bâtiment SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. E-mail: flourakismatt@yahoo.fr; fabien.vancoppenolle@univ-lille1.fr; natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr

<sup>2</sup> These authors equally contributed to this work.  
doi: 10.1096/fj.05-5254fje

This process triggers an increase of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, in order to replenish internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Indeed, previous studies undertaken by our laboratory have put forward the hypothesis of the coexistence in the single cell type of two functionally distinct types of store-operated channels (SOC), depending on the mode of store depletion (10): (i)  $\text{SOC}_{\text{CC}}$  (conformational coupling), activating by  $\text{IP}_3$  and involving "active" dynamic protein-protein interaction between  $\text{IP}_3$  receptors and SOC, and (ii)  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$  (calcium influx factor) activating by  $\text{iPLA}_2$ -regulated signaling stimulated following passive leakage from intracellular stores (with thapsigargin and BAPTA) (11, 12). The alternative terminology for these distinct classes of  $\text{Ca}^{2+}$ -conducting channels has later been proposed by Bolotina (13): SOCs, which are activated by depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  stores through  $\text{CIF-iPLA}_2$  pathway, and  $\text{IP}_3\text{ROCs}$ , which are activated by  $\text{IP}_3\text{R}$  through a direct coupling mechanism. However, it is important to note that the preferential mode of SOC activation may also depend on the degree of ER compartmentalization due to existence of specialized ER subregions involved in different SOC-controlling signaling pathways (14, 15). Considering this as well as a potential physiological role of translocon in ER depletion, in the present study we asked whether or not the store depletion via the translocon could activate SOCE and, if so, what would be the type of SOC activated and the mechanism of "translocon-to-SOC" coupling.

Hence, for the first time, we demonstrate directly that thapsigargin and EGTA deplete ER via open translocon complex. Furthermore, by electrophysiological and calcium imaging techniques, we demonstrate that calcium leakage occurring via the translocon can activate  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$  current (but not  $\text{SOC}_{\text{CC}}$  current!), which, by its kinetic and pharmacology is similar to SOC current induced by thapsigargin and EGTA (but not by  $\text{IP}_3$ ), thus highlighting our hypothesis that the translocon-mediated calcium leakage is a first step for  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$  activation. Moreover, since our results show that SOC current mediated by translocon is inhibited by specific  $\text{iPLA}_2$  inhibitors, this work also hints to a new  $\text{Ca}^{2+}$  pathway with a crucial role in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

LNCAp cells from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Inc., Fontenay sous Bois, France) supplemented with 5 mM L-glutamine (Life Technologies, Inc., L'Isle d'Abeau, France), 10% FBS (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France) and 1% kanamycin (Life Technologies, Inc., L'Isle d'Abeau, France). Cells were routinely grown in 50 ml flasks (Nunc, Poly-labo) and kept at 37°C in a humidified incubator in an air/ $\text{CO}_2$  (95/5%) atmosphere. For  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments, the cells were subcultured in Petri dishes (Nunc) and used after 3–6 d.

### Calcium imaging

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  was measured by using ratiometric dye Fura-2 and quantified according to Grynkiewicz and Tsien formula (25). The extracellular solution contained: NaCl-120, KCl-6,  $\text{CaCl}_2$ -2,  $\text{MgCl}_2$ -2, HEPES-10, and glucose (Glc)-12. For  $\text{Ca}^{2+}$ -free HBSS,  $\text{CaCl}_2$  was removed and EGTA (0.5 mM) was added.

### Calcium imaging within the ER

LNCAp cells were grown on glass coverslips and loaded with 5  $\mu\text{M}$  of Mag-Fluo 4 acetoxymethyl ester (AM) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), for 45 min at 37°C. After incubation with the dye, the plasma membrane was selectively permeabilized: cells were rinsed briefly in a high  $\text{K}^+$  solution of the following composition (in mM): KCl-125, NaCl-25, HEPES-10, EGTA-1,  $\text{CaCl}_2$ -0.5, and  $\text{MgCl}_2$ -0.1 (free  $\text{Ca}^{2+}$  clamped to 170 nM, pH 7.2) and exposed for 1 min to the same solution at 37°C in presence of digitonin (0.5 mg/ml). Permeabilized cells were then continuously perfused with the high- $\text{K}^+$  solution supplemented with 0.2 mM Mg-ATP. Ratio imaging measurements of Mag-Fluo 4 were made using a confocal microscope (LSM 510, Zeiss, Le Pecq, France).

### Patch clamp recording

Membrane currents in LNCAp cells were recorded in the whole-cell configuration using the patch-clamp technique and also by using a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic, Germany) as described previously (10). Patch pipettes were made on a P-97 puller (Sutter, Novato, CA) from borosilicate glass capillaries (WPI, Sarasota, FL). Extracellular solution used to record  $\text{Ca}^{2+}$ -carried  $\text{I}_{\text{SOC}}$  contained (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 10  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 5 Glc, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with TEA OH). The pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs Methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA, 6  $\text{MgCl}_2$  (pH adjusted to 7.2 with CsOH).

### Barium imaging

The rate of  $\text{Ba}^{2+}$  increases was measured using  $\text{Ca}^{2+}$  dye Fluo-4 AM. Ratio imaging measurements of Fluo 4 were made using a confocal microscope (LSM 510, Zeiss, Le Pecq, France). The extracellular solution contained: NaCl-120, KCl-6,  $\text{CaCl}_2$ -2,  $\text{MgCl}_2$ -2, HEPES-10, and Glc-12 and BaCl-2 was added when necessary.

### Western blot analysis

Subconfluent LNCAp cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl; 1 mM PMSE; 1% Nonidet P-40; and protease inhibitor cocktail from Sigma (L'Isle d'Abeau, France). The lysates were centrifuged 15,000 g at 4°C for 20 min, mixed with a sample buffer containing: 125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 5%  $\beta$ -mercaptoethanol; 20% glycerol; 0.01% bromophenol blue. Total protein samples were subjected to 8–10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semidry Western blotting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The membrane was blocked in a 5% milk containing TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.5; 140 mM NaCl; and 0.05% Tween 20) overnight then probed using specific rabbit polyclonal anti- $\beta$   $\text{iPLA}_2$  (Calbiochem) and anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co., Fremont, CA) antibodies. The bands on the mem-

brane were visualized using enhanced chemiluminescence method (Pierce Biotechnologies Inc., San Francisco, CA).

**Reagents and chemicals**

All chemicals were purchased from Sigma except Fura-2-acetoxymethyl ester (Euromedex, France). rBEL and sBEL were generously provided by Dr. Victoria Bolotina (Boston University School of Medicine).

**Data analysis and statistics**

Each experiment was repeated several times. Data were analyzed by using PulseFit (HEKA Electronics, Germany) and Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Results were expressed as mean ± SEM.

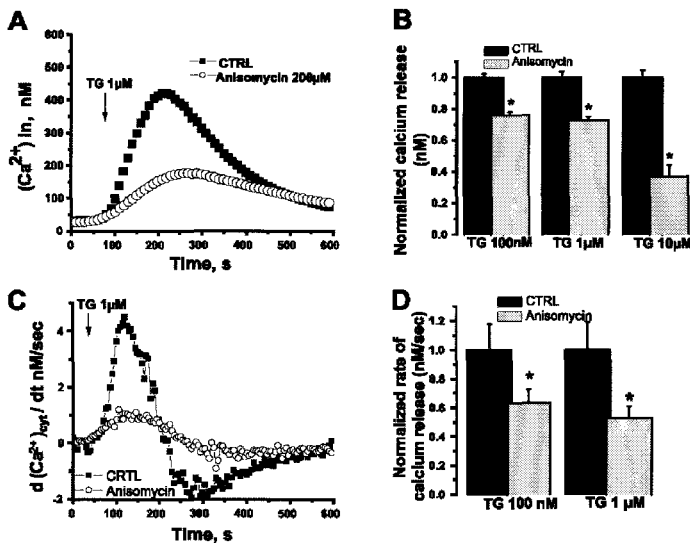
**RESULTS**

**Involvement of the translocon in calcium leak from the ER evoked by thapsigargin and EGTA**

To study the possible role of translocon in calcium leak, we first used thapsigargin, a classic SERCA pump inhibitor. We measured, in a Ca<sup>2+</sup>-free medium, the passive calcium leak using Fura-2 (2 μM) as a calcium cytoplasmic dye. **Figure 1A** shows the time course of a representative thapsigargin (1 μM) response in a calcium-free medium. Under control conditions, the cytoplasmic calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>) peak was 235.5 ± 8.85 nM (n=150). The cells were treated with anisomycin, a peptidyl-transferase inhibitor (16), to reduce the number of opened translocons (8). In anisomycin-treated cells (200 μM, 1 h), the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> peak decreased by 36%, as compared with control conditions (n=150). **Figure 1B** illustrates the peak values of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> increase evoked by thapsigargin (100 nM, 1 and 10 μM) in anisomycin-pretreated cells and in

control cells. **Figure 1C** shows quantification of Ca<sup>2+</sup> leakage, taken from Fura-2 measurements. Anisomycin pretreatment resulted in a significant decrease of the rate of calcium leakage from the ER (4.05 ± 0.4 nM/s in control conditions (n=150) and 1.03 ± 0.1 nM/s in anisomycin treated cells (n=150)). Peak values of the calcium leakage rate induced by TG (1 μM and 100 nM) under control conditions and in anisomycin-treated cells are shown in **Figure 1D**.

To study translocon-related variations in the ER specifically, we performed further investigations using the compartmentalized fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator Mag fluo 4 on cells that had been permeabilized using digitonin treatment. In this series of experiments, we used various drugs that are known to induce passive Ca<sup>2+</sup> leakage such as thapsigargin, EGTA, ionomycin, and also IP<sub>3</sub>, which induces active calcium release specifically via IP<sub>3</sub>R. Puromycin (200 μM), thapsigargin (1 μM), and EGTA (1 mM) induced a decrease in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> [respectively 30 ± 2.3% (n=35), 29.6 ± 3.1% (n=32), 52.65 ± 3.2% (n=68)] (see **Fig. 2A-C**). After an anisomycin pretreatment, the release was only 5 ± 2.5% (n=53), 12.3 ± 0.766% (n=40), and 28.88 ± 2.11% (n=43) for puromycin-evoked, thapsigargin-evoked, and EGTA-evoked Ca<sup>2+</sup> release, respectively. Furthermore, we used ionomycin (1 μM), which induces a nonspecific calcium store depletion of 72.5 ± 3.53%, a decrease in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> (n=30). This Ca<sup>2+</sup> calcium release was not inhibited by anisomycin pretreatment (74.366 ± 1.458%) (n=62) (see **Fig. 2D**). Finally, IP<sub>3</sub>, which induces a calcium-store depletion independent of passive calcium leakage, induced a 12.4 ± 1.4% decrease in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> (n=17). This release was not inhibited by anisomycin pretreatment (12.8 ± 2.1%) (n=34) (**figure 2E**). Moreover, puromycin had a cumulative effect after IP<sub>3</sub>-induced calcium release, which was not observed in anisomycin-pretreated cells. **Figure**



**Figure 1.** Anisomycin treatment reduces thapsigargin-induced calcium release from the ER. **A)** Typical [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> traces in response to 1 μM thapsigargin under control conditions and after 1-h incubation with 200 μM anisomycin. All measurements were made at room temperature in a Ca<sup>2+</sup>-free HBSS. **B)** Cumulative data (mean ± SEM) of peak [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> increases evoked by thapsigargin (100 nM, 1 μM, 10 μM) responses under control conditions (n=150) and with anisomycin 200 μM (n=150). **C)** The apparent Ca<sup>2+</sup> leak rate is plotted as a function of time after application of thapsigargin (1 μM). **D)** Cumulative data (mean ± SEM) of the peak Ca<sup>2+</sup> leak rate evoked by thapsigargin (100 nM, 1 μM, 10 μM) responses under control conditions (n=150) and with anisomycin 200 μM (n=150).

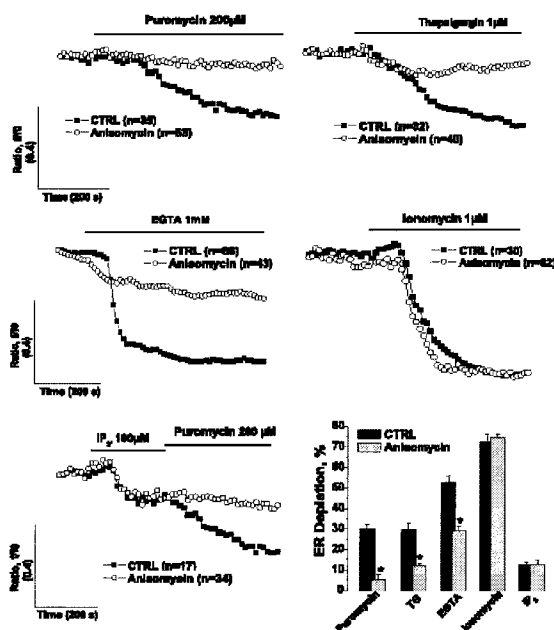


Figure 2. Anisomycin treatment reduces leak channel activity in the ER membrane. Typical traces of the estimate of passive  $Ca^{2+}$  leak in digitonin-permeabilized cells with the use of puromycin 200  $\mu$ M (A), thapsigargin 1  $\mu$ M (B), EGTA 1 mM (C), ionomycin 1  $\mu$ M (D),  $IP_3$  100  $\mu$ M (E), under control conditions (plotted as black squares), and after 1-h incubation with 200  $\mu$ M anisomycin (plotted as open circles). F) Cumulative data (mean  $\pm$  SEM) for % release from internal  $Ca^{2+}$  stores.

2F illustrates the peak values of  $[Ca^{2+}]_{ER}$  depletion evoked by puromycin 200  $\mu$ M, thapsigargin 1  $\mu$ M, EGTA 1 mM, ionomycin 1  $\mu$ M, and  $IP_3$  100  $\mu$ M under control conditions and in anisomycin-treated cells. Taken together, these results suggest that the translocon is the main channel through which  $Ca^{2+}$  passive leakage occurs in cancer prostate epithelial cells.

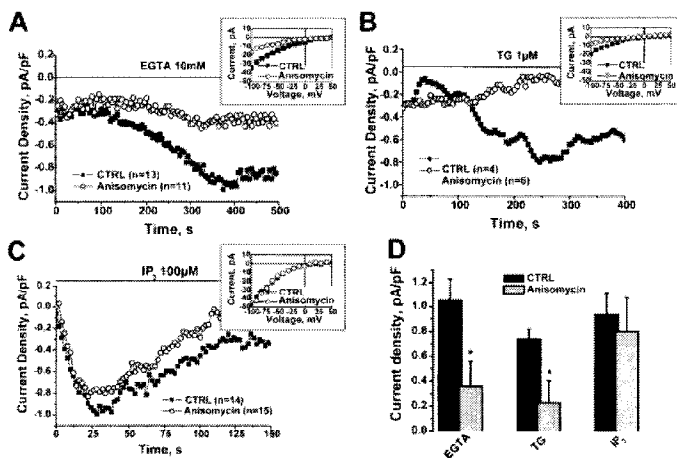
$Ca^{2+}$  leakage through translocon activates SOCE

To further explore the putative role of translocon in  $Ca^{2+}$  homeostasis, it was also potentially rewarding to examine whether passive store depletion via the translocon could activate SOCE through SOC (store-operated channels). In complete agreement with our previous studies (10) store-operated current ( $I_{SOC}$ ) could be activated either passively (by TG-mediated store depletion in response to extracellular application of 0.1  $\mu$ M TG or by excessive cytosolic  $Ca^{2+}$  buffering with EGTA) or actively by inclusion of 100  $\mu$ M  $IP_3$  in the intracellular pipette solution. In our experiments, lowering the number of opened translocon by anisomycin resulted in a decrease of the SOC current (induced by TG and EGTA) density evaluated during whole-cell recording. The typical time courses of the  $I_{SOC}$  and the corresponding current-potential (IV) relations recorded from control cells and cells treated with anisomycin 200  $\mu$ M for 1 h are shown in Fig. 3A-C and a summary of the data gathered is laid out in Fig. 3D. Anisomycin pretreatment reduced both EGTA-evoked and thapsigargin-evoked  $I_{SOC}$ . For EGTA:  $1.05 \pm 0.18$  pA/pF under control condition ( $n=13$ ) and  $0.36 \pm 0.2$  pA/pF after anisomycin pretreatment ( $n=11$ ). For thapsigargin,  $0.73 \pm 0.08$  pA/pF ( $n=4$ ) under control conditions and  $0.22 \pm 0.182$  pA/pF after anisomycin pretreatment ( $n=6$ ), see Fig. 3A, B, and D. The same pretreatment was unable to reduce the  $IP_3$ (100  $\mu$ M)-evoked  $I_{SOC}$  ( $0.93 \pm 0.178$  pA/pF under control conditions ( $n=14$ ) and  $0.8 \pm 0.27$  pA/pF after anisomycin pretreatment ( $n=15$ )), see Fig. 3C and D. Puromycin was also able to activate a small  $I_{SOC}$  (0.2 pA/pF), however, this trend was hardly monitored (data not shown).

iPLA<sub>2</sub> activity is required for SOC activation evoked by passive  $Ca^{2+}$  leakage occurring through the translocon

Recent studies have shown the involvement of the  $Ca^{2+}$ -independent phospholipase A2 (iPLA<sub>2</sub>  $\beta$ ) (11) in the mechanism of SOC activation by passive  $Ca^{2+}$

Figure 3.  $Ca^{2+}$  passive leak via translocon activates  $I_{SOC}$ . Representative time courses of the whole cell  $I_{SOC}$  in LNCaP cells evoked by EGTA 10 mM (A), thapsigargin 1  $\mu$ M (B), and  $IP_3$  100  $\mu$ M (C) under control conditions (plotted in black squares) and after anisomycin pretreatment (open circles). D) Cumulative data (mean  $\pm$  SEM) of maximal current density under control conditions, or with anisomycin 200  $\mu$ M pretreatment.



leakage. Therefore, using a specific inhibitor of iPLA<sub>2</sub> β (sBEL), we have studied further the potential involvement of this enzyme in the I<sub>SOC</sub> activated following the store depletion via translocon. We first detected iPLA<sub>2</sub> β by Western blotting in epithelial cancer cell line (LNCaP cells) (see Fig. 4A). Figure 4B represents the typical time course of EGTA (10 mM)-evoked I<sub>SOC</sub> (1.32 ± 0.19 pA/pF; n=12). I<sub>SOC</sub> was inhibited by BEL (25 μM) and sBEL (10 μM), the active enantiomere on iPLA<sub>2</sub> β (respectively, 0.32 ± 0.11 pA/pF; n=7 and 0.34 ± 0.17 pA/pF; n=6). rBEL (10 μM) and the inactive enantiomere on iPLA<sub>2</sub> β (1.43 ± 0.10 pA/pF; n=7) was without effect. We also checked whether BEL inhibits the IP<sub>3</sub>-evoked I<sub>SOC</sub>. Figure 4C represents the typical time course of the I<sub>SOC</sub> evoked by IP<sub>3</sub> (1.54 ± 0.4 pA/pF; n=7). BEL treatment resulted in a small decrease of IP<sub>3</sub>-induced I<sub>SOC</sub> (1.1 ± 0.2 pA/pF; n=9). Nevertheless, the observed decrease was statistically nonsignificant. A summary of the data gathered is presented in Fig. 4D. These results hint to the involvement of iPLA<sub>2</sub> β in SOC activation by Ca<sup>2+</sup> passive leakage.

We also investigated whether Ca<sup>2+</sup> passive leakage occurring specifically through the translocon could activate the SOC current via iPLA<sub>2</sub> activation. As previously noted, puromycin activates a very small I<sub>SOC</sub>, which was hardly monitored. To avoid this problem, we measured the SOCE using barium imaging with Fluo 4 (5 μM) as a Ca<sup>2+</sup> cytoplasmic dye. As shown in Fig. 5A, puromycin induced a rise of [Ba<sup>2+</sup>]<sub>in</sub>, which was absent in a barium free solution. In anisomycin-pretreated cells, this increase was inhibited by 76.7 ± 5.3% (n=43), in BEL-pretreated cells the same increase was reduced by 90.3 ± 1.4% (n=47). Thapsigargin induced a similar rise of [Ba<sup>2+</sup>]<sub>in</sub>, see Fig. 5C. This increase was reduced in a barium-free solution (this was due to thapsigargin-evoked ER depletion). The thapsigargin-evoked SOCE was reduced in anisomycin-pretreated and BEL-pretreated cells [respec-

tively, 45.1 ± 5.3% (n=74) and 88.3 ± 1.4% (n=49)]. A summary of this data is presented in Fig. 5E. These results clearly indicate that, even if puromycin-evoked I<sub>SOC</sub> is very small, calcium leakage occurring specifically via the translocon activates iPLA<sub>2</sub>-regulated SOCE.

DISCUSSION

In the present work, we have demonstrated that the translocon is the main Ca<sup>2+</sup> leak channel in epithelial prostate cancer cells and that physiological passive store depletion through the translocon could activate SOC via an iPLA<sub>2</sub> β-dependent mechanism.

The mammalian translocon complex contains several subunits (Sec61α, Sec61β, Sec61γ, TRAM, and Bip) and numerous associated proteins such as SP, calnexin, and SRP (17). The stoichiometry of the translocon (especially the pore structure) is still unknown (18). In physiological conditions, the pore diameter of the ribosome-free translocon is 0.9 to 1.5 nM (19). During translation, in ribosome-bound conditions, the pore aperture has a theoretical diameter of between 4 and 6 nM (20). This pore is the largest one in the ER's membrane, and it has been suggested that it is involved in Ca<sup>2+</sup> leakage (21).

To study the passive calcium leak through the translocon, our experimental approach was based on the pharmacological modulation of the translocon's open state using two antibiotics: puromycin (a translation inhibitor, which specifically releases polypeptide chains, leaving the translocon open) and anisomycin (an inhibitor of peptidyl-transferase, leaving the translocon closed) (8). It is important to note that, given the crucial role of the translocon in translation and the number of translocon-constitutive subunits, such classical approaches as the employment of siRNA (or antisens) to abolish the expression of at least one subunit of

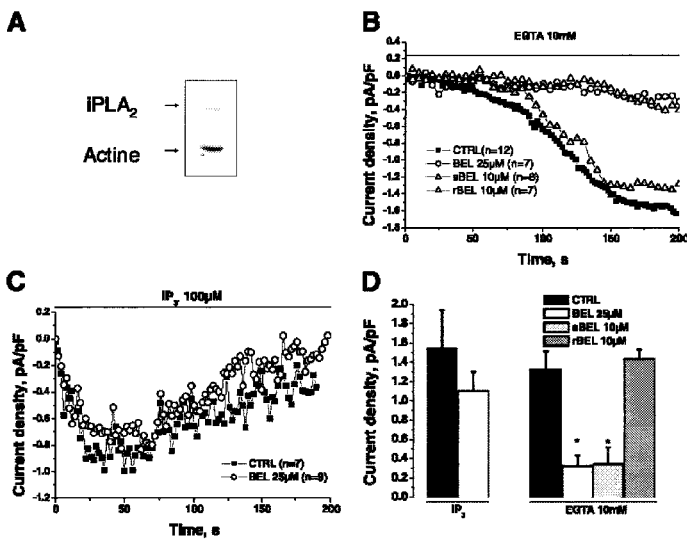
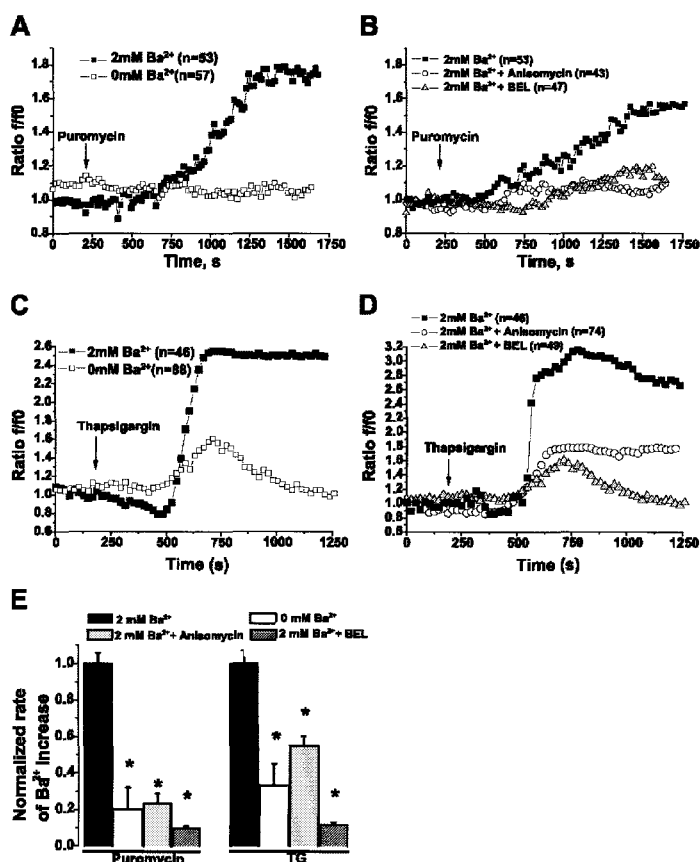


Figure 4. I<sub>SOC</sub> evoked by passive calcium leak via translocon is iPLA<sub>2</sub>-dependent. A) Western blot detection of iPLA<sub>2</sub>β in LNCaP cells. B, C) Representative time courses of the whole cell I<sub>SOC</sub> in LNCaP cells evoked by EGTA 10 mM or IP<sub>3</sub> 100 μM under control conditions and after BEL treatment. D) Cumulative data (mean ± SEM) for maximal current density.



**Figure 5.** Puromycin- and thapsigargin-evoked calcium leakage activates SOCE. Typical  $[Ba^{2+}]_e$  traces in response to puromycin 200  $\mu M$  (A) and thapsigargin 1  $\mu M$  (B) under control conditions and after pretreatment with 200  $\mu M$  anisomycin or BEL 25  $\mu M$  (C, D). E) Cumulative data (mean  $\pm$  SEM) for the normalized rate of barium increase.

the translocon, such as Sec61 $\alpha$  or overexpressing the whole translocon complex in lipid bilayers, were not deemed appropriate. Therefore, our experimental approach is currently the only one that enables decreases in  $[Ca^{2+}]_{ER}$ , which occur through the translocon to be accurately measured in living cells.

One of the protocols we used to check the involvement of the translocon in passive store depletion consisted in applying thapsigargin to inhibit  $Ca^{2+}$  reuptake in the ER. This drug is commonly used to inhibit SERCA pumps. During thapsigargin application, calcium leaks from the ER to the cytoplasm. However, the exact mechanism by which ER depletion occurs after thapsigargin has been applied remains unclear.

Thus, in the present study, we measured the effects of exposure to anisomycin over a long time period (200  $\mu M$ , 1 h) on thapsigargin-evoked  $Ca^{2+}$  release from the ER. Anisomycin pretreatment of LNCaP cells (loaded with Fura-2) induced a significant decrease in the amplitude and rate of thapsigargin response, compared with control (Fig. 1). We obtained similar results with human prostate primary cultures (data not shown in this paper). In a previous study we showed that anisomycin treatment reduced the coefficient of colocalization between Sec61 and the ribosome (8). This implies

that the number of opened translocon and consequently of  $Ca^{2+}$  leak channels is lowered after anisomycin treatment. Thus, the effect of anisomycin on thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  release is due to a decrease in the number of ribosome-bound translocon complexes, which are involved in  $Ca^{2+}$  leakage.

Another protocol we used to observe  $Ca^{2+}$  leakage from the ER was to use mag-fluo 4 to measure directly the changes in luminal  $Ca^{2+}$  release induced by thapsigargin (Fig. 2). Under the experimental conditions we put in place, permeabilized LNCaP cells were perfused with an "internal medium" with the same ATP concentration throughout the experiment (100  $\mu M$ ), in order to avoid  $Ca^{2+}$  leakage evoked by ATP (22). Puromycin, thapsigargin, and EGTA induced a decrease in  $[Ca^{2+}]_{ER}$ , but this decrease was greatly reduced after anisomycin pretreatment. Anisomycin treatment did not fully abolish the thapsigargin- and EGTA-evoked  $Ca^{2+}$  release. This may indicate that other proteins could be involved in association with the translocon in  $Ca^{2+}$  leak. Taken together, these results hint to the considerable role of the translocon in ER passive store depletion but not in active store depletion.

It is well established that in physiological conditions ER permeability is coupled to protein synthesis (19): the  $Ca^{2+}$  leaks through the pore of the translocon after

release of the nascent protein (8). Furthermore, an interesting study undertaken by Potter and Nicchitta (23) demonstrated that the ribosome stays on the translocon after translation. So, at this juncture,  $\text{Ca}^{2+}$ -release through the translocon probably occurs and could be a way for the cell to regulate  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ . It is also known that the translocon is involved in ER-associated degradation (ERAD) during ER stress (24). Therefore,  $\text{Ca}^{2+}$  release via the translocon may also occur during ER stress.

To further explore the putative role of translocon in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, it was potentially rewarding to examine whether passive store depletion via the translocon could activate SOC. In our experiments, lowering the number of opened translocon using anisomycin led to a decrease in EGTA- and thapsigargin-evoked ER depletion. This was consistent with the decrease in SOCE density evaluated during whole-cell recording (see Fig. 3). The same pretreatment does not inhibit  $\text{IP}_3$ -evoked  $I_{\text{SOC}}$ . Intriguingly, in our experiments, puromycin induced very small  $I_{\text{SOC}}$ , which could be barely monitored. This could be due to the fact that the  $\text{Ca}^{2+}$ , which is released by the translocon, may have been directly reuptaken into the ER by SERCA pumps or by mitochondria. To avoid such regulation, we used a classical approach for SOCE investigation with barium as carried ion (Fig. 5). In these experiments, puromycin (like thapsigargin) could induce a capacitative barium entry due to SOC activation. Taken together, these results show that ER store depletion occurring through the translocon activates SOC in prostatic cancer epithelial cells.

Finally, we were interested in determining the mechanism of SOC activation after  $\text{Ca}^{2+}$  leak through the translocon. A recent work has put forward the  $\text{iPLA}_2$  as an intermediate molecule between passive store depletion and SOC activation (11). According to this hypothesis, dissociation of the complex calmodulin (CaM)- $\text{iPLA}_2$  by the CIF activates SOC. Indeed, the constitutive complex  $\text{CaM-iPLA}_2$  inhibits  $\text{iPLA}_2$  activity (11), but when CIF dissociates CaM from  $\text{iPLA}_2$ , it triggers production of lysophospholipids, such as lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidylinositol (LPI), which directly activate  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$ . In the present work, we have demonstrated, using a specific inhibitor of  $\text{iPLA}_2$  (sBEL), that the activation of  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$  evoked by  $\text{Ca}^{2+}$  leakage occurring via the translocon is  $\text{iPLA}_2$  dependent (Fig. 4).

In summary, as shown in Fig. 6, we have demonstrated that the passive calcium leak translocon channel mediates the thapsigargin- and EGTA-induced calcium release. We have also shown that calcium release that occurs via the translocon activates store-operated calcium current. This is the first characterization of SOCE triggered by a passive calcium leak channel with identified molecular structure in the ER. Our results also hint to a new  $\text{Ca}^{2+}$  pathway with a crucial role in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis:  $\text{Ca}^{2+}$  leakage occurring through the translocon may induce CIF formation and/or CIF release from the ER, which dissociates CaM from  $\text{iPLA}_2$  and

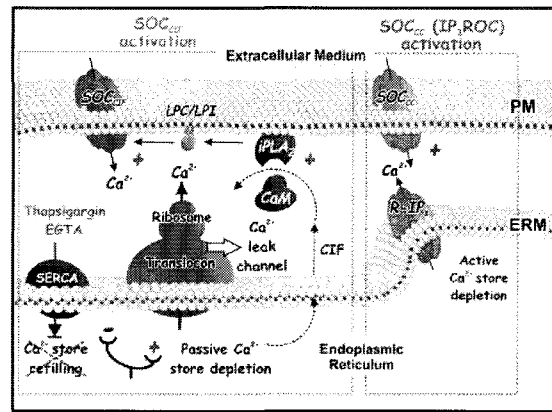


Figure 6. Speculative model for  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$  activation after calcium leak via the translocon. This activation occurs after passive ER depletion facilitated by thapsigargin or EGTA. On such depletion, CIF could be released from the ER and could stimulate membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{iPLA}_2$ ), which in turn activates  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$  after production of lysophospholipids. In contrast,  $\text{IP}_3\text{R}$  stimulation would directly activate  $\text{SOC}_{\text{CC}}$  ( $\text{IP}_3\text{R}/\text{OC}$ ) via protein-protein interaction. This latter pathway seems to be independent of  $\text{Ca}^{2+}$  leakage that occurs through the translocon. (ERM: ER membrane; PM: plasma membrane).

so leads to the production of lysophospholipids and to  $\text{SOC}_{\text{CIF}}$  activation.

As the translocon complex is present in yeast and mammalian cells, our findings suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis using translocon pathways is a common phenomenon. [F]

This work was supported by the INSERM (INSERM), the Région Nord-Pas de Calais (regional government in the northern-most part of France), the Ligue Nationale contre le Cancer (the National Anti-Cancer League) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, the Foundation for Medical Research).

## REFERENCES

- Nicotera, P., Zhivotovskiy, B., and Orrenius, S. (1994) Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* **16**, 279-288
- Berridge, M. J. (1995) Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays* **17**, 491-500
- Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**, 197-205
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* **74**, 595-636
- Heritage, D., and Wonderlin, W. F. (2001) Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. *J. Biol. Chem.* **276**, 22655-22662
- Roy, A., and Wonderlin, W. F. (2003) The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 4397-4403
- Lomax, R. B., Camello, C., Van Coppenolle, F., Petersen, O. H., and Tepikin, A. V. (2002) Basal and physiological  $\text{Ca}^{2+}$  leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J. Biol. Chem.* **277**, 26479-26485

8. 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
9. Putney, J. W., Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1–12
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 Ca<sup>2+</sup> channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 30326–30337
11. 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
12. Randriamampita, C., and Tsien, R. Y. (1993) Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* **364**, 809–814
13. Bolotina, V. M. (2004) Store-operated channels: diversity and activation mechanisms. *Sci STKE* 2004, pe34
14. Huang, Y., and Putney, J. W., Jr. (1998) Relationship between intracellular calcium store depletion and calcium release-activated calcium current in a mast cell line (RBL-1). *J. Biol. Chem.* **273**, 19554–19559
15. Gregory, R. B., Wilcox, R. A., Berven, L. A., van Straten, N. C., van der Marel, C. A., van Boom, J. H., and Barritt, G. J. (1999) Evidence for the involvement of a small subregion of the endoplasmic reticulum in the inositol trisphosphate receptor-induced activation of Ca<sup>2+</sup> inflow in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **341** (Pt 2), 401–408
16. Ioannou, M., Coutsogeorgopoulos, C., and Synetos, D. (1998) Kinetics of inhibition of rabbit reticulocyte peptidyltransferase by anisomycin and sparsomycin. *Mol. Pharmacol.* **53**, 1089–1096
17. Johnson, A. E., and van Waas, M. A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 799–842
18. Schnell, D. J., and Hebert, D. N. (2003) Protein translocons. Multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* **112**, 491–505
19. Hamman, B. D., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**, 747–758
20. Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E., and Johnson, A. E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**, 535–544
21. Simon, S. M., Blobel, G., and Zimmerberg, J. (1989) Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6176–6180
22. Hofer, A. M., Curci, S., Machen, T. E., and Schulz, I. (1996) ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores. *FASEB J.* **10**, 302–308
23. Potter, M. D., and Nicchitta, C. V. (2002) Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 23314–23320
24. Kaneko, M., and Nomura, Y. (2003) ER signaling in unfolded protein response. *Life Sci.* **74**, 199–205
25. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450

Received for publication October 18, 2005.  
Accepted for publication January 17, 2006.



## I.B) Conclusion

Notre travail nous a donc permis de mettre en évidence, et ce, pour la première fois, que le translocon est un canal de fuite majoritaire des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Celui-ci serait donc impliqué de façon physiologique dans la vidange passive du réticulum endoplasmique et consécutivement dans l'activation des canaux calciques de type SOC par l'activation de la phospholipase A2. Le translocon serait donc un élément majeur de la signalisation calcique en régulant la concentration de calcium dans le RE.

Grâce à ce travail, nous avons également mis en évidence l'un des mécanismes d'action de la thapsigargine, molécule couramment utilisée en recherche sur la signalisation calcique et actuellement en essai clinique dans le cadre de traitements du cancer de la prostate.

## **II) Etude du rôle de TRPM8 dans la vidange calcique réticulaire.**

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

Le travail de ce chapitre a donc pour objectif de caractériser l'expression, la fonctionnalité et le rôle du canal TRPM8 dans les cellules de la prostate humaine (épithéliales et musculaires lisses).

## II.A) Article 2 :

**“Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function”.**

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

J Clin Invest. 2007 Jun; 117 (6):1647-57(inserm-00137718).

Dans une étude précédente du laboratoire, nous avons caractérisé la fonctionnalité du canal TRPM8 dans la lignée androgéno-dépendante de cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP (Thebault *et al.* 2005).

Cette étude a soulevé la question des mécanismes de régulation de la localisation sub-cellulaire de TRPM8.



# Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function

Gabriel Bidaux,<sup>1,2</sup> Matthieu Flourakis,<sup>1,2</sup> Stéphanie Thebault,<sup>1,2</sup> Alexander Zholos,<sup>3</sup> Benjamin Beck,<sup>1,2</sup> Dimitra Gkika,<sup>1,2</sup> Morad Roudbaraki,<sup>1,2</sup> Jean-Louis Bonnal,<sup>1,2</sup> Brigitte Mauroy,<sup>1,2</sup> Yaroslav Shuba,<sup>4</sup> Roman Skryma,<sup>4</sup> and Natalia Prevarskaia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM U800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>2</sup>Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France. <sup>3</sup>Department of Physiology, Medical Biology Center, Queen's University of Belfast, Belfast, United Kingdom. <sup>4</sup>Bogomoloz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine.

In recent years, the transient receptor potential melastatin member 8 (TRPM8) channel has emerged as a promising prognostic marker and putative therapeutic target in prostate cancer (PCa). However, the mechanisms of prostate-specific regulation and functional evolution of TRPM8 during PCa progression remain unclear. Here we show, for the first time to our knowledge, that only secretory mature differentiated human prostate primary epithelial (PrPE) luminal cells expressed functional plasma membrane TRPM8 (PM TRPM8) channels. Moreover, PCa epithelial cells obtained from in situ PCa were characterized by a significantly stronger PM TRPM8-mediated current than that in normal cells. This PM TRPM8 activity was abolished in dedifferentiated PrPE cells that had lost their luminal secretory phenotype. However, we found that in contrast to PM TRPM8, endoplasmic reticulum TRPM8 (ER TRPM8) retained its function as an ER Ca<sup>2+</sup> release channel, independent of cell differentiation. We hypothesize that the constitutive activity of ER TRPM8 may result from the expression of a truncated TRPM8 splice variant. Our study provides insight into the role of TRPM8 in PCa progression and suggests that TRPM8 is a potentially attractive target for therapeutic intervention: specific inhibition of either ER TRPM8 or PM TRPM8 may be useful, depending on the stage and androgen sensitivity of the targeted PCa.

## Introduction

Aberrant cell differentiation is considered to be a key mechanism in the onset of prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) (1). In normal prostatic epithelium, cells coexist in many stages in a continuum of differentiated phenotypes, progressing from stem cells to secretory mature luminal cells via a transient amplifying population (2). Deregulated differentiation and proliferation modify prostate epithelial homeostasis and are thus major causes of tumorigenesis (1, 3). One standard therapy for PCa is androgen ablation, which causes tumor regression by inhibiting both proliferation and apical differentiation. However, under anti-androgen therapy, PCa and metastases progress into an androgen-independent stage, causing cancer relapse with a more aggressive phenotype. Therefore, it is critical to understand the mechanisms involved in PCa progression in order to develop reliable prognostic markers and define new therapeutic treatment strategies.

The role of Ca<sup>2+</sup> in global cancer-related cell signaling pathways is uncontested. Alterations in Ca<sup>2+</sup> homeostasis increase proliferation

(4, 5) and induce differentiation (6) and apoptosis (7–9). According to a growing number of studies, cationic channels of the transient receptor potential (TRP) family represent key players in calcium homeostasis and cell physiopathology (10). In recent years, the TRP melastatin member 8 (TRPM8) channel has emerged as a promising prognosis marker and putative therapeutic target in PCa (11). Indeed, (a) high levels of TRPM8 mRNA have been found in both BPH and PCa compared with normal prostate (NP) epithelial cells (12, 13); (b) significant differences in expression were found for TRPM8, but not for PCa markers prostate-specific antigen (PSA), hK2, and PSCA, between malignant and nonmalignant tissue samples in identified groups of low- and high-grade PCa, suggesting that TRPM8 is a more specific indicator of PCa (14); (c) TRPM8 loss was observed in prostate tissues from patients treated preoperatively with antiandrogen therapy (15); and (d) TRPM8 expression requires functional androgen receptors (ARs) (16). However, despite all the existing evidence on TRPM8 involvement in PCa, the mechanisms of prostate-specific regulation and functional evolution of TRPM8 during PCa progression remain unclear.

Interestingly, although TRPM8 was originally cloned from the prostate (13), recent studies have firmly established its function as a cold receptor in sensory neurons (17), where it has been functionally characterized as a plasma membrane (PM) cationic channel involved in cold-evoked excitation. However, the features of classical plasma membrane TRPM8 (PM TRPM8) have not yet been firmly established in prostate cells. While many hypotheses have been put forward, the prostate-specific function of TRPM8 and the role of Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> inflow that it carries in prostate physiology and carcinogenesis remain unknown. Indeed, 2 recent studies (18, 19) functionally characterized

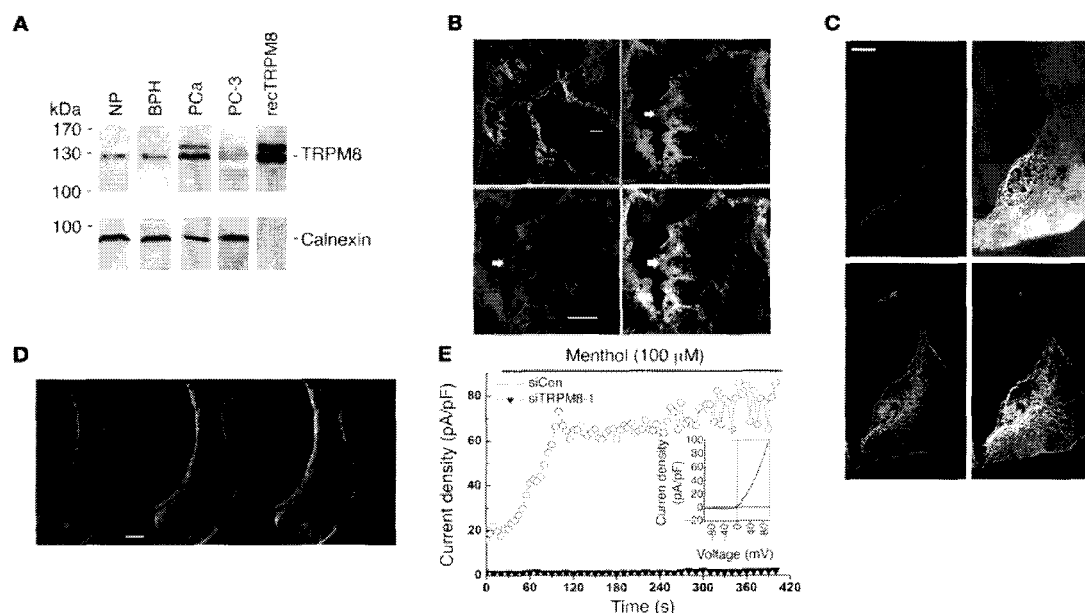
**Nonstandard abbreviations used:** 6d, 6 days in culture; AR, androgen receptor; BPH, benign prostatic hyperplasia; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>er</sub>, ER Ca<sup>2+</sup> content; CK, cytokeratin; epTRPM8, endoplasmic reticulum TRPM8; HEK-TRPM8 cell, HEK293 cell with inducible TRPM8 expression; LNCaP, lymph node carcinoma of the prostate; NP, normal prostate; PCa, prostate cancer; PM, plasma membrane; pmTRPM8, plasma membrane TRPM8; PrPCa, prostate primary cancer (cell); PrPE, prostate primary epithelial (cell); PSA, prostate-specific antigen; siTRPM8, siRNA against TRPM8; SOC, store-operated channel; SOCE, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry; TA/I, transit amplifying/intermediate (apical epithelial cells); TRP, transient receptor potential; TRPM8, TRP melastatin member 8.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Citation for this article:** *J. Clin. Invest.* 117:1647–1657 (2007). doi:10.1172/JCI30168.



research article



**Figure 1**

TRPM8 channel expression and activity in human prostate cells. **(A)** Immunoblot showing detection of 128-kDa protein in representative human NP, BPH, and PCa samples. PC-3 cells were used for negative control; detection of recombinant (rec) TRPM8-His fusion protein was used for positive control. Calnexin was used to control the amount of proteins. **(B)** Confocal examination of immunohistochemical sections reporting specific expression of the TRPM8 protein (green) in CK18-positive (red) cells in PCa. Arrows denote TRPM8 expression on the luminal side membrane of apical epithelial cells. Boxed area in top left panel is shown at a higher magnification in the other panels. **(C)** Representative confocal image of a PrPE cell from human BPH showing colocalization of TRPM8 (green) with CK18 (red) 6 days after tissue dissociation. Note that a thin green signal was localized on PM. Top right panel shows the cell viewed with transmitted light. **(D)** PM localization of TRPM8 (green) in PrPE cells was confirmed by its colocalization with membrane marker CD10 (red). **(E)** Representative time courses of menthol-activated TRPM8 in PrPE cells transfected with 50 nM of either siTRPM8 or scramble siRNA (siCon). Inset shows the representative current/voltage relationships of the menthol-activated membrane currents. Scale bars: 10  $\mu$ m.

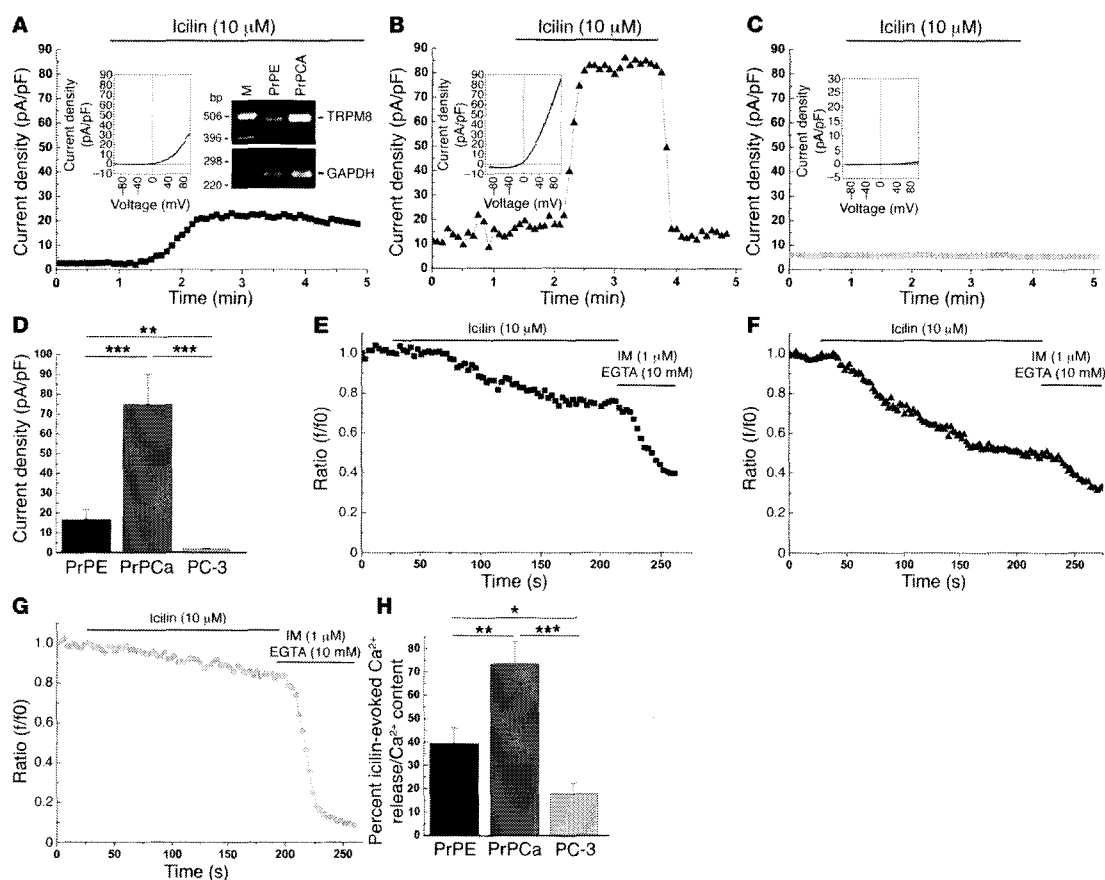
the TRPM8 channel in the human PCa lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cell line. In these cells TRPM8 is highly expressed, but is most exclusively localized in the ER membrane, where it acts as an ER  $Ca^{2+}$  release channel that supports the androgen-dependent component of store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE). However,  $PM$ TRPM8 is not functional in LNCaP cells. These findings raise a number of intriguing questions. Does prostatic TRPM8 act exclusively on the ER? What mechanisms determine PM versus ER localization? How is TRPM8 function regulated during prostate cell differentiation and carcinogenesis? In light of our previous findings concerning the differential involvement of ER  $Ca^{2+}$  release and PM  $Ca^{2+}$  entry in the proliferation and apoptosis of PCa cells (5), modifications in TRPM8 localization and activity during carcinogenesis could explain the aberrant cancer cell growth phenotype. Therefore, understanding TRPM8 function in PCa is crucial for making justified conclusions regarding use of this channel as a diagnostic and therapeutic target.

The present study was designed to investigate how TRPM8 localization and activity are regulated depending on the differentiation and oncogenic status of prostate primary epithelial (PrPE) cells. We applied a combination of electrophysiology,  $Ca^{2+}$  imaging, and molecular and cell biology approaches to primary cultures of human NP, BPH, and PCa epithelial cells. Our findings show,

for the first time to our knowledge, that only highly differentiated PrPB luminal cells expressed functional  $PM$ TRPM8 channels. Importantly, prostate primary cancer (PrPCa) cells obtained from in situ PCa biopsies were characterized by  $PM$ TRPM8-mediated current density that was significantly stronger than that of NP or BPH cells. This  $PM$ TRPM8 activity was abolished in dedifferentiated PrPE cells that had lost their luminal secretory phenotype. In contrast, endoplasmic reticulum TRPM8 ( $ER$ TRPM8) remained functional regardless of the differentiation status of prostate cells. This differential regulation of TRPM8 activity can be explained by the complex regulation of  $ER$ TRPM8 and  $PM$ TRPM8 isoforms by ARs. Considering that ER  $Ca^{2+}$  content ( $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) is known to regulate cancer cell growth, our finding that  $ER$ TRPM8 was functional in dedifferentiated PCa cells with downregulated AR provides insight into the role of this channel in PCa progression and may be important for developing therapeutic strategies for metastasized PCa. Finally, we propose a model for the differential regulation of  $PM$ TRPM8 and  $ER$ TRPM8 during PCa progression.

**Results**

*Expression of functional TRPM8 in human prostate apical epithelial cells.* We initially studied TRPM8 protein expression in several human



**Figure 2** TRPM8 is functional in PrPE cells and presents increased activity in PCa. (A–C) Representative time courses of icilin-activated  $i_{TRPM8}$  in PrPE (A), PrPCa (B), and PC-3 cells (C). Insets show the representative current/voltage relationships of the icilin-activated  $i_{TRPM8}$ . Inset in A shows an agarose gel indicating the enhancement of TRPM8 expression in PCa. M, protein ladder. (D) Cumulative data (mean  $\pm$  SEM) of maximum currents measured at 100 mV. (E–G) Typical traces of the estimated passive  $Ca^{2+}$  leak induced by 10  $\mu$ M icilin in digitonin-permeabilized PrPE (E), PrPCa (F), and PC-3 cells (G). IM, ionomycin. (H) Cumulative data (mean  $\pm$  SEM) of icilin-evoked ER  $Ca^{2+}$  release. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

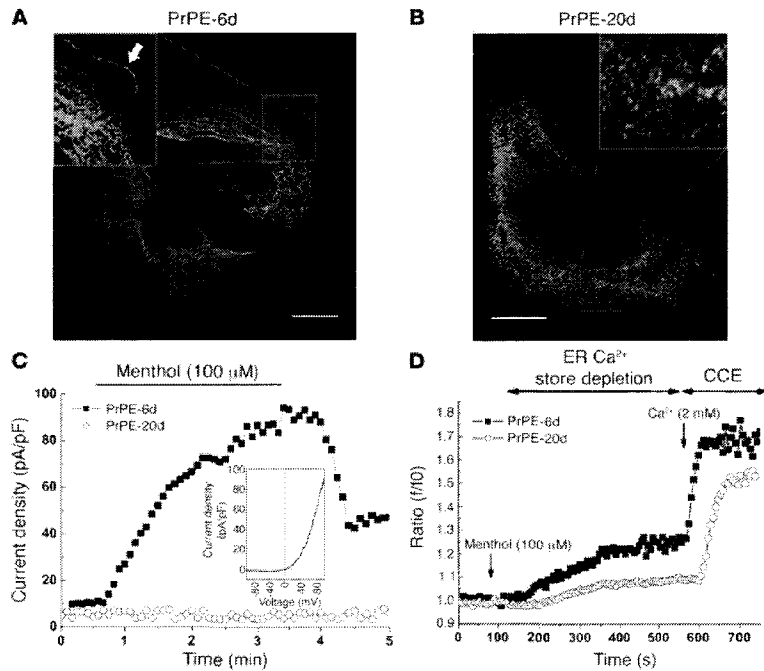
prostate resection samples by immunoblotting (Figure 1A). As expected, NP, BPH, and PCa extracts expressed 128-kDa TRPM8 protein and its associated glycosylated form (20). Positive control was performed using recombinant TRPM8 protein produced from HEK293 cells with inducible TRPM8 expression (HEK-TRPM8 cells). An androgen-insensitive PCa cell line, PC-3, was also assessed. Although it has previously been reported that TRPM8 is functional in PC-3 cells (19), we did not detect marked TRPM8 protein expression. Immunohistochemical analysis of several NP, BPH, and PCa samples confirmed that TRPM8 colocalized with the apical epithelial phenotype marker cytokeratin 18 (CK18) in acini luminal cells (Figure 1B). PrPE cell cultures were prepared from 3, 6, and 2 NP, BPH, and PCa samples, respectively. As no difference was noted in TRPM8 functional properties between cells from NP and BPH samples, the cells from these 2 sources were unified under the common designation of PrPE cells, while primary epithelial cells from PCa were defined as PrPCa.

TRPM8 protein was expressed in CK18-positive cells, with intense intracellular labeling largely coinciding with expression of this apical phenotype marker (Figure 1C). However, in contrast to our previous findings in LNCaP cells (18), TRPM8 labeling also provided a thin but intense signal on the cell's perimeter, which we attributed to its plasmalemmal localization in PrPE cells. This result was further confirmed by the colocalization of TRPM8 with the CD10 PM marker (Figure 1D).

In view of earlier findings on TRPM8 expression in prostate and prostate-derived epithelial cell lines (18), we investigated whether native prostate epithelial cells exhibit functional responses and analyzed their biophysical properties. Figure 1E shows that PrPE cells responded to the application of menthol (100  $\mu$ M) at physiological temperatures (36  $^{\circ}$ C) by developing a strong membrane menthol current ( $i_{menthol}$ ). Similar to the  $i_{TRPM8}$  in HEK-TRPM8 cells,  $i_{menthol}$  was characterized by a current/voltage relationship with sharp outward rectification, close to 0 mV reversal potential (Figure 1E, inset), which



research article



**Figure 3**

TRPM8 localization and activity in PrPE cells depends on the phenotype of the differentiated epithelial cells. (A and B) Confocal images showing immunolocalization of TRPM8 in either PrPE-6d (A) or PrPE-20d cells (B). Higher magnifications of boxed areas are presented in the insets (original magnification,  $\times 600$ ). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . (C) Representative time courses of menthol-activated (100  $\mu\text{M}$ )  $i_{\text{TRPM8}}$  in PrPE-6d and PrPE-20d cells at 36°C. Currents were recorded from voltage ramps at 100 mV. Inset shows the representative current/voltage relationships of  $i_{\text{TRPM8}}$ . (D) Typical  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  in response to menthol (100  $\mu\text{M}$ ) in PrPE-6d and PrPE-20d cells. CCE, capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry.

suggests that it was carried through the endogenous  $\text{PM-TRPM8}$  in PrPE cells. In order to demonstrate the association of  $i_{\text{menthol}}$  with the endogenous TRPM8 in PrPE cells, we used siRNA against TRPM8 (siTRPM8) to selectively knock down TRPM8 mRNA, as was reported in our previous work (18). Figure 1E shows that 48 hours after transfection of PrPE cells with 50 nM siTRPM8-1,  $i_{\text{menthol}}$  density was almost completely suppressed (siTRPM8-1,  $1.83 \pm 0.54$  pA/pF,  $n = 11$ ; control,  $79.1 \pm 5.64$  pA/pF,  $n = 12$ ), indicating a causal link between TRPM8 levels and current magnitude. The siTRPM8 efficiency in TRPM8 knockdown was confirmed by real-time PCR, Western blot, and electrophysiological analysis performed on HEK-TRPM8 cells (Supplemental Figure 2; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI30168DS1). Collectively, these data demonstrate that  $\text{PM-TRPM8}$  is functional in PrPE cells and that  $i_{\text{menthol}}$  can be attributed to TRPM8 activity and thus be defined as  $i_{\text{TRPM8}}$ .

**Transition to PCa increases both ER-TRPM8 and PM-TRPM8 activity.** Because TRPM8 expression is enhanced in PCa (13–15), but TRPM8 activity in LNCaP cells (derived from metastatic human prostate adenocarcinoma) is found only in the ER membrane (18, 19), we investigated whether PCa development was associated with the shift in TRPM8 localization and function from the PM to the ER by comparing  $i_{\text{TRPM8}}$  in PrPE and PrPCa cells. Figure 2, A and B, shows membrane currents in representative PrPE and PrPCa cells (the latter derived from a nonmeta-

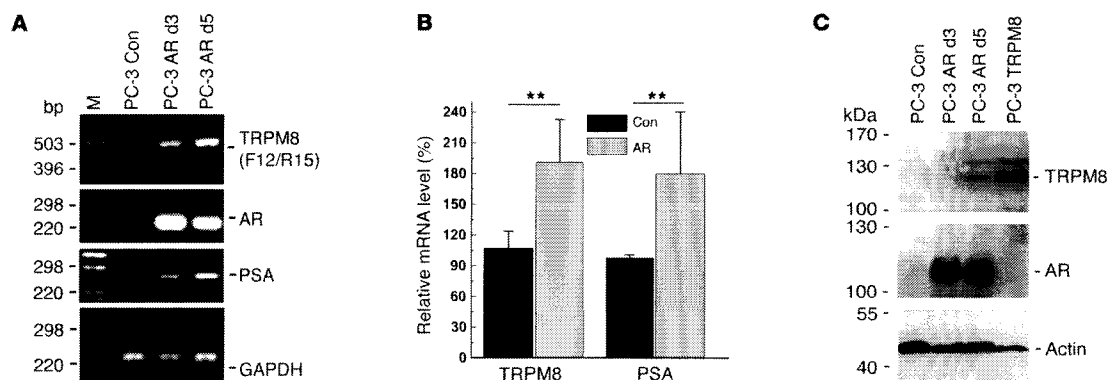
static high-grade PCa, Gleason score 7) before and after exposure to icilin (10  $\mu\text{M}$ ) at 36°C. As quantified in Figure 2D, exposure to icilin evoked a 4-fold higher current density in PrPCa cells than in PrPE cells at 100 mV (PrPCa,  $74.81 \pm 15.31$  pA/pF,  $n = 8$ ; PrPE,  $16.62 \pm 5.11$  pA/pF,  $n = 6$ ). Enhanced  $i_{\text{TRPM8}}$  density correlated with higher TRPM8 mRNA levels in PrPCa cells compared with PrPE cells (Figure 2A, inset). We found no current development in response to icilin in the androgen-insensitive PC-3 cell line (Figure 2, C and D).

Next, we sought to determine whether these cell types also reveal TRPM8 activity characteristic of its ER membrane localization. We used compartmentalized fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  Mag-Fluo-4 dye on permeabilized cells to monitor the effect of TRPM8 activation on  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ . In this series of experiments, we used icilin to activate TRPM8, whereas ionomycin and EGTA were used to induce full ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion. As shown in Figure 2, E, F, and H, exposure to icilin evoked ER  $\text{Ca}^{2+}$  release in PrPCa that was 2-fold that of PrPE cells (PrPCa,  $73.5\% \pm 9.37\%$  of total  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ,  $n = 23$ ; PrPE,  $39.4\% \pm 6.68\%$  of total  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ,  $n = 62$ ). Interestingly, icilin in PC-3 cells also induced a measurable decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  ( $17.8\% \pm 4.66\%$  of total  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ,  $n = 29$ ; Figure 2, G and H), which suggests preferred TRPM8 expression and function on the ER membrane, as previously reported (19). These results demonstrated that transi-

tion to the PCa did not eliminate  $\text{PM-TRPM8}$  function, as we suggested in our previous report based on LNCaP cell line studies (18), but instead upregulated TRPM8 mRNA expression and enhanced TRPM8 activity in both PM and ER.

**TRPM8-mediated PM current disappears during dedifferentiation of prostate apical epithelial cells to the transit amplifying/intermediate phenotype.** Because PCa is composed of both transit amplifying/intermediate (TA/I) and apical mature epithelial cells (2, 21, 22), we have investigated TRPM8 regulation during the transition of human prostate epithelial cells from the apical to the intermediate phenotype.

Primary cultures of prostate cells are characterized by the gradual reversion of cell differentiation from the apical phenotype to the TA/I phenotype, which is accompanied by the loss of both AR expression and activity (22). We have previously shown that at least 80% of PrPE cells after 6 days in culture (PrPE-6d) express TRPM8 and apical phenotype markers CK8 and CK18 (16). After 20 days in culture (PrPE-20d), a marked increase in the expression of basal phenotype markers CK5 and CK14 is usually observed, suggesting a reversion of the apical terminally differentiated phenotype to the TA/I phenotype (23, 24). High-magnification confocal images clearly showed the loss of  $\text{PM-TRPM8}$  expression in PrPE-20d cells, as well as deep modifications of intracellular TRPM8 distribution — from a fibrillary pattern to a dotted one — compared with PrPE-6d cells (Figure 3, A and B).



**Figure 4** TRPM8 expression is stimulated by AR in PCa cells. (A) Agarose gel showing amplification of the 2 TRPM8 amplicons (TRPM8F12/R15), AR and PSA in PC-3 transfected with either empty vector (Con) or AR for 3 or 5 days (d3 and d5, respectively). GAPDH was used as an internal reporter. (B) Quantification of PCR experiment in A. (C) Immunoblotting showing detection of TRPM8 proteins and AR in PC-3 cells transfected with empty vector, with AR for 3 or 5 days, or with TRPM8 encoding vector. Actin was used to control protein loading. \*\**P* < 0.01.

Thus, reversion of the differentiation characteristic of PrPE-20d cells correlated with the loss of *pm*TRPM8 expression.

Given the change in preferred TRPM8 localization depending on the differentiation status of human prostate cells, we next examined possible differences in the biophysical properties of PrPE-6d and PrPE-20d cell responses to menthol. Figure 3C shows that exposure to 100 μM menthol elicited the development of a strong outward *i*<sub>TRPM8</sub> (91.09 ± 9.72 pA/pF at 100 mV, *n* = 14) only in PrPE-6d cells. Similar results were obtained with icilin (Supplemental Figure 1A), suggesting that *pm*TRPM8 is functional only in mature, fully differentiated human prostate apical epithelial cells.

Imaging experiments on Fluo-2AM-loaded cells aimed at testing for ER membrane TRPM8 activity showed that in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, exposure of both PrPE-6d and PrPE-20d cells to menthol caused a transient increase in the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), obviously the result of ER Ca<sup>2+</sup> store depletion (Figure 3D). However, the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase appeared much more pronounced in PrPE-6d than in PrPE-20d cells (PrPE-6d, 22.3% ± 5.36%, *n* = 28; PrPE-20d, 10.4% ± 3.72%, *n* = 32). This transient [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase was followed by sustained [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation upon reintroduction of extracellular Ca<sup>2+</sup>, a result of store-operated channel (SOC) activity and associated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry, which was also higher in PrPE-6d cells (Figure 3D and Supplemental Figure 1B). These results indicate that TRPM8 is also present in the ER membrane of PrPE cells, where it functions as a Ca<sup>2+</sup> release channel involved in SOC activation. However, the fact that *er*TRPM8, unlike *pm*TRPM8, remained functional in cells that lost their apical phenotype suggests that these represent different forms of TRPM8: *pm*TRPM8 is specific to the fully differentiated, apical epithelial cell phenotype, and *er*TRPM8 does not show preferred expression depending on the differentiation status of prostate epithelial cells. To verify this hypothesis, we used a well-characterized model of apical epithelial cell differentiation consisting of artificial overexpression of AR in the inherently androgen-independent PC-3 PCa cell line.

*ARs differentially regulate erTRPM8 and pmTRPM8 activities.* Given that (a) *er*TRPM8 activity may take 2 forms depending on AR activity of epithelial prostate cells, (b) classic TRPM8 expression is dependent on the AR (15, 16, 19), and (c) AR controls both the dif-

ferentiation and proliferation of prostate epithelial cells (25, 26), we next sought to determine the relationship among AR activity, *pm*TRPM8 activity, and *er*TRPM8 activity.

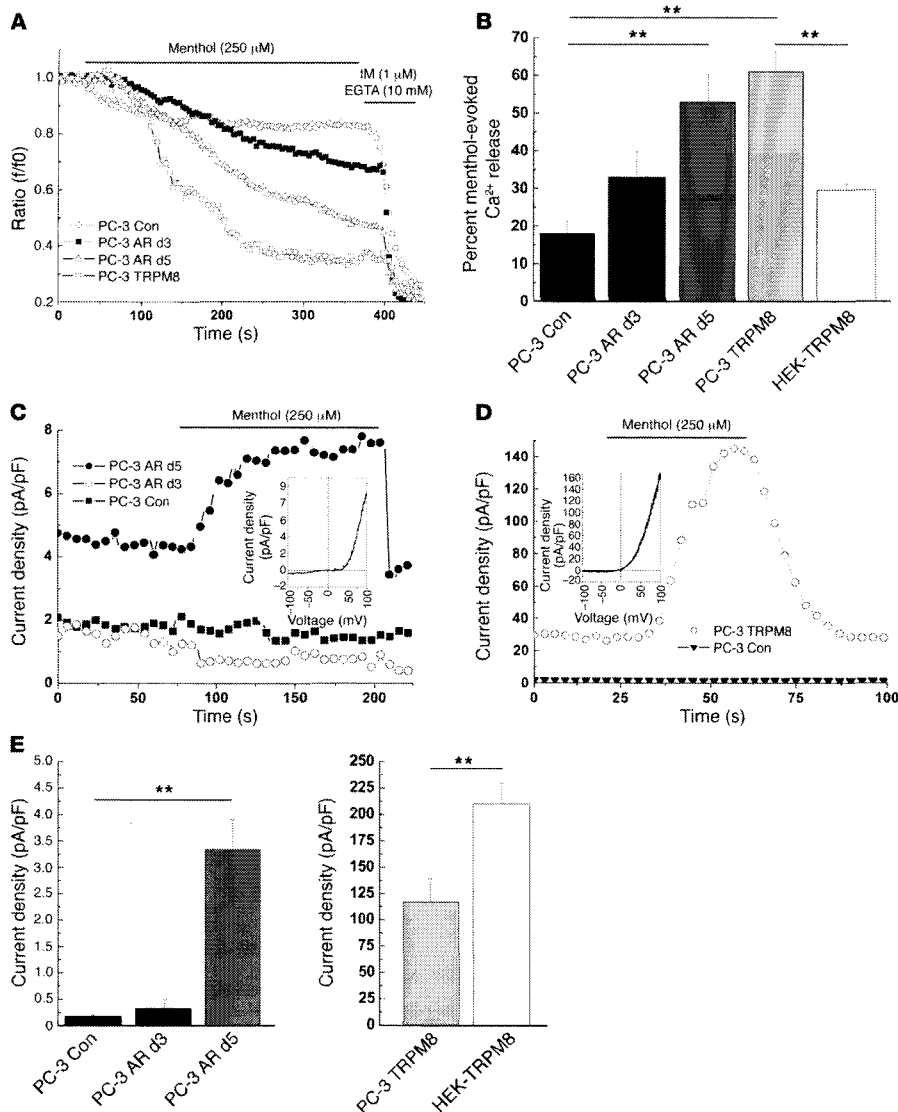
We investigated whether heterologous AR overexpression in PC-3 cells affects TRPM8 expression and function. First, we compared TRPM8 and AR mRNA expression in wild-type control and AR-transfected PC-3 cells by PCR (Figure 4A). The expression of AR-dependent PSA mRNA served as a control for AR activity. As shown in Figure 4, A and B, control PC-3 cells were found to express very low levels of AR and TRPM8 mRNAs. However, 5 days after AR transfection, quantification of PCR products revealed strong upregulation of TRPM8 (from 107% ± 17% to 191% ± 42%) as well as PSA (from 98% ± 3% to 180% ± 61%) mRNAs (Figure 4B). Western blot experiments showed no specific AR protein expression in the control PC-3 cells and its strong elevation in AR-transfected PC-3 cells (Figure 4C). Classic 128-kDa TRPM8 protein and its posttranslationally modified (glycosylated) 145-kDa form became clearly detectable on the fifth day after AR transfection (Figure 4C). Detection of TRPM8 proteins by Western blot was confirmed on PC-3 cells directly transfected with recombinant human TRPM8 (Figure 4C).

Ca<sup>2+</sup> imaging and electrophysiological experiments showed that enhancement of endogenous TRPM8 expression in PC-3 cells following AR transfection was paralleled by increased functional responses. Menthol induced a modest decrease in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> 3 days after AR transfection (18% ± 7.2%, *n* = 31), which suggests the presence of very low basal TRPM8 activity in the ER membrane in control PC-3 cells, whereas ER Ca<sup>2+</sup> store depletion by menthol was approximately 1.5-fold that of control 3 days after transfection (i.e., 33% ± 6.77% increase, *n* = 33), and approximately 3-fold that of control 5 days after transfection (i.e., 53% ± 6.2% increase, *n* = 28) (Figure 5, A and B). Interestingly, in TRPM8-overexpressing PC-3 cells, menthol induced almost the same ER Ca<sup>2+</sup> store depletion (61% ± 5.2%, *n* = 45) as in the PC-3 cells 5 days after AR transfection (Figure 5, A and B).

Figure 5, C-E, demonstrates that PC-3 cells 5 days after AR transfection also acquired the ability to generate classic outwardly rectifying menthol-activated *i*<sub>TRPM8</sub> (3.34 ± 0.55 pA/pF, *n* = 12), which suggests that *pm*TRPM8 expression and function is strictly regulated by the AR. In comparison, the response to menthol in TRPM8-



research article



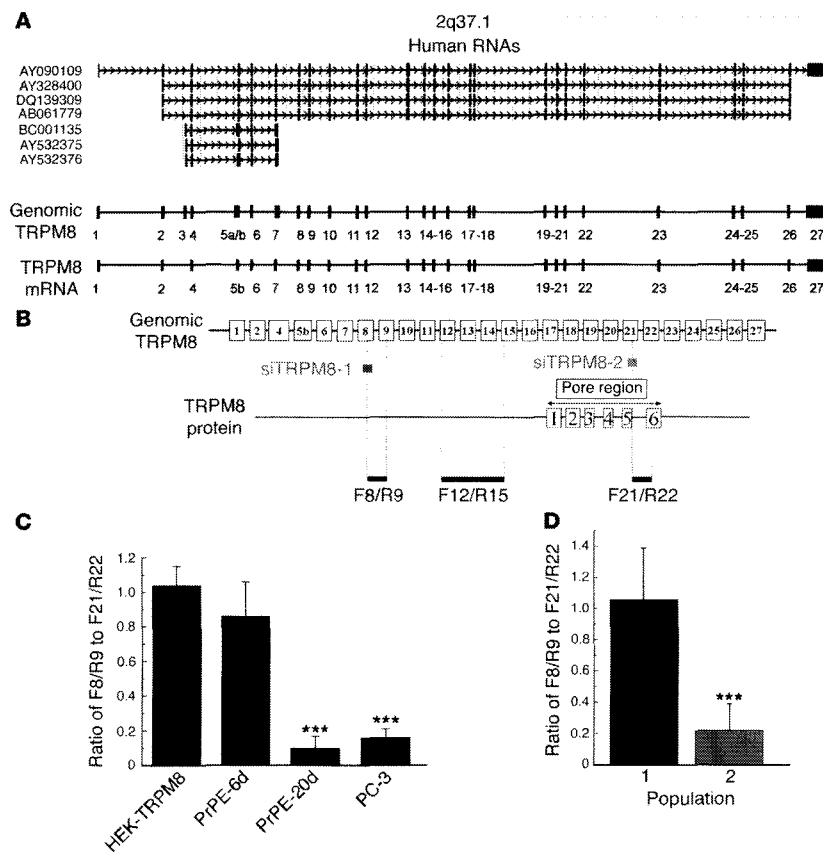
**Figure 5** TRPM8 activity correlated with AR expression levels in PC3 cells. (A) Typical traces of the estimated ER Ca<sup>2+</sup> release induced by 250 μM menthol in digitonin-permeabilized control PC-3 cells, PC3 cells transfected with AR for 3 or 5 days, and TRPM8-transfected PC3 cells. (B) Cumulative data (mean ± SEM) for percent release from internal Ca<sup>2+</sup> stores measured at 375 s. (C and D) Representative time courses of menthol-activated (250 μM) *i*<sub>TRPM8</sub> in control PC3 cells and in PC3 cells transfected with AR for 3 or 5 days (C) as well as in TRPM8-transfected PC3 cells (D). Insets show the representative current/voltage relationships of the baseline and menthol-activated membrane currents. (E) Cumulative data (mean ± SEM) of maximum currents measured at 100 mV. \*\**P* < 0.01.

overexpressing PC-3 cells' outwardly rectifying *i*<sub>TRPM8</sub> reached a density as high as 117 ± 22 pA/pF (*n* = 14; Figure 5, D and E). These data suggest that TRPM8 in PC-3 cells is expressed at some low, baseline level in an AR-independent manner and is exclusively functional in the ER membrane. Furthermore, upon reaching full functionality, the AR promotes the expression of classic AR-dependent TRPM8, which targets both PM and ER membranes. Thus, functional AR seems to be imperative for *i*<sub>PM</sub>TRPM8 activity, while the activity of *i*<sub>ER</sub>TRPM8 may take place even in AR-deficient cells.

To resolve the specific AR dependence of the *i*<sub>ER</sub>TRPM8 and *i*<sub>PM</sub>TRPM8 we observed that (a) although classic TRPM8 mRNA was undetectable in wild-type PC-3 and PrPE-20d cells, menthol and icilin evoked Ca<sup>2+</sup> release in those cells, (b) TRPM8-overexpressing PC-3 cells presented significantly higher menthol- and

icilin-evoked Ca<sup>2+</sup> release than did HEK-TRPM8 cells (Figure 5, B and E), and (c) TRPM8-overexpressing LNCaP cells did not develop *i*<sub>TRPM8</sub> because of ER retention of TRPM8 (18), we hypothesized the existence of 2 TRPM8 isoforms whose function and sub-cellular targeting are differentially regulated by the AR.

*A new TRPM8 isoform may be partially responsible for *i*<sub>ER</sub>TRPM8 activity.* It is important to note that in the pioneering paper by Tsavaler et al. (13), the expression of 2 different transcripts (6.2 kb and 5.2 kb) of TRPM8 was demonstrated in the prostate, although only the longer one has been cloned to date. Thus, we hypothesized that the expression of a truncated TRPM8 splice variant could be responsible for basal, AR-independent *i*<sub>ER</sub>TRPM8 activity. Figure 6A shows the alignment of known TRPM8 mRNAs and the putative genomic structure of the *trpm8* gene. Although *trpm8* is composed of 27 exons, only 24



**Figure 6**  
The *trpm8* gene encodes for classical TRPM8 channel and a putative truncated TRPM8 splice variant. (A) The *trpm8* gene localized on chromosome 2 in position 37.1. Alignments of several TRPM8 mRNAs and proposed structures of TRPM8 genomic DNA and mRNA to scale. (B) Genomic map of TRPM8 (not to scale; numbered boxes denote exons) with its associated protein structure (boxes 1–6 represent putative transmembrane domains). The 3 pairs of PCR primers and siTRPM8-1 and -2 are aligned with their matching exons. (C) Real-time analysis of exons 8 to 9 amplicon (F8/R9) and exons 21 to 22 amplicon (F21/R22). Data are presented as a ratio of F8/R9 to F21/R22. HEK-TRPM8 cells represent the control condition with only 1 TRPM8 mRNA variant. (D) Ratio of TRPM8 F8/R9 to F21/R22 expression normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) expression after quantification of PCR products obtained from single cells. Each population is represented by 10 prostate apical epithelial cells. \*\*\**P* < 0.001.

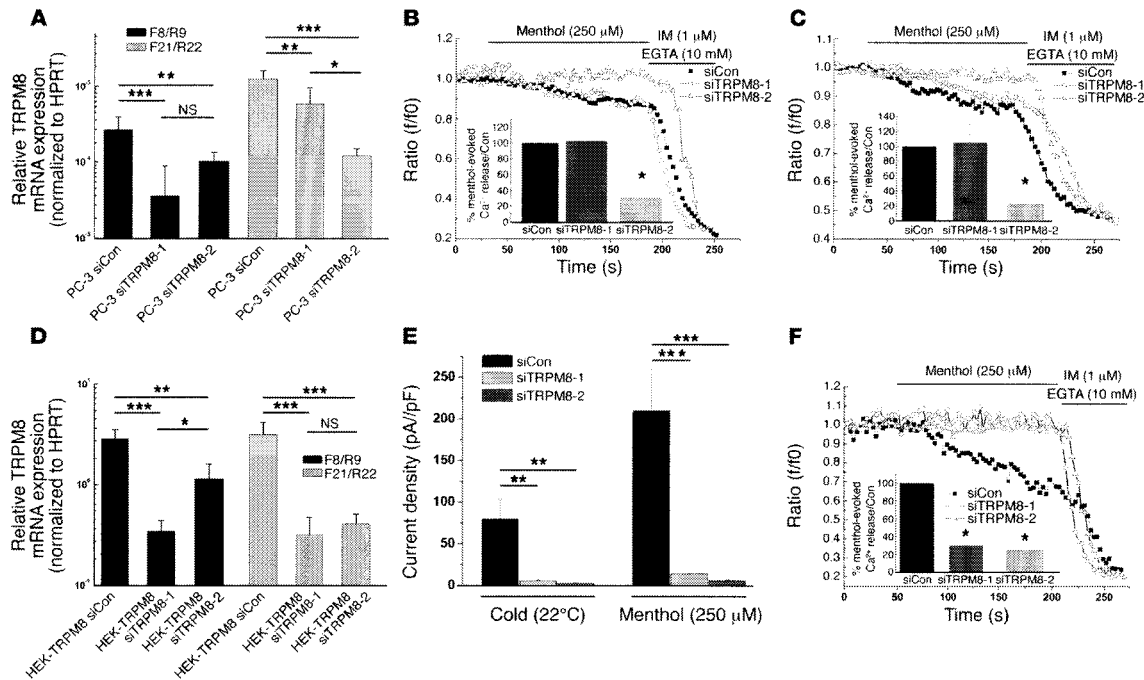
of them are involved in the formation of cold/menthol receptor (13). Using differential real-time PCR, we measured the expression intensity of the amplification products using the primer pairs F8/R9 (flanking the region between exons 8 and 9) and F21/R22 (flanking exons 21 and 22) in PrPE-6d and PrPE-20d cells (Figure 6B). Standardization of amplifications had previously been validated on TRPM8 DNA and cDNA from HEK-TRPM8 cells (18). The proportion of each amplicon was used to determine the ratio of F8/R9 (representing the classical TRPM8) to F21/R22 (representing the classical TRPM8 and TRPM8 isoform) (Figure 6C). We found that differentiated PrPE-6d cells were characterized by a F8/R9-to-F21/R22 ratio close to 1 (i.e.,  $0.86 \pm 0.2$ ), which was comparable to that of HEK-TRPM8 cells ( $1.04 \pm 0.11$ ), while dedifferentiated PrPE-20d cells and PC-3 cells showed ratios of  $0.10 \pm 0.07$  and  $0.16 \pm 0.05$ , respectively (Figure 6C). These results indicated that the level of classic TRPM8 mRNA in PC-3 and PrPE cells constitutes no more than 16% of the total TRPM8 mRNA. Thus, we hypothesized that the expression of the truncated splice variant may explain our functional result.

In order to determine to what degree these 2 mRNAs were present in individual cells, we performed single-cell real-time PCR on apical prostate epithelial cells. These experiments enabled us to identify 2 populations of cells, for which the calculated ratios of F8/R9 to F21/R22 were  $1.06 \pm 0.33$  and  $0.22 \pm 0.17$  (Figure 6D). In the framework of our hypothesis, we posited that the former

population was likely to express predominately the classic TRPM8, while the latter would probably express both classic TRPM8 and truncated TRPM8 mRNAs (Figure 6D).

We also developed specific siRNA directed against exon 8 (i.e., siTRPM8-1) or exon 21 (i.e., siTRPM8-2) in order to selectively ablate either the classic TRPM8 mRNA or both the classic and the truncated TRPM8 mRNAs. We performed experiments on PC-3 cells and quantified TRPM8 mRNA levels by real-time PCR. Both siTRPM8-1 and siTRPM8-2 specifically suppressed the classic TRPM8 mRNA (7-fold and 3-fold decrease, respectively), as assayed by RT-PCR with the F8/R9 pair of primers (Figure 7A). We performed  $[Ca^{2+}]_{ER}$  measurements to study the effect of siRNAs on  $ER$ TRPM8 activity. Figure 7B shows that only PC-3 cells transfected with siTRPM8-2 were characterized by decreased menthol-evoked  $Ca^{2+}$  release, which constituted  $30.19\% \pm 16.42\%$  that of control cells. The same experiments conducted on PrPE-20d cells transfected with siTRPM8-2 provided a similar reduction ( $22.58\% \pm 21.48\%$  of control; Figure 7C). Control experiments conducted in HEK-TRPM8 cells under the same conditions revealed similar potency in the 2 siRNAs. However, siTRPM8-1 induced weak silencing (2-fold decrease) compared with the strong (10-fold) siTRPM8-2-mediated decrease of TRPM8 mRNA detected with the F21/R22 primer pair, although both of them had the same efficiency (10-fold decrease) in HEK-TRPM8 cells (Figure 7D and Supplemental Figure 2A). Control experiments on

research article



**Figure 7** Specific siRNA-mediated ablation of either classical TRPM8 or total TRPM8 mRNAs has different effects on menthol-evoked Ca<sup>2+</sup> release. (A and D) Real-time quantification of TRPM8 F8/R9 and F21/R22 amplicon normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase expression in PC-3 cells (A) or HEK-TRPM8 cells (D) transfected with 100 nM of control siRNA, siTRPM8-1, or siTRPM8-2. Each experiment was performed 6 times. (B, C, and F) Typical traces of the estimated ER Ca<sup>2+</sup> release induced by 250 μM menthol in digitonin-permeabilized PC-3 (B), PrPE-20d (C), and HEK-TRPM8 cells (F). Insets show cumulative data (mean ± SEM) for percentage of menthol-evoked Ca<sup>2+</sup> release from internal Ca<sup>2+</sup> stores. Each condition included at least 40 cells from 3 independent experiments. (E) Cumulative data (mean ± SEM) of cold- and menthol-activated *i*<sub>TRPM8</sub> in HEK-TRPM8 cells with control siRNA, siTRPM8-1, or siTRPM8-2 (currents recorded from voltage ramps at 100 mV). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

HEK-TRPM8 cells showed that siTRPM8-1 and siTRPM8-2 inhibited both *P<sub>M</sub>*TRPM8 and *E<sub>R</sub>*TRPM8 activity with the same efficiency (Figure 7, E and F, and Supplemental Figure 2, B and C).

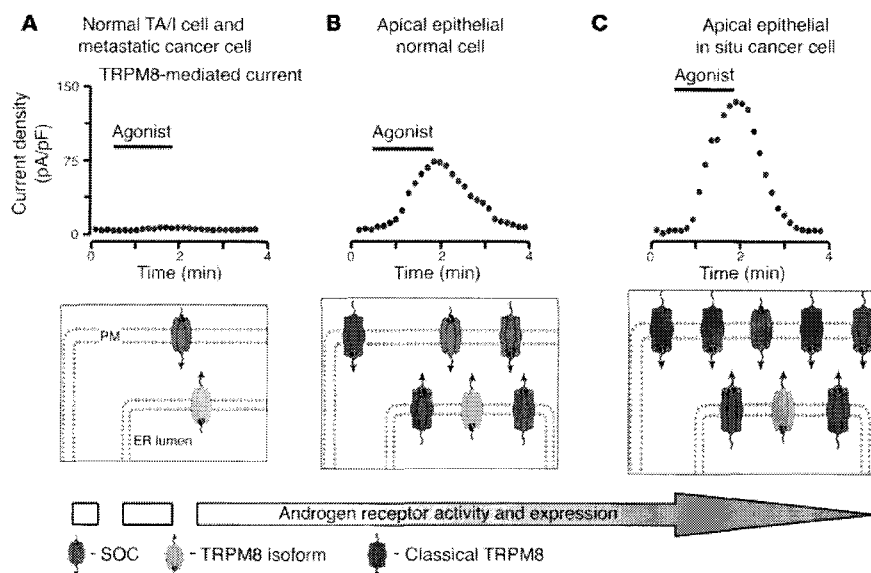
Taken together, these results suggest that the truncated splice variant coding for the shorter, but still functional, TRPM8 isoform is expressed in AR-independent prostate epithelial cells. This truncated TRPM8 isoform is likely to represent ER-localized protein, which, in addition to functioning as an ER release channel, may also be responsible for the retention of the classic TRPM8 form in the ER, as was proposed for LNCaP cells (18).

**Discussion**

In this study, we report 4 major findings. First, primary epithelial cells from human NP, BPH, and PCA specimens exhibited classical cold/menthol receptor-like responses (i.e., characteristic of neuronal TRPM8) that were mediated by endogenous *P<sub>M</sub>*TRPM8 activation. Second, the density of *P<sub>M</sub>*TRPM8 membrane current increased in PCA in situ. Third, TRPM8 in PrPE cells also functioned as a Ca<sup>2+</sup> release channel, *E<sub>R</sub>*TRPM8. Finally, expression and activity of *E<sub>R</sub>*TRPM8 and *P<sub>M</sub>*TRPM8 depend on the differentiation and oncogenic status of prostate epithelial cells and are likely mediated by 2 TRPM8 isoforms that are differentially regulated by androgens.

*Cold/menthol responsiveness of the human TRPM8 channel in prostate cells.* This study is the first demonstration to our knowledge of functional *P<sub>M</sub>*TRPM8 activity in human prostate cells. The biophysical properties of membrane current (strong outward rectification and close to 0 mV reversal potential) matched those of neuronal TRPM8 cold/menthol receptor-mediated current in PrPE and PrPCA cells (17, 27). Our siRNA-mediated TRPM8 knockout experiments proved the association of these responses with the expression of classical TRPM8 activity. In Ca<sup>2+</sup> imaging experiments, menthol and icilin also induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases in PrPE cells. As was previously reported for LNCaP cells (18, 19), it should be noted that the menthol-evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in PrPE cells may be indicative of Ca<sup>2+</sup> entry and SOCE via *P<sub>M</sub>*TRPM8 and *E<sub>R</sub>*TRPM8 activity, respectively. The distinct functions of *P<sub>M</sub>*TRPM8 and *E<sub>R</sub>*TRPM8 may be of great importance in understanding the physiology of prostate cells as well as other cells with dual TRPM8 localization.

*Differential expression of *P<sub>M</sub>*TRPM8 and *E<sub>R</sub>*TRPM8 based on epithelial cell differentiation status and possible physiological roles of TRPM8 in NP cells.* Prostate epithelium contains 3 types of epithelial cells: basal, TA/I, and apical/luminal (28, 29). The basal cells express CK14 and CK5 but not TRPM8 (16, 30); TA/I cells show a concomitant expression of basal marker CK5 and apical markers CK8/CK18 as well as low levels of AR and TRPM8 (16, 30). Apical cells (terminally differen-



**Figure 8**

Schematic diagram summarizing the principal findings of this study and showing a simplified representation of differential TRPM8 localization and function depending on the AR activity, differentiation, and oncogenic status of human prostate epithelial cells. **(A)** General pattern of nondifferentiated TA/I cells and dedifferentiated metastatic cells. In these cells AR level was low, and only the ER TRPM8 isoform was expressed in the ER membrane. ER TRPM8 functioned as a Ca<sup>2+</sup>-release ER channel, which, by depleting ER stores, activated SOC localized on the PM. Under these conditions, TRPM8 agonists did not induce classical PM TRPM8-mediated current. **(B)** Normal, fully differentiated prostate cell with an apical secretory phenotype. In these cells, with high AR levels, the AR-dependent classical TRPM8 channel was expressed on both ER and PM. Under these conditions, TRPM8 agonists may induce not only SOCE, but also substantial PM TRPM8-mediated current. **(C)** Differentiated apical secretory in situ cancer cells. In these cells, with enhanced AR activity, the AR-dependent classical TRPM8 channel was overexpressed and TRPM8 agonists induced high levels of PM TRPM8-mediated current. iTRPM8 traces are schematic.

tiated secretory mature cells) express CK8/CK18 and PSA as well as high levels of AR and TRPM8 (16, 30). Moreover, our results showed that TRPM8 colocalized with CK18 (Figure 1C). It has previously been shown in kidney cells that TRP family member TRPP1 interacted directly with intermediated filament proteins, including CK18, which suggests that TRPP1 helps to stabilize epithelial cell sheets mechanically (31). It is also plausible that TRPM8 functions as an "epithelial phenotype stabilizer" in prostate epithelium.

Our results showed that PrPE-6d cells, which express the apical epithelial phenotype markers (16), exhibited both PM TRPM8 and ER TRPM8 activity, while the dedifferentiated PrPE-20d cells, which are characterized by the TA/I phenotype (23, 24), only conserved ER TRPM8. Interestingly, only ER TRPM8 activity has been observed in PC-3 cells, previously described to have common features with early TA/I cells (absence of AR, CK5, and CK18 expression) (32). Forced AR expression in PC-3 cells induced PM TRPM8 function with the same kinetics as the expression of the PSA apical phenotype marker, suggesting that PM TRPM8 is tightly regulated by the AR and appears during apical epithelial differentiation. Therefore, the loss of PM TRPM8 function in TA/I cells was likely due to the loss of functional AR induced by dedifferentiation. AR regulation of ER TRPM8 seems more complex. In PC-3 cells 3 days after AR transfection, Ca<sup>2+</sup> release via ER TRPM8 was apparently greater than that in control PC-3 cells, although the classical TRPM8 isoform was virtually undetectable and PM TRPM8 was not functional. Furthermore, expression of

the ER TRPM8 isoform, mediating ER TRPM8 activity, was considerably less sensitive to AR than was classical TRPM8 (Figure 5A). It will be necessary to clone this ER-specific TRPM8 isoform to understand its preferential targeting of the ER membrane and regulation by AR. The subject of the mechanism underlying androgen regulation of TRPM8 in the prostate has previously been addressed (13, 15, 16, 19), and several putative androgen response elements have been detected. However, an alternative promoter of *trpm8* may make the ER TRPM8 isoform less sensitive to androgens than PM TRPM8.

The observation that the ER TRPM8 isoform is retained in the prostate cell ER membrane is also important for future research. Two scenarios have emerged on the basis of studies reporting ER retention of TRP channels: variations in TRP primary sequence (33) or partnership-evoked retention. For instance, subcellular localization and function of TRPP2, shown to act as a Ca<sup>2+</sup> release ER channel, are controlled by phosphofurin acidic cluster sorting protein-1 (PACS-1) and PACS-2 (34). A reciprocal regulation between ER TRPM8 and PM TRPM8 is relatively likely and could also explain the retention of classical TRPM8 on the ER in LNCaP cells (18).

The physiological role of TRPM8 in the NP remains unknown. TA/I cells have been reported to be the most proliferative phenotype in NP epithelium (22), whereas apical cells are basically involved in the secretory activity of prostate acini. ER TRPM8 activity may be involved in apical differentiation, while our data demonstrating specific PM TRPM8 activity in human apical prostate cells suggest that the clas-



## research article

sical TRPM8 channel plays a role in the secretory function of prostate cells and is thereby indirectly involved in sperm motility and fertilization. Moreover, a cold receptor function of TRPM8 in the prostate was suggested by Stein et al. (35). This last hypothesis remains to be demonstrated since prostate is not physiologically exposed to low temperature. Finally, the results of recent studies demonstrating that phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate tightly controls TRPM8 activity (36) emphasize the possibility that a membrane metabotropic receptor pathway may be involved in TRPM8 opening.

**TRPM8 involvement in PCa.** Early observations that TRPM8 upregulation correlated with the PCa stage led to the hypothesis that the *trpm8* gene was an oncogene (13–15), so TRPM8 was suggested as a putative target for anticancer therapies. Because AR has been reported to play an essential role in prostate carcinogenesis and TRPM8 is tightly regulated by AR, AR deregulation during PCa progression was expected to influence the physiological function of TRPM8. A convincing model of AR pathway evolution has recently been proposed (3), in which (a) AR regulates genes involved in the differentiation of secretory epithelial cells in normal prostate; (b) enhanced AR activity in the early stages of well-differentiated PCa activates growth-promoting genes and maintains apical epithelial phenotype; and (c) progression from high-grade PCa to metastasis is mediated by selective downregulation of the AR pathway genes. This downregulation results in a higher proliferation rate and enhances the potential to metastasize. Interestingly, in this study shows that the upregulation of the CK8 apical phenotype marker in PCa and its downregulation in metastasis coincide with our results on  $_{PM}$ TRPM8. Indeed, because intracapsular PCAs are mainly composed of secretory apical cells (2) and metastatic cells are known to be close to the TA/I phenotype, we suggest that ARs play a key role in the development of  $_{ER}$ TRPM8 and  $_{PM}$ TRPM8 expression and activity during carcinogenesis of prostate cells (Figure 8).

Our data suggest that  $_{PM}$ TRPM8 and  $_{ER}$ TRPM8 may determine specific, oncogenic status-dependent  $Ca^{2+}$  signatures required for the progression of  $Ca^{2+}$ -dependent processes that are critical for carcinogenesis, such as proliferation (5, 37) and apoptosis (6, 9). Proliferation mostly relies on cytosolic  $Ca^{2+}$  signaling involving short, repeated  $Ca^{2+}$  entry mechanisms (37, 38). We therefore hypothesize that  $_{PM}$ TRPM8 is important for the  $Ca^{2+}$  signaling involved in proliferation. Moreover, store depletion and SOCE were previously shown to be critical in promoting growth arrest and apoptosis of PCa epithelial cells (7, 39). Indeed, reduced basal filling of intracellular  $Ca^{2+}$  stores is also the hallmark of the apoptosis-resistant cell phenotypes characteristic of advanced PCa (6, 9, 39). Thus, as  $_{ER}$ TRPM8 is a molecular entity capable of influencing the filling of ER stores, its activity may be considered a substantial factor in controlling the growth of advanced PCa metastatic cells. In light of the recent demonstration of the role of TRPM8 in LNCaP cell survival (19), we speculate that any shift in the balance between classical TRPM8 and  $_{ER}$ TRPM8 isoform expression may modify the  $Ca^{2+}$  signature, thus increasing the potential for either proliferation or apoptosis. Thus, TRPM8 may be an attractive target for therapeutic interventions: specific inhibition of either  $_{ER}$ TRPM8 or  $_{PM}$ TRPM8 activity should be considered, depending on the stage and androgen sensitivity of the targeted PCa. We believe these results provide novel insight and expect them to influence future research into the selective targeting of TRPM8 during PCa progression.

## Methods

**Cell cultures.** HEK293 cells were cultured as described previously (18). PC-3 (Prostate Carcinoma; ATCC) were grown in RPMI 1684 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine (5 mM), and kanamycin (100 µg/ml).

Human prostate tissue specimens were obtained from resection surgeries performed on patients who gave informed consent and on clinical indications in the Urology Department at l'Hôpital St. Philibert. All specimens came from patients who had not received antiandrogen therapy. In addition, all specimens were diagnosed by an anatomopathological examination. After patient surgery, primary cells were prepared as described by Bidaux et al. (16).

All experiments on human tissues were approved by the Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomedicale de Lille (CCPPRB), Lille, France.

**Transfection of siRNA.** PrPE cells were transfected with 50 nM siTRPM8 (synthesized by Dharmacon) using 6 µl TransIT-TKO transfection reagent (Mirus Bio Corp.) according to the manufacturer's instructions. Sense sequences of siTRPM8-1 and siTRPM8-2 were 5'-UCUCUGAGCGCACUAUUCA(dTdT)-3' and 5'-UAUCCGUCGUCUAUCUA(dTdT)-3', respectively. These sequences are located at positions 894 and 2,736 on the TRPM8 mRNA (GenBank accession no. AY328400).

**Heterologous overexpression.** PC-3 cells were transfected with AR encoding vector using Nucleofector as recommended by the manufacturer (Amaxa).

**Quantitative real-time PCR analysis.** Expression levels of PCR products were quantified by quantitative real-time PCR on an ABI Prism 5700 Sequence Detection System. For each reaction, 10 ng of cDNA was placed in a 20-µl reaction mixture containing 12.5 µl of 2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 300 nM of primer pairs (see Supplemental Table 1). TRPM8 mRNA levels were quantified with 2 different primer pairs, TRPM8(F8/R9) and TRPM8(F21/R22), whose sequences are presented in Supplemental Table 1. The housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) was used as an endogenous control to normalize variations in RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. To quantify the results we used the comparative threshold cycle method described by Livak and Schmittgen (40).

For single-cell real-time PCR, each cell fraction was split into 2 samples, which were submitted to reverse transcription with or without Moloney murine leukemia virus (MuLV) reverse transcriptase (Applied Biosystems). For analysis of real-time PCR, background contamination (samples without MuLV reverse transcription) was subtracted from the mRNA level of samples with MuLV transcription prior to calculation of the F8/R9-to-F21/R22 ratio.

**Western blot assay.** Total proteins from PC-3 cells were harvested in PBS, and then sonicated in an ice-cold buffer (pH 7.2) containing 10 mM  $PO_4Na_2/K$  buffer, 150 mM NaCl, 1 g/100 ml sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1% NP40, a mixture of protease inhibitors (Sigma-Aldrich), and a phosphatase inhibitor (sodium orthovanadate; Sigma-Aldrich).

Prostate tissue membrane fractions were obtained by disrupting prostate resection specimens with a tissue homogenizer in an ice-cold lysis buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.2), 25 mM sucrose, 0.1 mM EGTA, 5 mM EDTA, a mixture of protease inhibitors (Sigma-Aldrich), and a phosphatase inhibitor (sodium orthovanadate; Sigma-Aldrich). After 30 minutes of centrifugation at 30,000 g to remove the soluble protein fraction, the pellet was resuspended in the first buffer. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane using a semi-dry electroblotter (Bio-Rad). Immunoblotting was performed with primary rabbit polyclonal anti-TRPM8 antibody (diluted 1:2,000, catalog no. ab3243; Abcam) as described previously (16). The membrane was processed for chemiluminescence detection using Supersignal West Dura chemiluminescent substrate (Pierce) according to the manufacturer's instructions. Membranes were reblotted twice: first with mouse monoclonal anti-AR antibody (diluted 1:50, catalog no. ab9474; Abcam), and then with mouse monoclonal anti-pan-actin (diluted 1:500, catalog no. MS-1295-P; Neomarkers).

**Electrophysiology and solutions.** Membrane currents were recorded in the whole-cell configuration using the patch-clamp technique, together with



a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic), as previously described (7). Patch pipettes were made on a P-97 puller (Sutter Instruments) from borosilicate glass capillaries (World Precision Instruments). For composition of extra- and intracellular solutions used, see Supplemental Table 2.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>EX</sub> measurements.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>EX</sub> was measured using Fluo-4 AM dye, as previously described (18), in the same normal extracellular solution used for electrophysiological recordings of TRPM8. To produce Ca<sup>2+</sup>-free conditions, CaCl<sub>2</sub> was removed from this solution and 0.5 mM EGTA was added.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>IN</sub> measurements.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IN</sub> was measured using Mag-Fluo-4 AM dye, as previously described (18). Ratio imaging of Mag-Fluo-4 was measured using a confocal microscope (LSM 510; Zeiss).

**Statistics.** Electrophysiological data were analyzed using PulseFit (version 8.31; HEKA Electronics), pCLAMP (version 8; Axon Instruments), and Origin (version 7.0; Microcal) software. Results were expressed as mean ± SEM unless otherwise indicated. Student's *t* test was used for statistical comparison of the differences, and *P* < 0.05 was considered significant.

See supplemental methods for the creation of HEK-293 cell line, recombinant protein preparation, RT-PCR, and immunohistochemistry.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM; Ministère de l'Éducation Nationale; and La Ligue Nationale Contre le Cancer, la région Nord/Pas-de-Calais. Y. Shuba was supported by a grant from INTAS (011-8223). D. Gkikia was supported by a long-term fellowship from the European Molecular Biology Organization (ALTF-161-2006).

Received for publication August 25, 2006, and accepted in revised form March 20, 2007.

Address correspondence to: Natalia Prevarskaya, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Bâtiment SN3, USTL, Villeneuve d'Ascq 59655, France. Phone: 33-3-20-43-40-77; Fax: 33-3-20-43-40-66; E-mail: natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr.

Gabriel Bidaux and Matthieu Flourakis contributed equally to this work.

1. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105–111.
2. Schalken, J.A., and van Leenders, G. 2003. Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology* **62**:11–20.
3. Hendriksen, P.J., et al. 2006. Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res* **66**:5012–5020.
4. Legrand, G., et al. 2001. Ca<sup>2+</sup> pools and cell growth. Evidence for sarcoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J. Biol. Chem.* **276**:47608–47614.
5. Thebaud, S., et al. 2006. Differential role of transient receptor potential channels in Ca<sup>2+</sup> entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* **66**:2038–2047.
6. Vanoverbergh, K., et al. 2004. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* **11**:321–330.
7. Skryma, R., et al. 2000. Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J. Physiol.* **527**:71–83.
8. Vanden Abeele, F., Roudbaraki, M., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. 2003. Store-operated Ca<sup>2+</sup> current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca<sup>2+</sup> transporter type 1. *J. Biol. Chem.* **278**:15381–15389.
9. Vanden Abeele, F., et al. 2002. Bcl-2-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* **1**:169–179.
10. Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**:595–598.
11. Zhang, L., and Barritt, G.J. 2005. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr. Relat. Cancer* **13**:27–38.
12. Kießling, A., et al. 2003. Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8. *Prostate* **56**:270–279.
13. Tsavaler, L., Shaper, 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.
14. Fuessel, S., et al. 2003. Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int. J. Oncol.* **23**:221–228.
15. Henshall, S.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.
16. Bidaux, G., et al. 2005. Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr. Relat. Cancer* **12**:367–382.
17. McKerny, D.D., Neuhauser, W.M., and Julius, D. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**:52–58.
18. Thebaud, S., et al. 2005. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential molar-lactone family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**:39423–39435.
19. Zhang, L., and Barritt, G.J. 2004. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca<sup>2+</sup> channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**:8365–8373.
20. Erler, J., et al. 2006. Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J. Biol. Chem.* **281**:38396–38404.
21. Wang, S., et al. 2006. Pten deletion leads to the expansion of a prostate stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:1480–1485.
22. Garraway, L.A., et al. 2003. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate* **55**:206–218.
23. Flanz, B., et al. 2004. Studies on the differentiation pathway and growth characteristics of epithelial culture cells of the human prostate. *Prostate Cancer Prostate Dis* **7**:73–83.
24. Uzgare, A.R., Xu, Y., and Isaacs, J.T. 2004. In vitro culturing and characteristics of transit amplifying epithelial cells from human prostate tissue. *J. Cell. Biochem.* **91**:196–205.
25. Whitacre, D.C., et al. 2002. Androgen induction of in vitro prostate cell differentiation. *Cell Growth Differ.* **13**:1–11.
26. 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.
27. Peier, A.M., et al. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**:705–715.
28. van Leenders, G.J., et al. 2003. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am. J. Pathol.* **162**:1529–1537.
29. Bonkhoff, H., and Remberger, K. 1996. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* **28**:98–106.
30. 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. *Curr. Rev. Oncol. Hematol.* **46**(Suppl.):S3–S10.
31. Xu, G.M., et al. 2001. Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J. Biol. Chem.* **276**:46544–46552.
32. 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.
33. Arniges, M., Fernandez-Fernandez, J.M., Albrecht, N., Schaefer, M., and Valverde, M.A. 2006. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J. Biol. Chem.* **281**:1580–1586.
34. Kottgen, M., et al. 2005. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J.* **24**:705–716.
35. Stein, R.J., et al. 2004. Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J. Urol.* **172**:1175–1178.
36. Rohacs, T., Lopes, C.M., Michalidis, 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.
37. Thebaud, S., et al. 2003.  $\alpha$ 1-adrenergic receptors activate Ca<sup>2+</sup>-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **111**:1691–1701. doi:10.1172/JCI200316293.
38. Berridge, M.J. 2001. The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Found. Symp.* **239**:52–64; discussion 64–57, 150–159.
39. Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. 2004. Ca<sup>2+</sup> homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**:1326–1335.
40. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**:402–408.

**SUPPLEMENTAL DATA**

Supplemental table 1. List of primers used for RT-PCR assays.

	5' forward 3'	5' reverse 3'	Expected Size (bp)	Accession number
TRPM8 F12/R15	GATTTTCACCAATGACCG CCG	CCCCAGCAGCATTGATG TCG	503	AY328400
TRPM8 F8/R9	CTGTCATGGACATCCCAC TG	GGGATCTTGCCACCATA GTT	102	AY328400
TRPM8 F21/R22	ATTCCGTTTCGGTCACTAC G	CACACACAGTGGCTTGG ACT	127	AY328400
AR	TTGAGCCAGGTGTAGTGT GTG	CTGGAGTTGACATTGGT GAAGG	241	NM_000044
PSA	CTCACCCCTGTCCGTGACGT GGATT	AAGCTGTGGCTGACCTG AAATA	266	NM_001648.2
GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAG GC	GGCATGGACTGTGGTCA TGA	237	NM_002046.3
HPRT	GGCGTCGTGATTAGTGAT GAT	CGAGCAAGACGTTTCAGT CCT	134	NM_000194

Supplemental table 2: Compositions of bath and pipette solutions for electrophysiological recordings.

Salt	I MENTHOL		I SOC MENTHOL	
	BATH	PIPETTE	BATH	PIPETTE
NaCl	140	8	145	-
CH <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SCs	-	-	-	120
CsCl	-	-	-	10
KCl	5	145	5	-
CaCl <sub>2</sub>	2	0.5	10	-
MgCl <sub>2</sub>	2	0.1	1	6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	-	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	5	-	-	-
HEPES	10	10	10	10
BAPTA	-	-	-	10
EGTA	-	1	-	-
Glucose	5	-	5	-
pH adj	NaOH	KOH	NaOH	CsOH

Concentrations are given in mM, pH of all solutions was adjusted to 7.3. Osmolarity of the bath and pipettes solutions was approximately 300 and 280mosm/L, respectively.

## Supplemental Methods

*Creation of HEK-293 cell line stably expressing TRPM8* – was performed as described in (1).

*Recombinant protein preparation* – TRPM8 protein fused with COOH-terminal 6-histidine epitope tags were purified with the denaturing condition of Ni-NTA agarose kit (Invitrogen Inc) as recommended. Protein quantities in fractions were assessed by taking OD280 readings. Fractions containing proteins were finally concentrated with a cut-off at 10,000 MW.

*RT-PCR* – Total RNAs were isolated from PC-3 and HEK-TRPM8 cells as described (1). To detect TRPM8 cDNA, PCR was performed by adding 1µl of the RT template to a mixture of: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP, and 1 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), in a final volume of 25 µl. DNA amplification conditions included an initial denaturation step of 7 min at 95°C, and 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 40 sec at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Primers used are listed in supplemental Table 1.

*Immunohistochemistry* – 1) PrPE 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. 2) Resection specimens from human prostate were frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and kept in “Tissue-Tek”® at -80°C before 10µm sections were prepared at -20°C with a cryostat and mounted on glass slides. The sections were blocked with PBS-gelatine (Phosphate buffer saline, gelatine 1.2%) for 30 minutes at 37°C. Afterwards the cells were incubated with primary antibodies: (1/200) rabbit polyclonal anti-TRPM8 antibody (Abcam), (1/25) mouse monoclonal CD10 antibody (Abcam), (1/1,000) mouse monoclonal cytokeratin 18 antibody (Neomarkers), (1/1,000) mouse monoclonal cytokeratin 8 antibody (Neomarkers), (1/1,000) mouse monoclonal cytokeratin 14 antibody (Chemicon international) 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 mounted with Mowiol®.

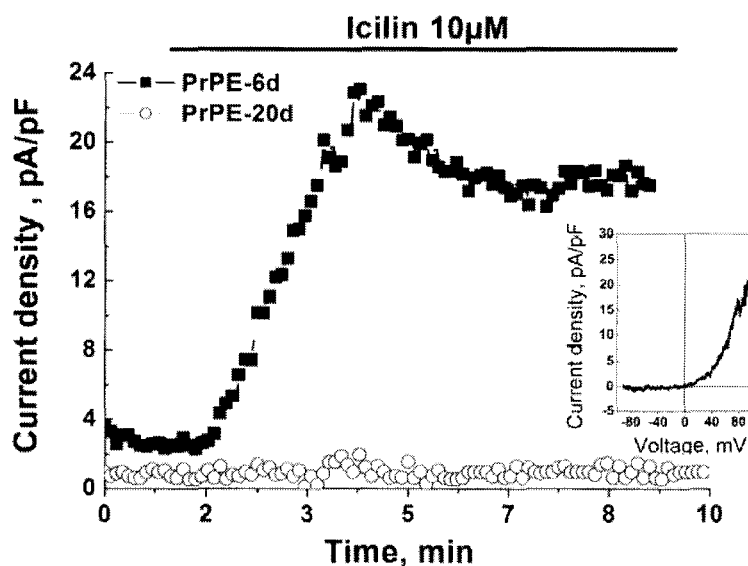
Fluorescence analysis was carried out using a Zeiss LSM 510 confocal microscope and analysis software (AIM 3.2, Zeiss), as previously described (1).

### **Supplemental References**

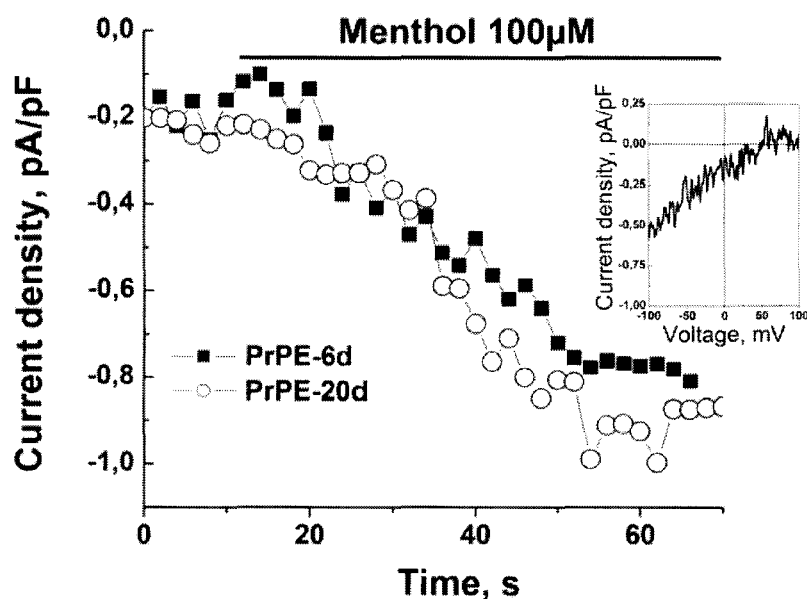
1. Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., et al. 2005. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 280:39423-39435.

Supplemental figure 1

A



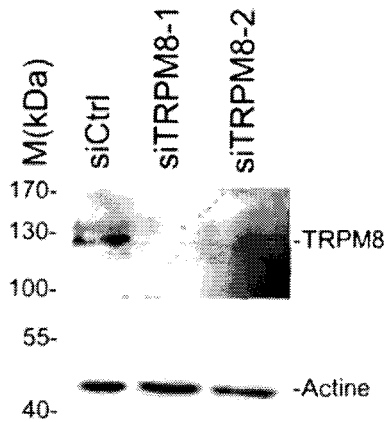
B



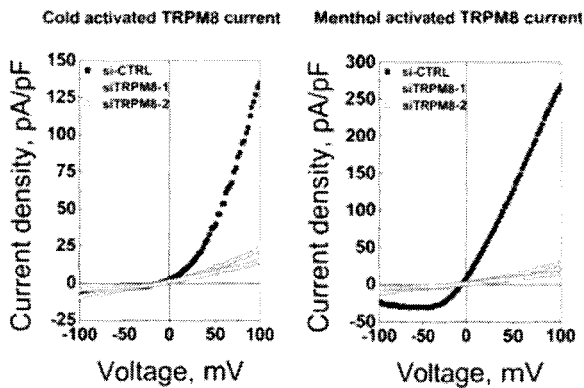
(A), Icilin ( $10\mu\text{M}$ ) evoked  $I_{\text{TRPM8}}$  ( $22.89 \pm 3.4$  pA/pF at +100 mV,  $n=11$ ) strictly restricted to PrPE-6d. Currents were recorded from voltage ramps at +100mV. Inset shows the representative I-V relationships of  $I_{\text{TRPM8}}$ . (B), Representative time courses of whole-cell  $I_{\text{SOC/MENTHOL}}$  induced by  $100\mu\text{M}$  menthol in PrPE-6d and PrPE-20d at  $36^\circ\text{C}$ . Currents obtained from voltage ramps at -100mV. The inset shows the representative I-V relationships of  $I_{\text{SOC/MENTHOL}}$ .

Supplemental figure 2

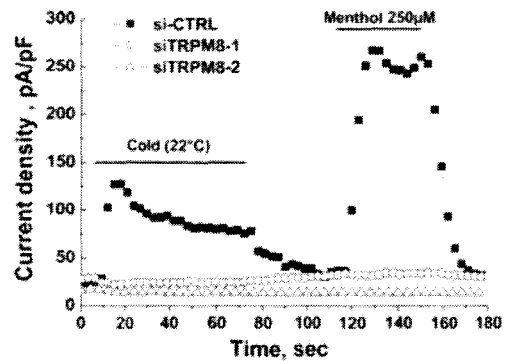
**A**



**B**



**C**



Specific siRNA-mediated ablation of either classical TRPM8 or total TRPM8 mRNAs has different effects on menthol-evoked  $Ca^{2+}$  release. (A)

Immunoblotting showing detection of TRPM8 proteins in HEK-TRPM8 cells with 100 nM of either control siRNA or siRNA anti-TRPM8. (B) Representative I-V relationships of the cold or menthol activated  $I_{TRPM8}$  in HEK-TRPM8 cells with either control siRNA or siRNA anti-TRPM8. (C) Typical traces of the cold or menthol activated  $I_{TRPM8}$  in HEK-TRPM8 cells with either control siRNA or siRNA anti-TRPM8 (currents recorded from voltage ramps at +100mV).

## II.B) Conclusion.

En conclusion, ces travaux démontrent que :

(i) TRPM8 est fonctionnel dans la membrane plasmique et dans la membrane du RE des cellules épithéliales apicales sécrétrices matures alors que seule la fonction réticulaire est présente dans les cellules épithéliales intermédiaires.

(ii) L'acquisition du récepteur des androgènes induit l'intensification de la fonction réticulaire et l'apparition de la fonction membranaire de TRPM8 lors de la différenciation des cellules intermédiaires en cellules apicales.

(iii) L'évolution du cancer de la prostate se traduit par une dédifférenciation des cellules épithéliales avec une hausse globale de l'expression TRPM8. Ces cellules possèdent donc une fonction membranaire et une fonction réticulaire plus intenses (comparable à celle obtenue dans un modèle de surexpression hétérologue).

(iv) L'ensemble de ces résultats tend à montrer qu'il existe deux formes du canal TRPM8. La forme classique de TRPM8 peut être exprimée à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane du RE. Sa localisation dépend de l'activité du récepteur aux androgènes. La seconde isoforme, plus courte, est exprimée uniquement sur la membrane du RE et est moins sensible aux androgènes que la forme classique.

## II.C) Résultats préliminaires : localisation de TRPM8 dans des jonctions fonctionnelles entre le RE et les mitochondries.

### **“TRPM8 localization in ER-Mitochondria fonctionnal junction”.**

Matthieu Flourakis, Gabriel Bidaux, Dimitri Gordienko, Benjamin Beck, Morad Roudbaraki, Roman Skryma and Natalia Prevarskaya.

Dans l'article précédent, nous avons vu que le canal TRPM8 pouvait être exprimé sur la membrane du RE et provoquer une vidange calcique suite à la stimulation par le menthol, l'icilin ou le froid. A l'heure actuelle, aucun rôle physiologique n'est connu pour TRPM8 au niveau prostatique, que ce soit pour le canal exprimé sur la membrane plasmique ou sur la membrane du RE des cellules prostatiques humaines. Dans les deux articles qui suivent nous allons tenter d'élucider ce mystère.

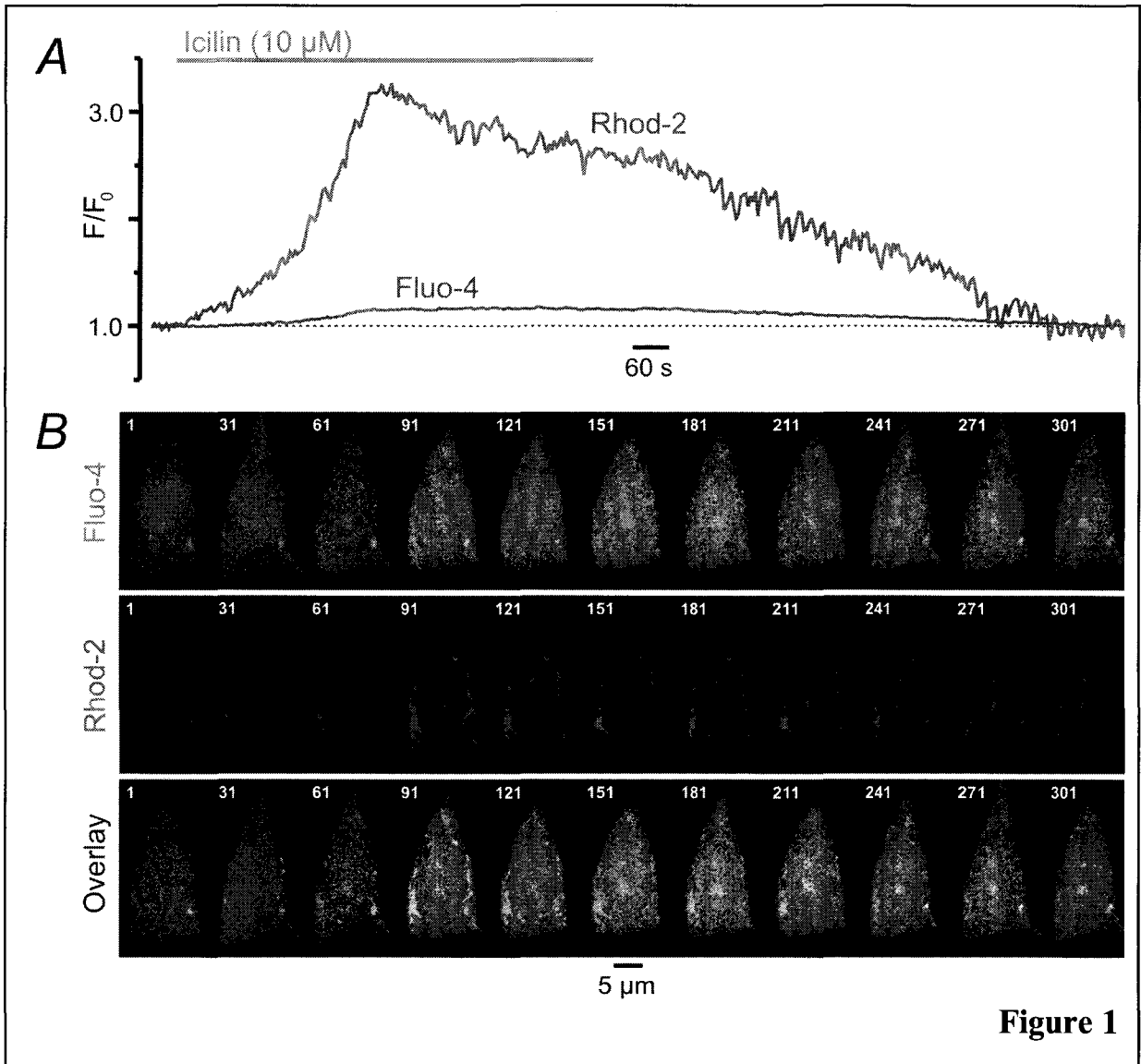
Tout d'abord, nous allons étudier le rôle de TRPM8 situé sur le RE dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Plusieurs auteurs ont démontré le rôle du transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis le RE jusque dans la matrice des mitochondries (Hajnoczky *et al.* 2000; Breckenridge *et al.* 2003). Par exemple, l'augmentation du calcium libre cytosolique induit l'activation de la calpaïne (protéase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante) et de la calcineurine (phosphatase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante) activent respectivement les protéines pro-apoptotiques Bax et Bad (Altznauer *et al.* 2004; Shou *et al.* 2004). Parallèlement, la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique par les mitochondries entraîne une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  libre mitochondrial ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ). Cette augmentation pourrait intervenir dans l'activation du Pore Transitoire de Perméabilité (PTP) et provoquerait ainsi la libération vers le cytoplasme de deux facteurs pro-apoptotiques : le cytochrome C et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Korge and Weiss 1999).

Paradoxalement, d'autres travaux démontrent que l'augmentation transitoire et cyclique de  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  induit la stimulation du cycle de Krebs par l'activation des pyruvate-, isocitrate- et oxoglutarate-déshydrogénases. Cette stimulation conduit à une augmentation de la synthèse d'ATP au sein des mitochondries. La synthèse optimale d'ATP par les mitochondries a été observée pour une  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  d'environ 1  $\mu\text{M}$ , ce qui représente la concentration atteinte localement lors d'une vidange réticulaire (Moreno-Sanchez 1985). La balance entre

apoptose/prolifération serait alors définie par l'intensité et la durée de cette augmentation de  $[Ca^{2+}]_m$ .

Le but de cette étude est donc de découvrir si la proximité entre les mitochondries et le RE dans les cellules épithéliales prostatiques favoriserait la recapture du  $Ca^{2+}$  réticulaire par les mitochondries. Ainsi, l'activité de TRPM8 réticulaire permettrait donc d'orienter les cellules épithéliales prostatiques soit vers l'apoptose soit vers la prolifération.



Dans un premier temps, nous avons vérifié l'action de l'icilin sur l'activité du canal TRPM8. Dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines de type LNCaP, TRPM8 est localisé uniquement sur la membrane du RE. Avec l'aide de la microscopie confocale et d'un double marquage cytoplasmique et mitochondriale, nous avons suivi simultanément la  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  et la  $[Ca^{2+}]_{\text{mitochondriale}}$  ( $[Ca^{2+}]_m$ ). En l'absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire, l'icilin induit une faible augmentation  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  et en parallèle une très forte hausse de la  $[Ca^{2+}]$  dans les mitochondries (**figure 1**). Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_m$  précède la hausse de  $[Ca^{2+}]$  dans le cytoplasme. Ceci pourrait s'expliquer par une localisation très proche des membranes réticulaires et mitochondriales.

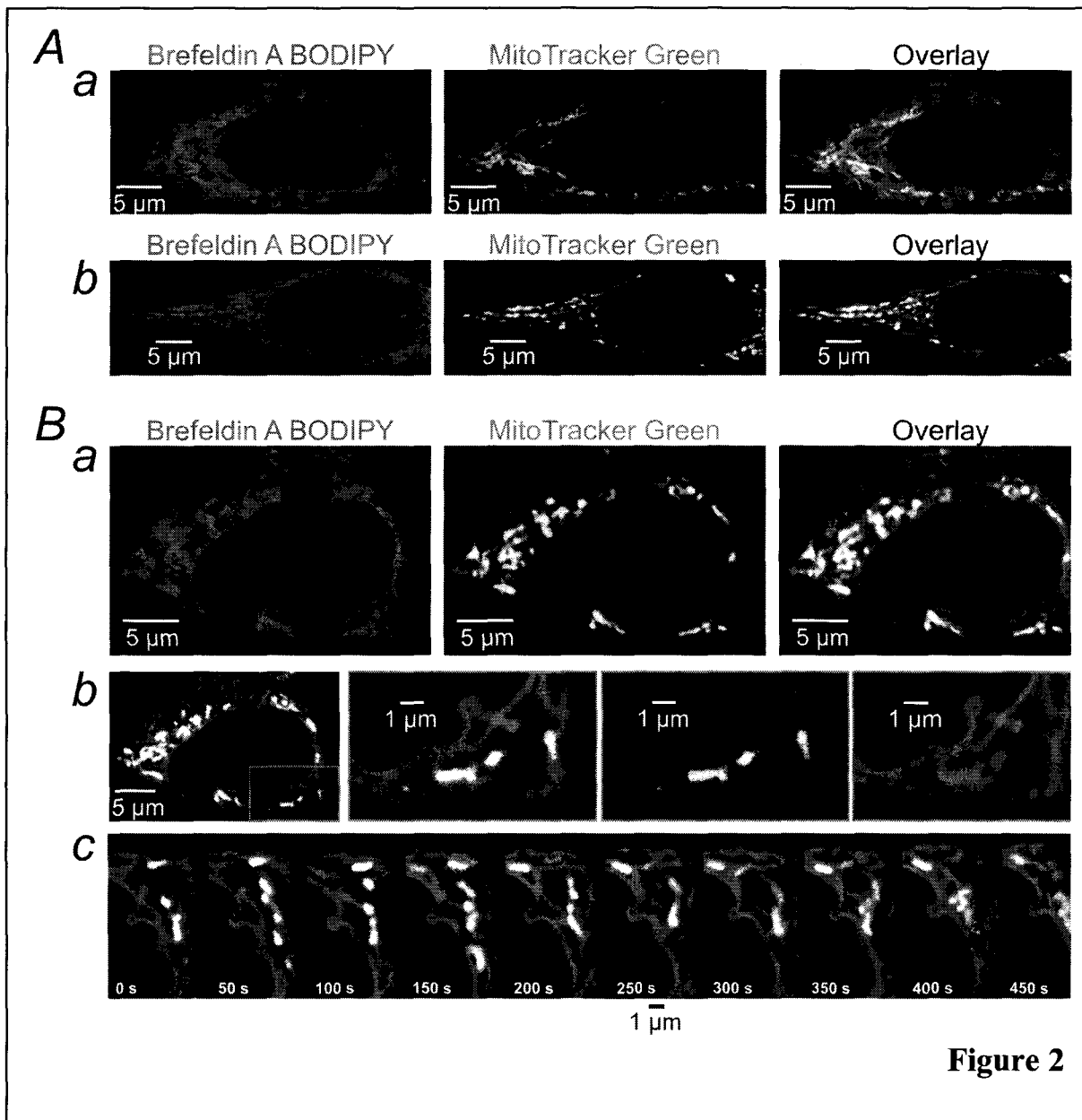
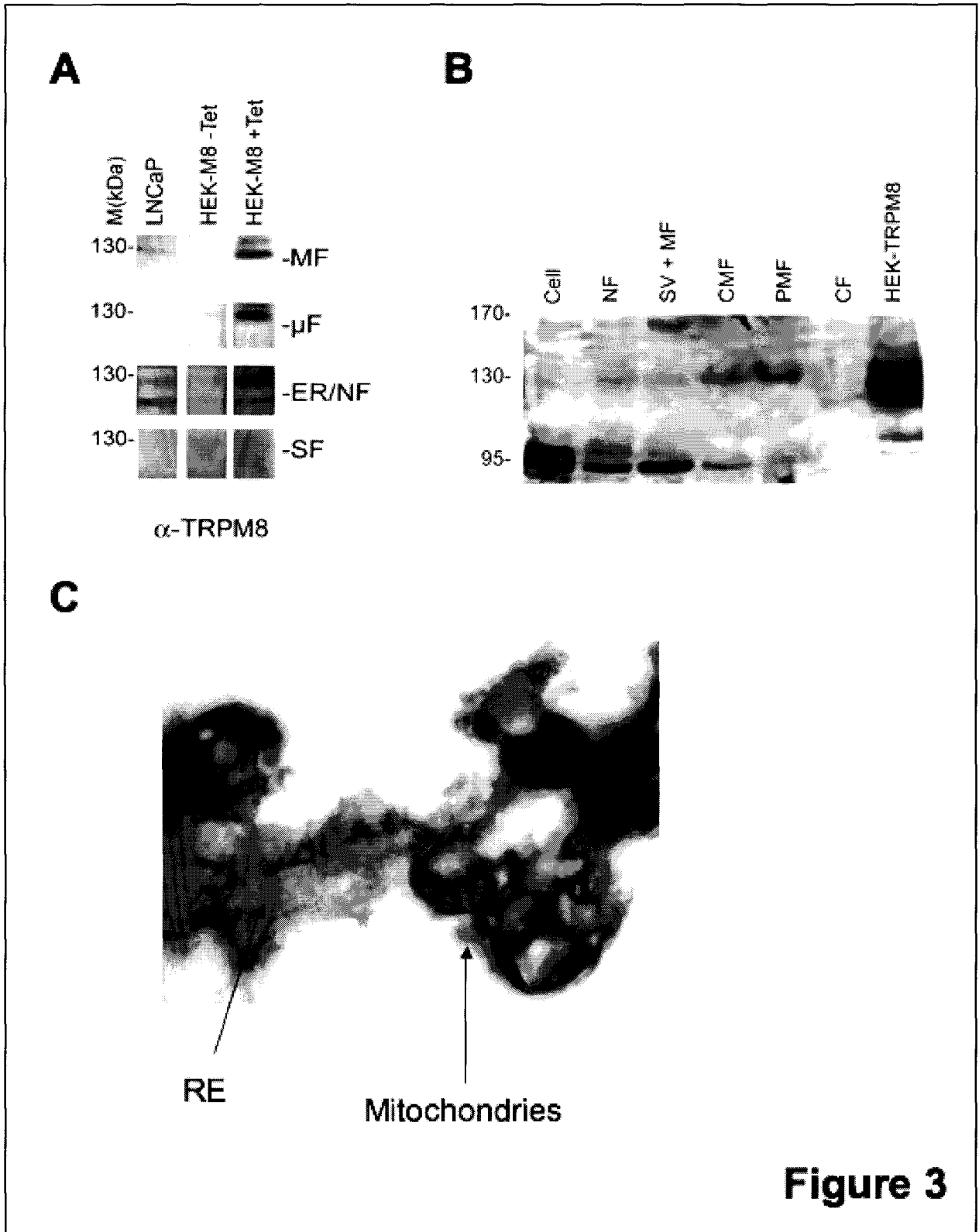


Figure 2

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la localisation des mitochondries par rapport au RE. La **figure 2A** montre que les mitochondries (marquées avec le mitotracker green) sont très proches du RE (en rouge grâce à la brefeldin A Bodipy). Le RE forme un réseau dans le cytoplasme des cellules LNCaP, les mitochondries sont enfermées dans ce réseau. De façon intéressante, lorsque l'on suit, en microscopie confocale dynamique, les mouvements du RE, les mitochondries suivent parfaitement le RE (**figure 2B b et c**). Ainsi, les mitochondries semblent être « attachées » au RE, ceci confirme donc la colocalisation de ces deux organites.





Nous avons ensuite étudié plus précisément la localisation de TRPM8 sur la membrane du RE. En effet, il est intéressant de savoir dans quelle région du RE se situe TRPM8, et si ces régions coïncident avec les zones colocalisées avec les mitochondries.

Grâce à des centrifugations différentielles, nous avons obtenu des fractions cellulaires permettant de distinguer différents organites. Comme l'illustre la **figure 3A**, dans les cellules cancéreuses prostatiques de type LNCaP, TRPM8 est principalement détecté dans les fractions ER/NF (ou CMF) (correspond aux principaux organites intracellulaires : mitochondries, RE et noyau). Afin de purifier ces fractions, nous avons effectué une séparation de ces organites par gradient « optiprep ». Ceci permet d'obtenir une fraction (la fraction PMF) composée essentiellement de mitochondries et de morceaux de membranes réticulaires qui sont associées aux mitochondries. Comme indiqué sur la **figure 3B**, nous détectons bien TRPM8 dans cette fraction. Ainsi, nous pouvons émettre hypothèse que la forme réticulaire de TRPM8 se trouve dans ces parties de membrane du RE qui sont associées aux mitochondries. En effet, des résultats obtenus en microscopie électronique indiquent que TRPM8 est présent sur ces morceaux de membrane réticulaire et n'est pas exprimé sur la membrane mitochondriale (**figure 3C**).

## Conclusion

Ces résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence la localisation sub-cellulaire plus précise de TRPM8. Ainsi, ce canal est exprimé dans des régions précises du RE des cellules cancéreuses prostatiques humaines. TRPM8 serait regroupé en des zones de la membrane du RE qui sont associées à la membrane des mitochondries. Ainsi, le  $\text{Ca}^{2+}$  sortant suite à l'activation de TRPM8 serait recapté directement par les mitochondries. Ce cycle du  $\text{Ca}^{2+}$  entre le RE et les mitochondries permettrait de réguler, en fonction de l'activité de TRPM8, certains processus physiologiques tels que la prolifération, la sécrétion ou l'apoptose.

## II.D) Article 4

### **« Involvement of ER-TRPM8 in prostate smooth muscle cells contraction »**

Matthieu Flourakis, Gabriel Bidaux, Benjamin Beck, Dimitri Gordienko, Morad Roudbaraki, Christian Slomiany et Natalia Prevarskaya.

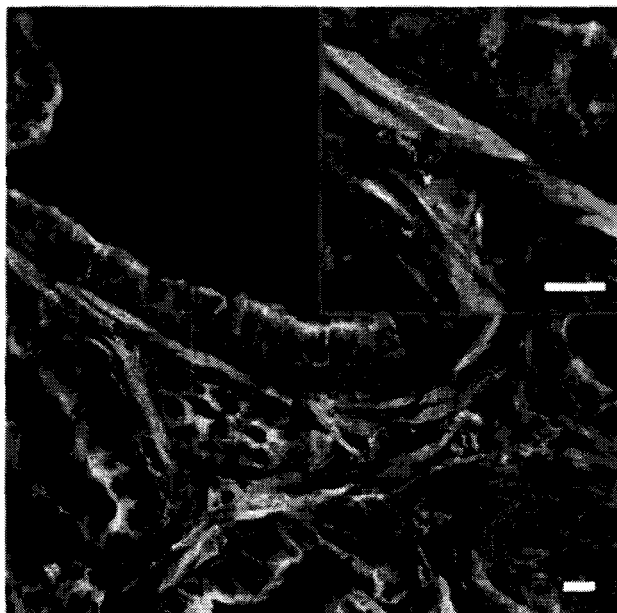
Article en cours de préparation.

Les cellules musculaires lisses sécrètent de nombreux facteurs (hormones, facteurs de croissance, etc...) qui vont agir de façon paracrine sur l'épithélium adjacent pour contrôler sa croissance. Parmi les différents facteurs étudiés, une des voies hormonales les mieux décrites dans les cellules musculaires lisses prostatiques est la voie alpha1-adrénergique.

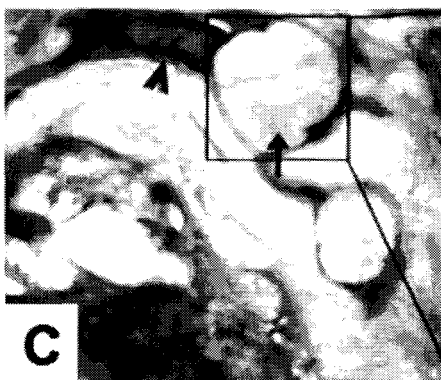
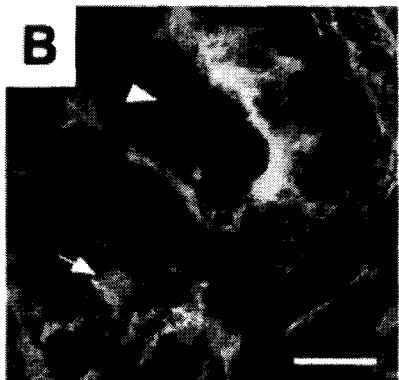
Si de nombreux travaux ont été dévolus à l'étude des canaux activés par la voie alpha-adrénergique dans les cellules musculaires lisses bordant les vaisseaux, aucune information n'est connue sur d'autres canaux permettant la contraction des cellules musculaires lisses prostatiques.

Des études préliminaires du laboratoire ont mis en évidence l'expression de TRPM8 dans les cellules musculaires lisses prostatiques. Le but de l'article suivant est donc de caractériser le rôle de ce canal dans ces cellules.

**A**



**B**



**E**

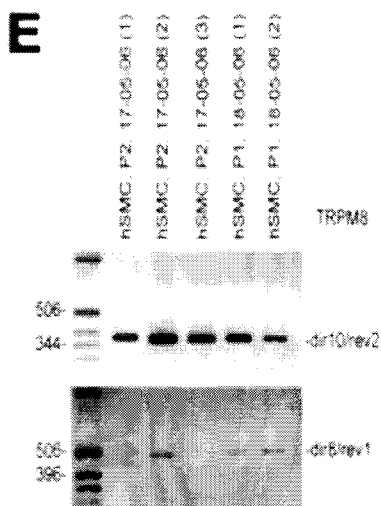
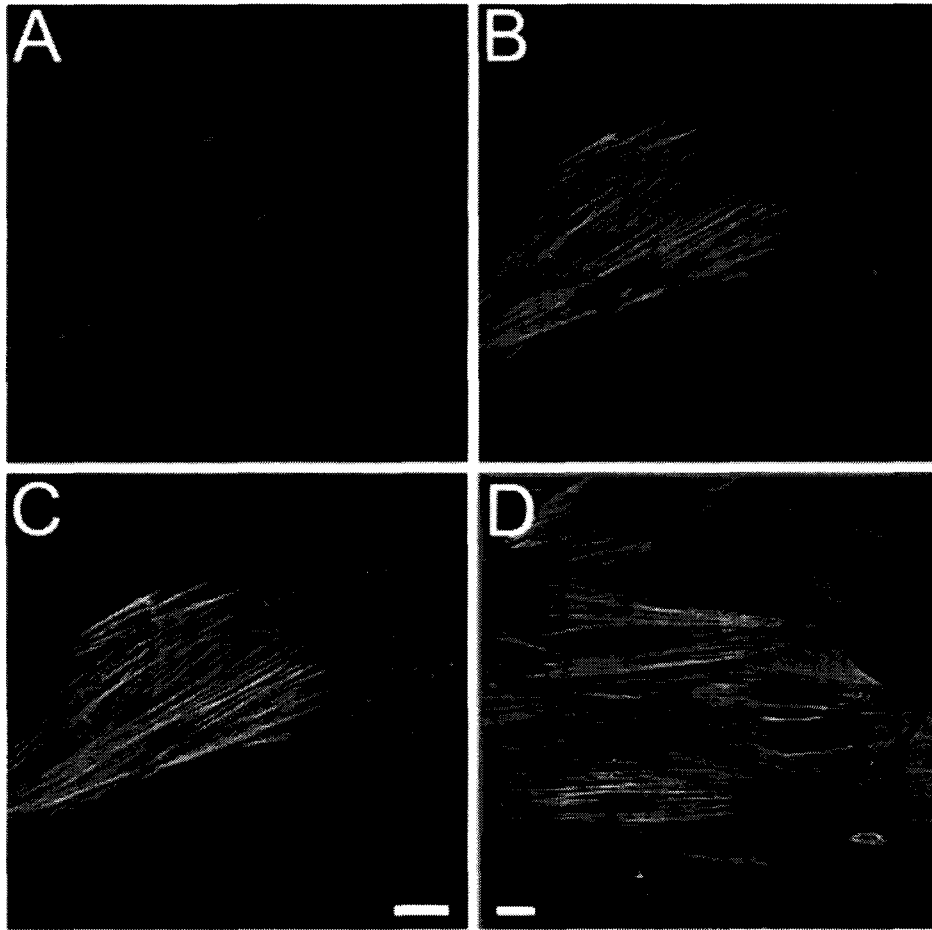


**Figure 1**

Nous avons commencé cette étude de TRPM8 dans les cellules musculaires lisses en immunohistochimie. La **figure 1A** présente la détection de TRPM8 (vert, Alexa 488) et de l' $\alpha$ -actine lisse (rouge, Alexa 546 ; utilisée comme marqueur des cellules musculaires lisses) en microscopie confocale. La couleur orange-jaune indique les zones de colocalisation. Notez la détection de structures fibrillaires en jaune dans l'image zoomée (en haut à droite). Un zoom effectué sur cette même coupe (représentée en **figure 1B**) permet de visualiser un acinus (marqué par un astérisque) bordé de cellules musculaires lisses (visualisé en orange et marqué par des flèches) (Les barres blanches représentent 10  $\mu$ m. Grossissement \*600.)

La localisation subcellulaire de TRPM8 a été ensuite étudiée en microscopie électronique. La **figure 1C** montre la détection de la protéine TRPM8 dans des cellules stromales fusiformes (caractéristiques des cellules musculaires lisses). Les cellules musculaires sont observées en coupe transversale (flèche), sous jacentes à la membrane basale (tête de flèche). La **figure 1D** représente un grossissement d'une cellule musculaire lisse en coupe transversale avec détection d'un marquage intracellulaire ponctué uniquement intracellulaire. La **figure 1E** représente une coupe longitudinale de cellule stromale riche en fibres (flèche) pouvant correspondre à une cellule musculaire lisse. Le marquage ponctué suivant les fibres est détecté dans cette cellule (tête de flèches).

Dans cette première partie de l'étude, nous avons démontré que TRPM8 est bien exprimé dans les cellules musculaires lisses prostatiques. Le marquage de TRPM8 observé en microscopie électronique a permis de mettre en évidence que cette protéine est exprimée uniquement au niveau intracellulaire et potentiellement le long des fibres musculaires lisses.



**Figure 2**

Cette hypothèse a été confirmée en immunofluorescence sur des cultures primaires de cellules musculaires lisses de prostate humaine observées par microscopie confocale. La **figure 2A** présente la détection de TRPM8 (Alexa 546, rouge, **figure 2A**) et de l' $\alpha$ -actine lisse (Alexa 488, vert, **figure B**) utilisée comme marqueur des cellules musculaires lisses. La couleur orange-jaune indique les zones de colocalisation (**C**). Notez la détection de structures fibrillaires en jaune. La **figure 2D** montre un champ plus large. Les barres blanches représentent 10  $\mu$ m. (Grossissement optique \*600.)

Ces résultats semblent donc indiquer que TRPM8 est exprimé le long des fibres musculaires lisses. De plus, dans les cellules musculaires lisses ce canal ne serait pas exprimé sur la membrane plasmique. Ainsi, nous avons voulu savoir qu'elle est l'isoforme de TRPM8 présente dans ces cellules.

En collaboration avec des membres du laboratoire, nous avons testé la structure de l'ARN de TRPM8 par PCR en utilisant les deux couples d'oligonucléotides utilisés dans l'article précédent. Le résultat de la PCR présenté dans la **figure 2E** montre l'amplification de la séquence encodant une partie domaine ionique de TRPM8. Ce produit de PCR a été cloné puis séquencé. Il présentait une homologie parfaite avec la séquence TRPM8.

Nous avons confirmé cette expression par western blot. La protéine TRPM8 de taille attendue (128 kDa) n'a pas été détectée, alors qu'une protéine de 50 kDa était visible (**figure 2F**).

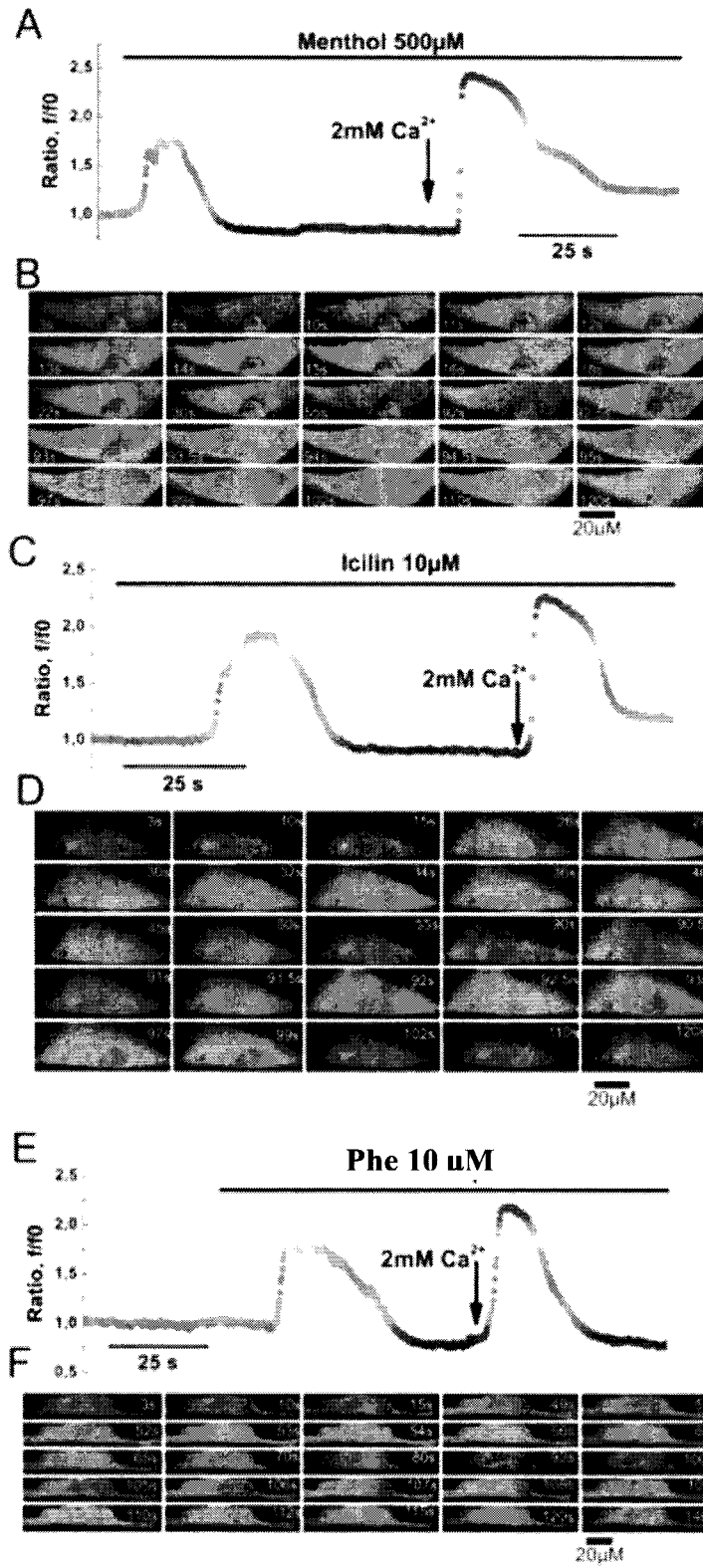


Figure 3



Nous avons testé la fonctionnalité de ce canal TRPM8. Les études de Patch-clamp en configuration « whole-cell » n'ont pas permis de détecter le courant TRPM8 classique (c'est-à-dire le courant dû à l'activité de TRPM8 sur la membrane plasmique). Néanmoins, les expériences de microscopie confocale dynamique nous ont permis de démontrer que le menthol et l'icilin induisent, en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, une vidange massive du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire (**Figure 3 A-D**), à l'image de la phenyléphrine, activateur synthétique des récepteurs  $\alpha$  adrénergiques et qui est connu pour mobiliser du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des stocks intracellulaires des cellules musculaires lisses (**Figure 3 E-F**). De plus, lorsque l'on rajoute du  $\text{Ca}^{2+}$ , on observe une augmentation stable de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  due à l'activation des canaux calciques de type SOC.

Ces résultats sont en continuité avec les résultats précédents. En effet, TRPM8 n'est pas présent sur la membrane plasmique et n'est présent que sur la membrane du RE jouant un rôle dans la régulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ .

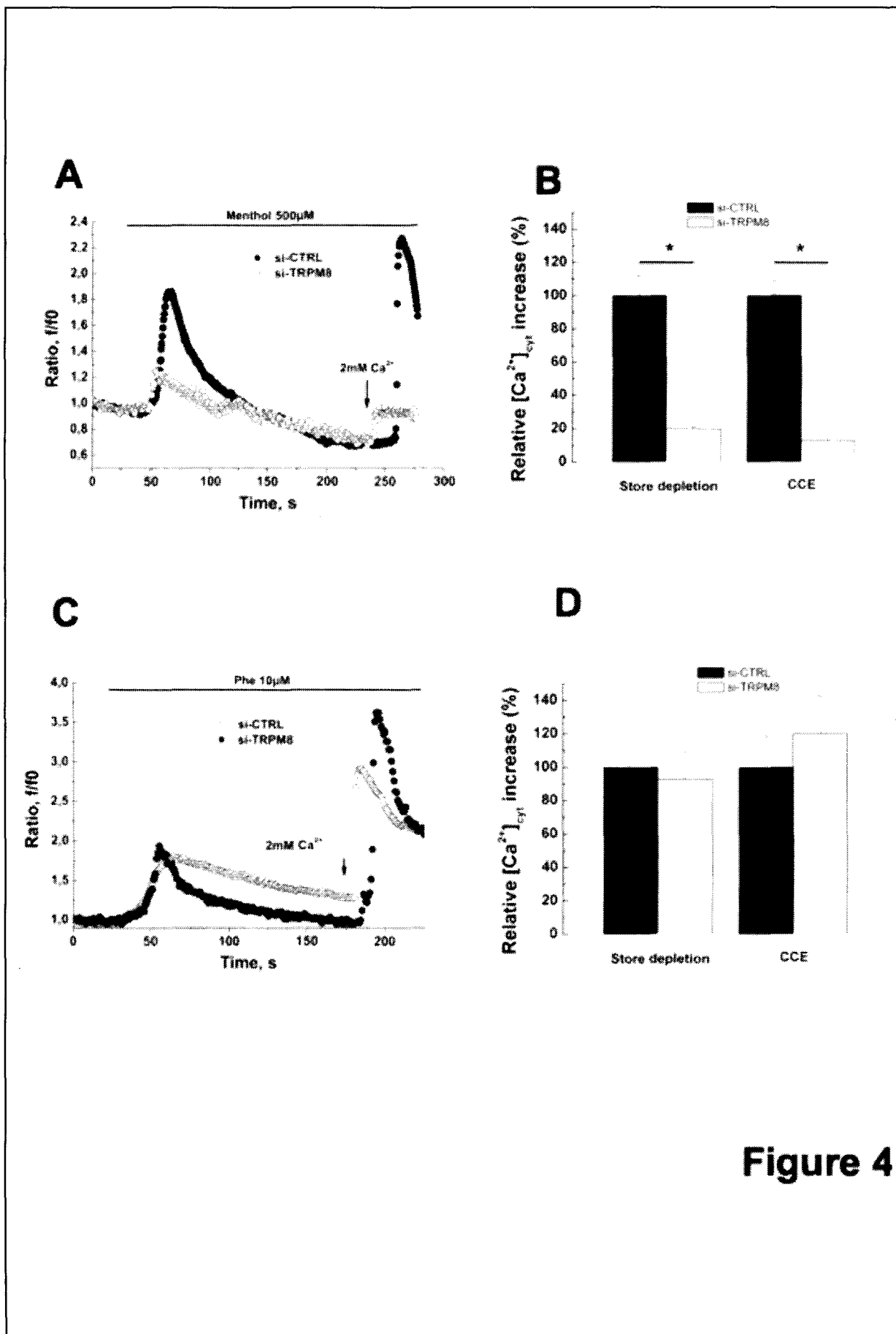
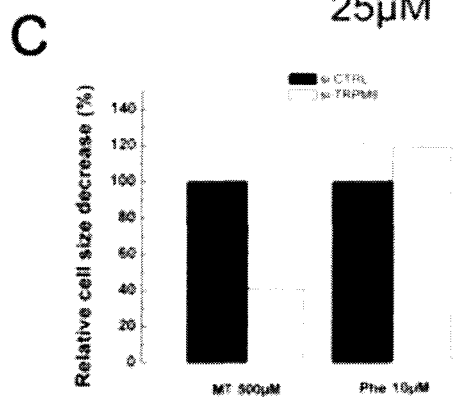
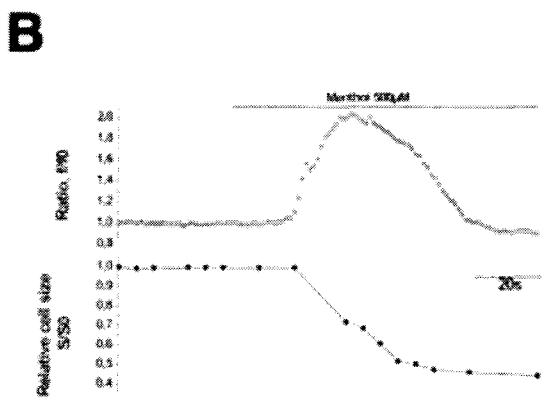
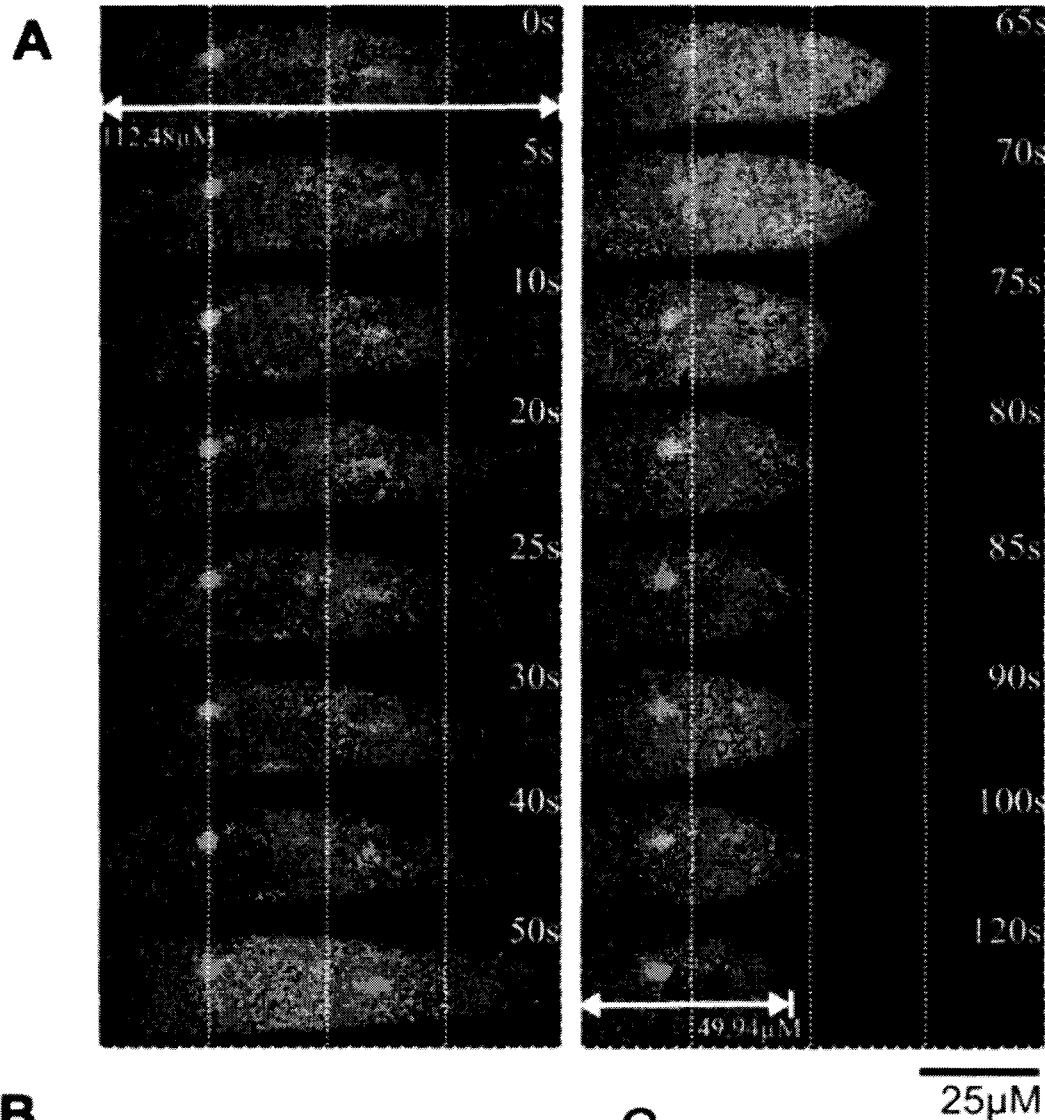


Figure 4

L'application de menthol induit donc une vidange calcique réticulaire suite à l'activation de TRPM8 situé sur le RE. Cependant, il est nécessaire de tester la spécificité d'action du menthol sur TRPM8. Pour cela, nous avons utilisé les siRNA dirigés contre la région du pore de TRPM8. Ainsi, le prétraitement des cellules musculaires lisses prostatiques avec les siRNA inhibe la vidange réticulaire induite par le menthol ainsi que l'ECC (figure 4A et B) (respectivement 100 +/- 11% vs 20 +/- 2%.pour la vidange et 100 +/- 7% vs 15 +/- 4%). Ce même prétraitement n'inhibe pas la vidange induite par la phényléphrine (**figure 4C et D**).

Ces résultats permettent de vérifier la spécificité d'action du menthol. Ainsi, l'activation de TRPM8 réticulaire induit une vidange calcique. Il est maintenant intéressant d'étudier le rôle physiologique de cette vidange.



**Figure 5**

Enfin, nous avons étudié le rôle fonctionnel de la vidange réticulaire induite par TRPM8. Nous avons suivi la contraction des cellules musculaires lisses prostatiques en microscopie confocale. Cette technique permet de suivre l'évolution de la taille de la cellule musculaire lisse. Ainsi, comme le montre la **figure 5A**, l'application de menthol 500 $\mu$ M en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, induit une diminution de moitié de la taille de la cellule (112,48  $\mu$ M de largeur en moyenne contre 49,94  $\mu$ M après application de menthol, n=15). Comme on peut le voir sur la **figure 5B**, l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  précède la contraction cellulaire, ceci semble donc bien indiquer que la contraction cellulaire est due à une vidange du RE. Cette vidange induite par le menthol est spécifique de TRPM8. En effet, les cellules transfectées avec les siRNA contre TRPM8 ne se contractent pas en présence de menthol, mais gardent la capacité de se contracter en réponse à l'activateur des récepteurs  $\alpha$  adrénergiques (Phe 10 $\mu$ M) (**figure 5C**).

**En conclusion, nos résultats démontrent l'expression d'une protéine TRPM8 dans les cellules musculaires lisses prostatiques. Cette protéine est fonctionnelle sur la membrane du RE et son activation provoque une vidange massive du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire comparable à celle déclenchée par l'application de la phényléphrine. Néanmoins, l'étude de la structure de l'ARN et de la protéine renforce l'hypothèse de l'existence d'une isoforme courte mais fonctionnelle de TRPM8 dans ces cellules musculaires. Cette isoforme, caractérisée par une séquence de TRPM8 tronquée, pourrait avoir perdu certains mécanismes de régulation de TRPM8. Cette étude permet de mettre en évidence, et ce pour la première fois, un rôle physiologique de TRPM8 dans la prostate. Ainsi, la contraction des cellules musculaires lisses prostatiques interviendrait dans la sécrétion du liquide prostatique indispensable à l'activation des spermatozoïdes. Cette étude représente donc une base solide de recherche pour de nouvelles cibles thérapeutiques contre l'infertilité masculine.**

### **III) Evolution de la signalisation calcique durant la cancérogenèse prostatique**

#### **III.A) Article 5**

**“Orail downregulation: a missing link in understanding the prostate cancer apoptosis  
resistance”**

Flourakis M., Beck B, Lehen'kyi V., Roudbaraki M., Skryma R and Prevarskaya N.

Article soumis dans *Cancer Research*.

Il est connu que la vidange des stocks calciques réticulaires entraîne, au niveau de la membrane plasmique de la cellule, une entrée de  $Ca^{2+}$  suite à l'activation des canaux SOCs. Le rôle de ces canaux ne se limite pas au remplissage des réserves calciques intracellulaires. Plusieurs travaux montrent l'implication de ces canaux dans différents processus physiologiques. Des études menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence que cette entrée serait responsable de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes. Ainsi, les modifications survenant dans le processus d'apoptose lors de la transition des cellules tumorales de l'état d'androgéno-dépendant vers l'état androgéno-indépendant pourraient être liées à des perturbations de la signalisation calcique impliquant les SOCs.

Cependant à l'heure actuelle, la nature moléculaire des canaux SOC n'est pas connue. La découverte des protéines responsables de cette entrée s'avère primordiale dans la compréhension de la résistance à l'apoptose caractérisant les cellules androgéno-indépendantes.

Le but de l'article suivant est donc de découvrir la nature moléculaire de ces canaux SOCs et de l'implication potentielle de ces protéines dans la cancérogenèse prostatique.

# **Orai1 downregulation: a missing link in understanding the prostate cancer apoptosis resistance**

**Flourakis M.<sup>1</sup>, Beck B.<sup>1</sup>, Lehen'kyi V., Roudbaraki M., Skryma R.<sup>2</sup> and Prevarskaya N.<sup>2</sup>**

**Inserm, U-800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, F-59655 France; Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, F-59655 France.**

Running title: Orai1/CRAM1 in prostate cancer cells

Correspondence address : Natalia Prevarskaya, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Bâtiment SN3, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; Tel.: 33-3-20-43-4077; Fax: 33-3-20-43-4066; E-mail: [Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr](mailto:Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr)

<sup>1</sup>Contributed equally to this work

<sup>2</sup>Share senior authorship

Key words: Orai1/CRACM1, STIM1, Store Operated Calcium Entry, Apoptosis Resistance, androgen deprivation, prostate cancer.

**Abstract**

Prostate cancer (PCa) is one of the leading threats to men's health. During the early stage, when it depends on androgens for growth and survival androgen ablation therapy may be effective in causing tumors to regress, while, in the later, androgen-independent, stage there is currently no successful therapy. The progression to androgen independence is associated with the appearance of new cell phenotypes, characterized by a low apoptosis rate. It is, therefore, vital to understand what drives PCa to apoptosis resistance.

We have previously shown that apoptosis inhibition in androgen-independent PCa cells is associated with the downregulation of Store Operated Calcium Entry (SOCE), due to the decrease in the number of functional channels activated following endoplasmic reticulum calcium store depletion. However, the molecular nature of these channels, which play a major role in PCa cell apoptosis induction, has not yet been elucidated.

Here, we show that the recently-identified Orai1/CRACM1 protein is a store-operated calcium channel in androgen-dependent human prostate cancer (LNCaP) cells. The expression of Orai1/CRACM1 and the amplitude of store-operated current decreased dramatically in androgen-deprived cells. This downregulation of the Orai1/CRACM1 channels leads to the inhibition of sustained SOCE and, subsequently, to the decrease in apoptosis. Orai1/CRACM1 knockdown protects LNCaP cells from thapsigargin-induced apoptosis. Thus, our work demonstrates that Orai1/CRACM1 plays a pivotal role in prostate cancer progression to an apoptosis-resistant phenotype. Consequently, it is a potentially attractive target for therapeutic intervention. Furthermore, this study is the first to show the role of Orai1/CRACM1 in physiopathology outside the immune system.



## **Introduction**

Prostate cancer (PCa) remains the most common noncutaneous human malignancy and the second most lethal tumor among men, with the highest incidence in industrialized countries. Standard therapies for PCa include androgen ablation, which causes tumor regression by inhibiting proliferation and inducing apoptosis. However, under anti-androgen therapy, PCa progresses into an androgen-independent stage, causing cancer relapse with a more aggressive phenotype.

Current non-hormonal therapies are unable to completely eliminate the androgen-independent prostate cancer cells remaining after androgen ablation (1). Indeed, it is well established that androgen-independence is associated with tumor enrichment in cell phenotypes, with a key feature of apoptosis resistance rather than enhanced proliferation (2, 3). Despite a growing number of studies, the mechanisms leading to these phenotypes are still relatively unclear. Understanding the factors which drive PCa to apoptosis resistance may be vital for the development of new therapies for advanced prostate cancer.

It is well-established that intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), is a second messenger, which plays a major role in the induction and regulation of apoptosis. Indeed, a number of studies have shown that a large, sustained increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  can trigger apoptosis in cancer cells. This increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  is generally induced by capacitative or store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE), mediated by store-operated channels (SOCs) (4, 5). SOCs, located in the plasmalemma, are activated by endoplasmic reticulum (ER) store depletion.  $\text{Ca}^{2+}$  entry *via* SOCs induces a sustained increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, thus helping to replenish the ER. Therefore, when SOCs are activated, they regulate both cytosolic and ER intraluminal concentrations. For this reason, SOCs are increasingly attracting attention as potential apoptosis regulators (4). Moreover, we have previously shown that apoptosis inhibition in androgen-independent PCa cells was associated with the downregulation of SOCs, due to a

decrease in the number of functional channels (5). However, despite an intensive search for potential candidates and considerable progress in understanding SOCs, the molecular nature of the channels which play a major role in PCa cell apoptosis induction, thus contributing to the development of apoptosis resistance, remains unknown.

A new SOC channel gene was recently identified (6-8). The first study began on T cells from human patients with a severe combined immunodeficiency (SCID) syndrome, in which T-cell receptor engagement or store depletion failed to activate capacitative  $Ca^{2+}$  entry. Afterwards, a genome-wide RNAi screen in S2 cells identified a previously uncharacterized gene, named *Orai1* (6), or CRACM1(8). Orai1/CRACM1 is a widely expressed, 33 kDa plasma-membrane protein with a lack of significant sequence homology to other ion channels. Orai1/CRACM1 is activated following ER calcium store depletion by a mechanism involving the redistribution of ER calcium sensor, STIM1 (9, 10) in puncta at the ER – plasma membrane junction (11). It has been suggested that Orai1/CRACM1 and STIM1 interact, either directly or as members of a multi-protein complex (12). Nevertheless, very little is known about the physiological role and pathological implications of Orai1/CRACM1 outside the immune system. In particular, in spite of the evidence for the pivotal role of SOCs in the apoptosis resistance of PCa, Orai1/CRACM1 had never previously been studied in prostate cancer cells.

In this study, we show that Orai1/CRACM1 protein is a store-operated calcium channel in androgen-dependent human prostate cancer (LNCaP) cells. The expression of Orai1/CRACM1 and the amplitude of store-operated current decreased dramatically in androgen-deprived cells. This downregulation of the Orai1/CRACM1 channels led to the inhibition of sustained SOCE, a decrease in apoptosis and, according to our previous results, the appearance of apoptosis resistance. Orai1/CRACM1 knockdown protects LNCaP cells from thapsigargin-induced apoptosis. Thus, our work demonstrates that Orai1/CRACM1

plays a pivotal role in the progression of prostate cancer to an apoptosis-resistant phenotype, making this channel potentially attractive target for therapeutic interventions.

## **Material and methods**

### ***Electrophysiology and solutions***

Macroscopic currents were recorded in LNCaP cells, using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, as previously described (13).

The composition of the extracellular solution for patch-clamp recording was (in mM) 120 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 10 HEPES, pH 7.3 adjusted with TEA-OH, osmolarity 310 mOsm/kg adjusted with D-Mannitol. The pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM):120 Cs Methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA (1.2-bis(2-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'tetraacetic acid), 6 MgCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.2 with CsOH and osmolarity 295 mOsm/kg adjusted with D-Mannitol). The necessary supplements were added directly to the solutions from appropriate stock solutions. All the reagents, dissolved in water, ethanol or dimethylsulfoxide, were diluted to their final concentrations in the appropriate solutions and applied by a perfusion system. Data were accumulated from at least three experiments under each condition. All chemicals for were provided by Sigma.

### ***Western-blotting***

We used specific rabbit polyclonal anti-hStim1 (1:250, BD Transduction Laboratories) and mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co.) antibodies. The bands on the membrane were visualized using the enhanced chemiluminescence method (1:1000, Pierce Biotechnologies Inc.). Densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories). See (13) for details.

### ***RT-PCR***

RT-PCR experiments were performed as previously described (14) The PCR primers used to amplify hStim1, hOrai1, Orai2, Orai3 cDNAs, as well as those for  $\beta$ -actin, are

specified in Table 1.

***Apoptosis Assay***

The level of apoptosis was estimated from the number of apoptotic bodies revealed by Hoechst staining. The percentage of apoptotic cells was determined by counting at least 500 cells in random fields (the detailed procedure was described previously) (4).

***siRNA cell transfections***

LNCaP cells were transfected with 100 nM siRNA per well in a six-well plate, using JetSiEndo transfection reagent (Eurogentec, s.a.) in a final volume of 1.5 ml.

***Data analysis:***

For each type of experiment, data were accumulated from at least three measurements. The data were analyzed using Origin 7.0 software (Microcal, Northampton, MA). Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, where appropriate. Student's T-test was used for statistical comparison of the differences and  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results / Discussion

### *Orai1 is downregulated in androgen-deprived prostate cancer cells*

SOC activation occurs after any procedure inducing depletion of ER, including (i) active ER store depletion by IP<sub>3</sub> and (ii) passive store depletion by Ca<sup>2+</sup> chelators, such as EGTA. The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to compare the amplitude of SOC current (I<sub>SOC</sub>) in LNCaP cells and LNCaP cells cultured in androgen-deprived (AD) medium for 4 days. Fig1 shows that, in AD cells, I<sub>SOC</sub> induced either by IP<sub>3</sub> (Fig.1A) or EGTA (Fig.1B) decreased by approximately 50%. In our previous study (5), we demonstrated that the I<sub>SOC</sub> decrease in androgen-independent cells was due to a decrease in the number of functional channels on plasma membrane. We therefore investigated the molecular nature of SOC in LNCaP cells, as well as changes in their expression in AD human prostate cancer cells.

RT-PCR was first used to check for Orai channel expression in LNCaP cells, then to compare Orai1 expression levels with those in LNCaP-AD cells (Fig1C). Orai1 expression in AD cells decreased by about 50% (Fig.1D), which was consistent with the magnitude of the drop in I<sub>SOC</sub>. Expression of TRPC1, a protein in the Transient Receptor Potential channel family, which was previously shown to be involved in SOC current in LNCaP cells (15), remained unchanged in LNCaP-AD cells (Fig. 1C,D). It is important to note that the inhibition of SOC current in LNCaP-AD cells was not explained by the downregulation of TRPV6, the constitutively open calcium channel in LNCaP cells, since our recent data (14) clearly showed that androgen deprivation did not reduce TRPV6 expression.

### *Role of STIM1 in epithelial prostate cancer cells*

Since Orai1/CRACM1 colocalizes with STIM1, an ER calcium sensor, at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and needs STIM1 translocation into punctuate structures for its activation (11), we studied the potential involvement of STIM1 in SOC

current in LNCaP cells and investigated changes in STIM1 expression in LNCaP-AD cells. For this purpose, we used siRNA against STIM1. A 3-day treatment with siRNA against STIM1 specifically decreased protein expression (Fig.2A) by approximately 80%. STIM1 knockdown inhibited both IP<sub>3</sub>- (Fig.2A) and EGTA- (Fig.2B) evoked I<sub>SOC</sub> by 80.5±8.4% and 83.5±4.2%, respectively. Thus, as expected, STIM1 was involved in SOC activation of LNCaP cells. RT-PCR was used to check STIM1 expression in androgen-deprived cells. Fig 1C shows that STIM1 expression was not altered by androgen deprivation, suggesting that the inhibition of I<sub>SOC</sub> in LNCaP-AD cells was not due to the decrease in STIM1 expression. Thus, we hypothesized that apoptosis resistance in prostate cancer cells due to the I<sub>SOC</sub> decrease in AD cells was explained, at least in part, by Orai1/CRACM1 downregulation.

***Orai1/CRACM1-related decrease in SOCE protected LNCaP cells from Ca<sup>2+</sup> induced apoptosis***

Inhibition of Orai1/CRACM1 expression by siRNA strategy strongly decreased both IP<sub>3</sub>- and EGTA- (Fig.2C and D) evoked I<sub>SOC</sub> (75.4±7.5% and 77.8±11.3%, respectively). This demonstrated, for the first time, that Orai1/CRACM1 played a major role in I<sub>SOC</sub> in epithelial prostate cancer cells.

We had previously shown that the neuroendocrine differentiation induced by the androgen-deprivation known to occur during prostate cancer progression was associated with protection from apoptosis (5). The acquisition of this apoptosis resistance phenotype was partly due to the loss of functional SOC. In view of the major role of Orai1/CRACM1 in SOCE and the decrease in its expression in AD prostate cancer cells, we then studied the involvement of Orai1 in apoptosis. We therefore investigated the consequences of Orai1 knockdown on apoptosis induced by the thapsigargin (TG), a classic Ca<sup>2+</sup>-dependent

apoptosis inducer. TG triggers two calcium mechanisms: (i) ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion and (ii) SOC mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (the major component of  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked apoptosis). Furthermore, the use of TG as a “smart bomb” to target androgen-independent prostate cancer has recently been proposed (16). Using Hoechst nuclear staining (Fig.3A), we observed that a 24-hour TG treatment induced apoptosis in  $55\pm 15\%$  of the epithelial prostate cells. However, LNCaP cells pre-treated with Orai1/CRACM1 siRNA were much less sensitive to the TG proapoptotic effect. Indeed, only  $15\pm 7\%$  of these cells underwent apoptosis in response to TG (Fig.3B), suggesting that Orai1/CRACM1 is a key actor in programmed cell death. In contrast, Orai1/CRACM1 downregulation inhibited sustained cytosolic calcium increase and protected cancer cells from apoptosis.

Thus, as shown in figure 3C, the results of this study strongly suggest that Orai1 plays an important role in the progression of prostate cancer to more aggressive, androgen-independent, apoptosis-resistant phenotypes. However, further studies are needed to understand the mechanism controlling Orai1/CRACM1 expression in epithelial prostate cells and the reason for Orai1 downregulation in apoptosis-resistant cells. Since androgens have been reported to play an essential role in prostate carcinogenesis and Orai1/CRACM1 expression is decreased in androgen-deprived cells, one hypothesis is that Orai1/CRACM1 expression could be regulated by the androgen receptor. In this case, androgen receptor deregulation during PCa progression would be expected to influence the physiological function of Orai1/CRACM1.

In conclusion, our data suggest that Orai1/CRACM1 may potentially determine specific “calcium signatures” critical for such  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent processes as proliferation (17, 18) and apoptosis (5, 19). Indeed, since Orai1/CRACM1 is a molecular entity capable of influencing the filling of ER stores, its activity may be considered a significant factor in controlling the growth of advanced PCa cells. All this makes Orai1/CRACM1 a potentially attractive target



for therapeutic intervention against prostate cancer. These results provide novel insight into the mechanisms involved in prostate carcinogenesis and are expected to have a significant impact on future research.

## Figure legends

### **Figure 1: *Orai1* is downregulated in androgen-deprived epithelial prostate cancer cells.**

Time courses of  $I_{SOCE}$  development measured at -100 mV holding potential in response to dialysis of 100  $\mu$ M  $IP_3$  (**A**) or EGTA 5mM (**B**) in control LNCaP cells (black circles) and in androgen deprived LNCaP cells (white squares). Histograms summarizing the  $IP_3$  or EGTA activated  $I_{SOCE}$  current density in control prostate cancer cells (LNCaP) or in androgen deprived LNCaP cells (LNCaP-AD) (respectively black or white columns) are represented as insets. **C.** RT-PCR experiment showing *Orai1*, TRPC1 and  $\beta$ -actin expression in LNCaP and LNCaP-AD cells. **D.** Histogram summarizing the variation of TRPC1, *Orai1* and  $\beta$ -actin mRNA expression in LNCaP (black columns) and LNCaP-AD cells (white columns).

### **Figure 2: *Orai1/CRAM1* and *STIM1* are major components of SOCE in epithelial prostate cancer cells.**

Time courses of  $I_{SOCE}$  development measured at -100 mV holding potential in response to dialysis of 100  $\mu$ M  $IP_3$  (**A,C**) or EGTA 5mM (**B,D**). Cells were pretreated by a control siRNA (**A,C**) (si-Con, white circles), by a siRNA against hSTIM1 (**B**) (si-STIM1, black circles), or by a siRNA against hOrai1 (**D**) (si-Orai1, black circles). Inset A Western-Blot experiment representing hSTIM1 and  $\beta$ -actin protein expression depending on a treatment with a control siRNA (CT) or with hSTIM1 siRNA for 48, 72 or 96 hours. Values represent the relative amount of hSTIM1 compared to  $\beta$ -actin protein. Inset B shows a histogram summarizing the  $IP_3$  or EGTA activated  $I_{SOCE}$  current density in control (white columns) or in hSTIM1 siRNA (black columns). Inset C shows RT-PCR experiment representing hOrai1 and  $\beta$ -actin mRNA expression depending on a treatment with a control siRNA (CT) or with hOrai1 siRNA (siOrai1, 100nM) for 48, 72 or 96 hours is represented as an insert. Inset D shows a histogram summarizing the  $IP_3$  or EGTA activated  $I_{SOCE}$  current density in control (white columns) or in hOrai1 siRNA (black columns).

**Figure 3: Downexpression of Orai1 protects LNCaP cells against  $Ca^{2+}$  induced apoptosis.**

**A.** Illustration of the typical apoptotic features with the Hoechst technique in each condition. (up left image: si Con -Tg, up right image si Con +Tg 1 $\mu$ M, down left siOrai1 - Tg, down right : siOrai1+ Tg 1 $\mu$ M). **B.** A histogram summarizing the percent of apoptosis, in control cells (grey columns) or in cells treated for 24 hours with thapsigargin (Tg, 1 $\mu$ M) cells (black columns). This experiment was performed either in cells pretreated for 2 days with control siRNA (si-Con) or in cells pretreated with siRNA targetting Orai1 mRNA (si-Orai1). **C.** The progression to androgen independence is associated with the appearance of new cell phenotypes, characterized by a decrease in SOCE due to the downexpression of Orai1/CRACM1. As we have already demonstrated, this process is responsible for the apoptosis resistance of androgen independent prostate cancer cells. Knocking-down Orai1/CRACM1 expression in androgen dependent prostate cancer cells leads to the downregulation of SOCE and thus to the appearance of apoptosis resistance.

## References.

1. Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., Oudard, S., Theodore, C., James, N. D., Turesson, I., Rosenthal, M. A., and Eisenberger, M. A. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*, *351*: 1502-1512, 2004.
2. Fixemer, T., Remberger, K., and Bonkhoff, H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate*, *53*: 118-123, 2002.
3. Raffo, A. J., Perlman, H., Chen, M. W., Day, M. L., Streitman, J. S., and Buttyan, R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res*, *55*: 4438-4445, 1995.
4. Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X. L., Coppenolle, F. V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B., and Prevarskaya, N. Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol*, *527 Pt 1*: 71-83, 2000.
5. Vanoverberghe, K., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Lepage, G., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ*, *11*: 321-330, 2004.
6. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, *441*: 179-185, 2006.
7. Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J. P., and Penner, R. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol*, *16*: 2073-2079, 2006.
8. 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. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science*, *312*: 1220-1223, 2006.
9. Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., and Meyer, T. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol*, *15*: 1235-1241, 2005.
10. Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., and Stauderman, K. A. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol*, *169*: 435-445, 2005.
11. Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature*, *437*: 902-905, 2005.
12. Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M. D. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orail. *Nature*, *443*: 226-229, 2006.
13. Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R., and Prevarskaya, N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *Faseb J*, *20*: 1215-1217, 2006.
14. Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., and Prevarskaya, N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways.

- Oncogene, 2007.
15. Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J. B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. Two types of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem*, 279: 30326-30337, 2004.
  16. Denmeade, S. R. and Isaacs, J. T. The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol Ther*, 4: 14-22, 2005.
  17. Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R., and Prevarskaya, N. Differential role of transient receptor potential channels in  $\text{Ca}^{2+}$  entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res*, 66: 2038-2047, 2006.
  18. Thebault, S., Roudbaraki, M., Sydorenko, V., Shuba, Y., Lemonnier, L., Slomianny, C., Dewailly, E., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Skryma, R., and Prevarskaya, N.  $\alpha 1$ -adrenergic receptors activate  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest*, 113: 1691-1701, 2003.
  19. Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F., and Prevarskaya, N. Bcl-2-dependent modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell*, 1: 169-179, 2002.

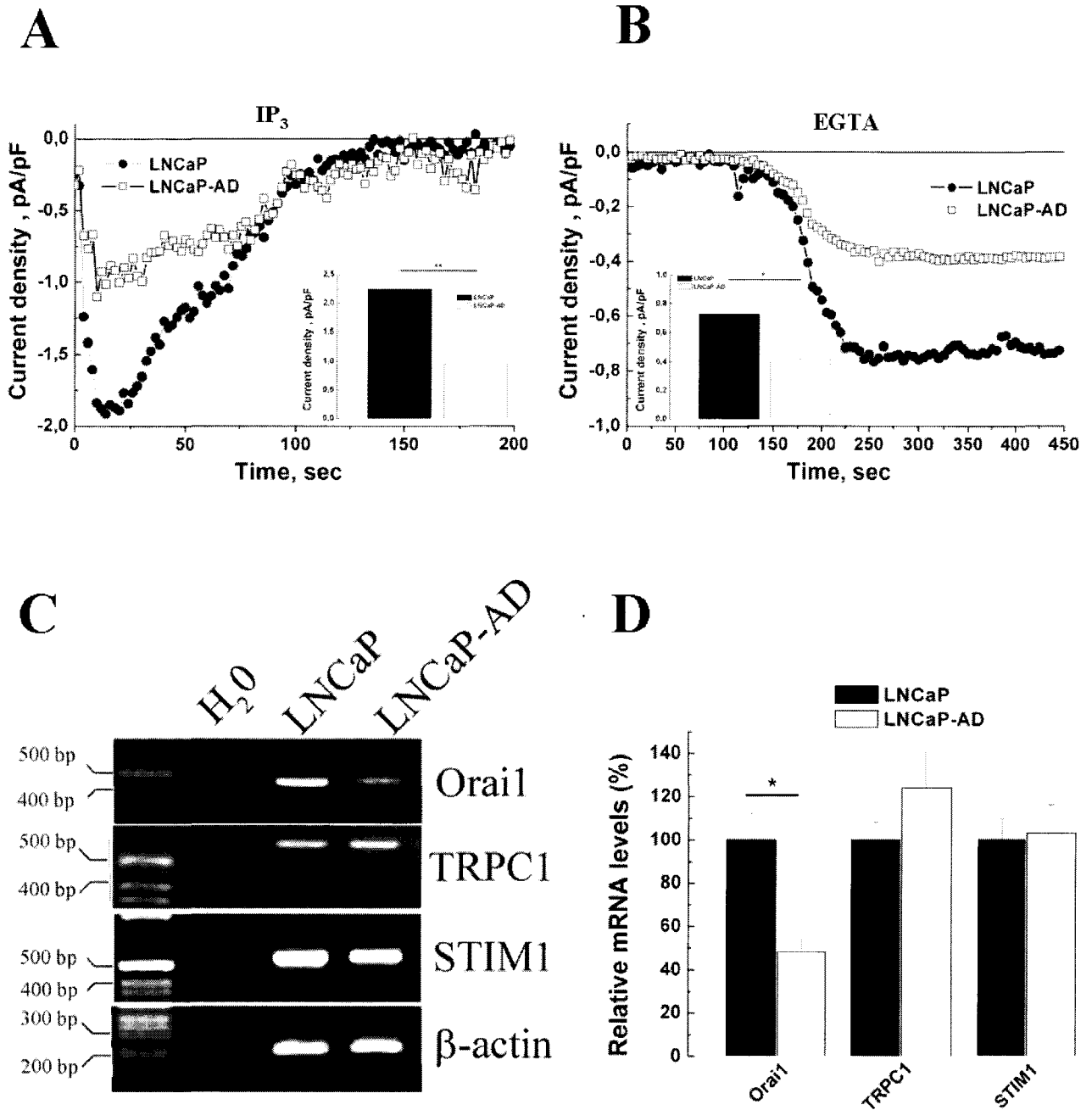


Figure 1.

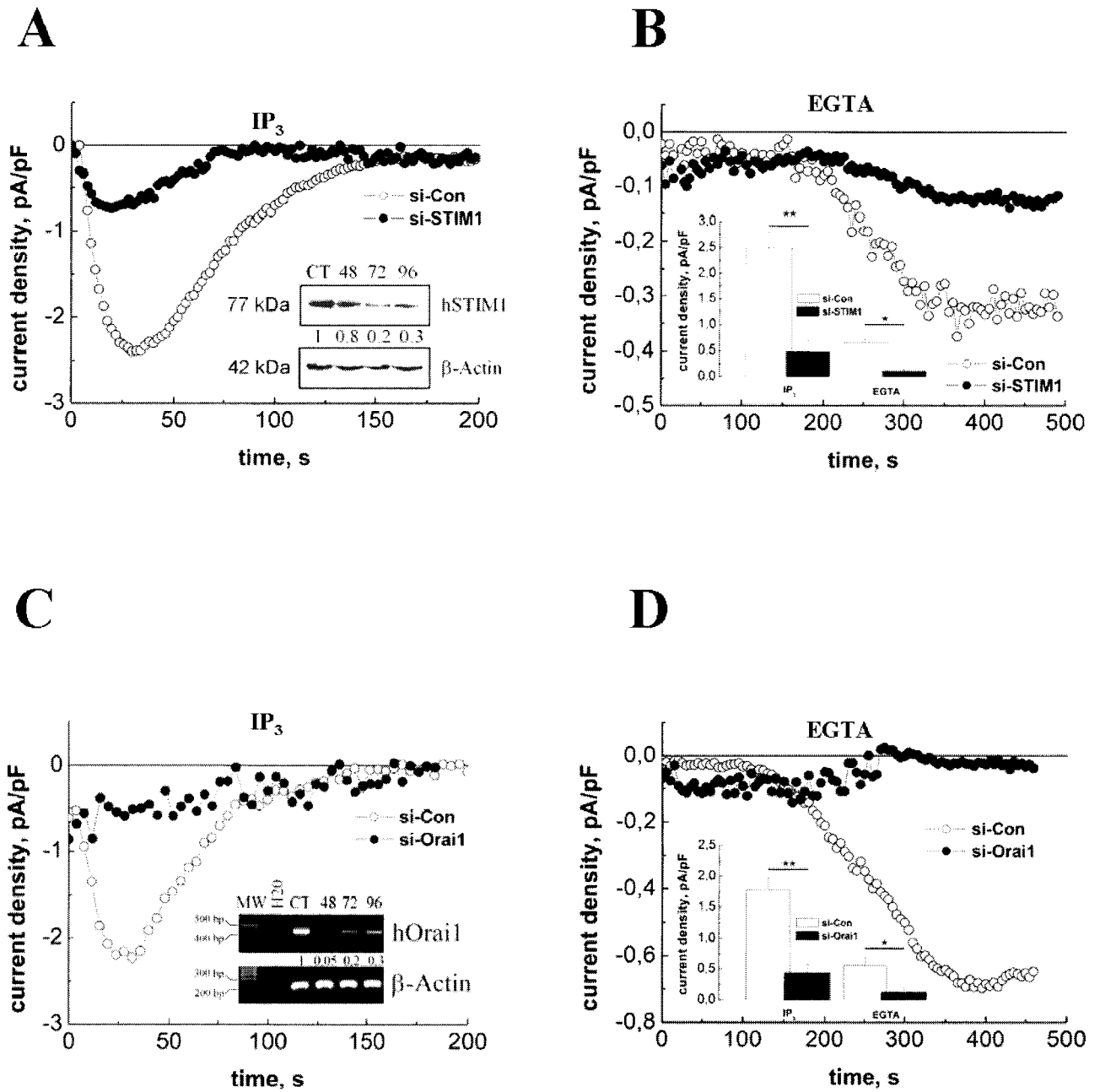


Figure 2.

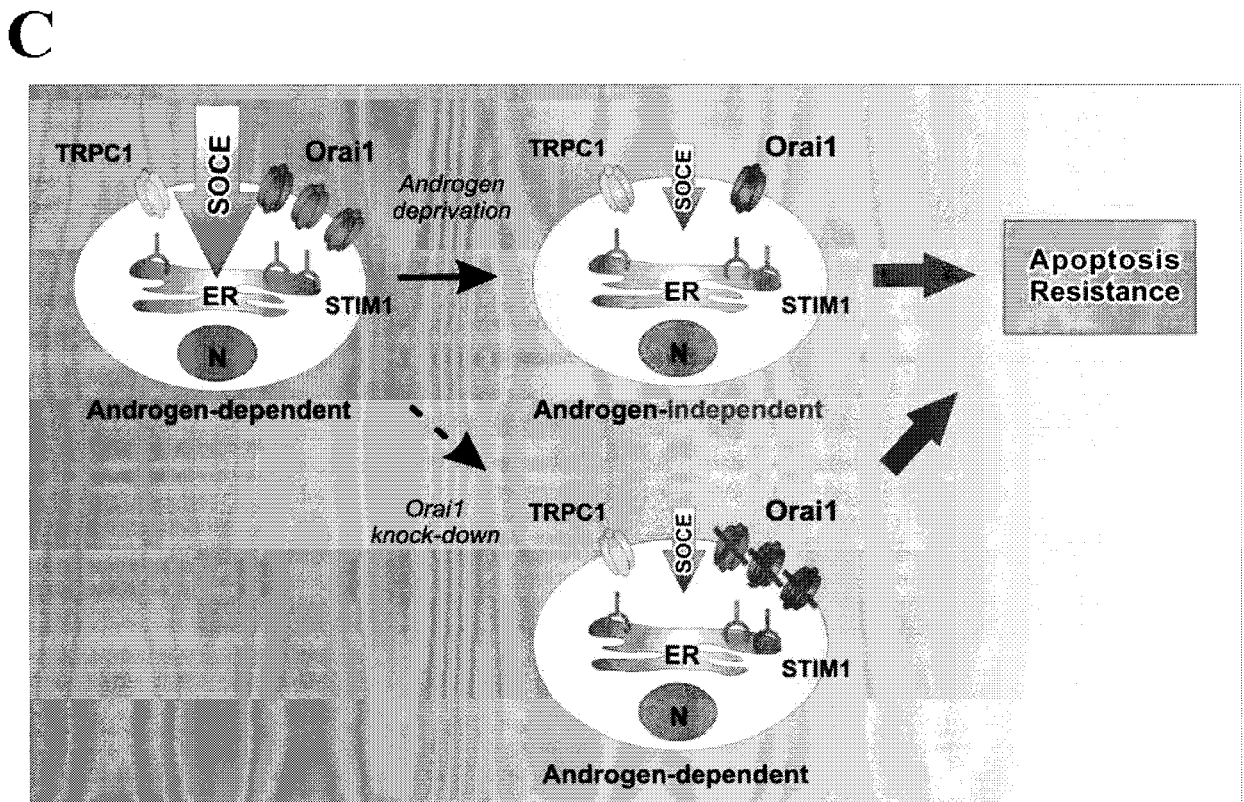
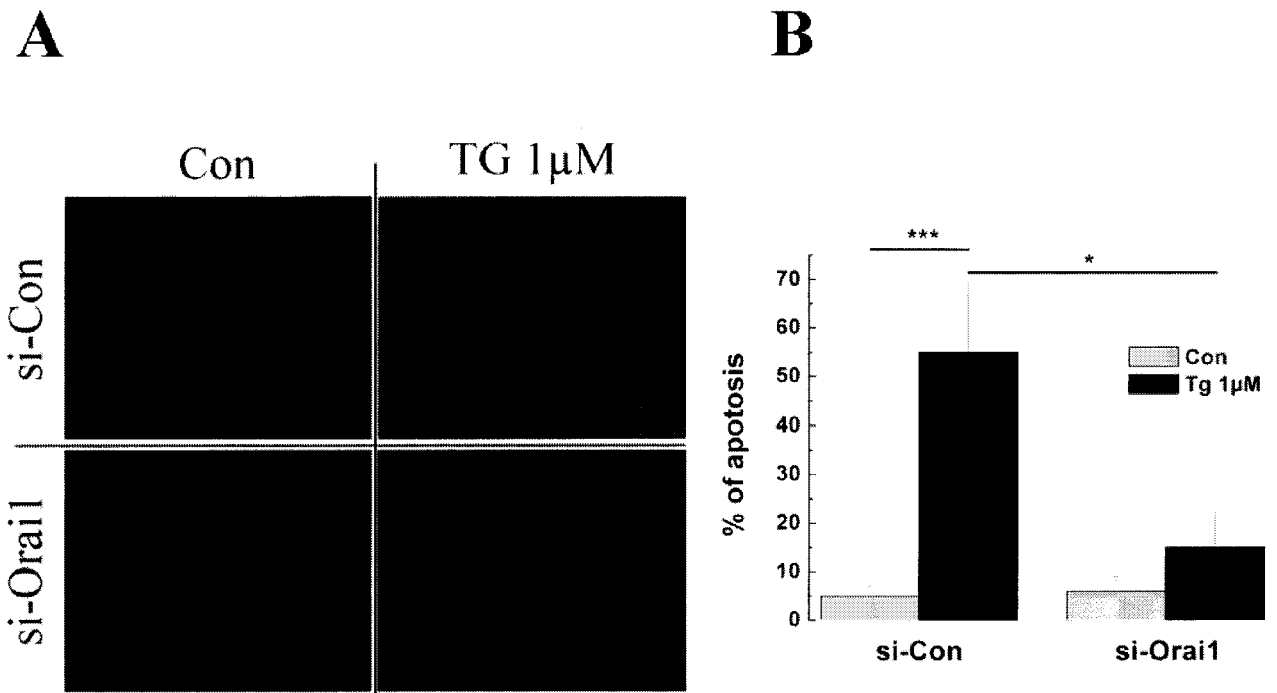


Figure 3.



**Table I**  
**Primers and siRNA**

No	Name (Accession No)	Forward (5'-...-3')	Backward (5'-...-3')	Expected Size (b.p)
1.	hTRPC1 (NM_003304)	TTCCTCTCCATCCTCTTCCICG	GCTCTCAGAATIGGATCCTCCTC	548
2.	hSTIM1 (NM_003156)	GCGGGAGGGTACTGAG	TCCATGTCATCCACGTCGTC	533
3.	hOrai1 (NM_032790)	CTTCAGTGCCTGCACCACAG	CCTGGAAGTTCGGTCAGTC	450
4.	$\beta$ -Actin (NM_001101)	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	209
5.	hOrai1 siRNA	5'-UGAGCAACGUGCACAAUCU(dTdT)-3'		
6.	hSTIM1 siRNA	5'-GGCUCUGGAUACAGUGCUC (dTdT)-3'		

## **Conclusion.**

Dans cet article, nous avons démontré que Orai1/CRACM1 est responsable de l'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$  des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP. L'expression de Orai1 ainsi que l'amplitude du courant SOC qu'elle porte diminue de façon significative lors de l'évolution des cellules vers l'androgéno-indépendance. Cette diminution d'expression entraîne une baisse de l'ECC et par conséquent induit une diminution du taux d'apoptose  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante de ces cellules. L'inhibition d'expression d'Orai1 par des siRNA protège les cellules LNCaP contre l'apoptose induite par la thapsigargine. De plus, on observe que dans les cellules androgéno-dépendantes, l'inhibition de l'expression d'Orai1 mime parfaitement cette résistance à l'apoptose  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante des cellules androgéno-indépendantes.

Ainsi, ce travail démontre un rôle central de Orai dans l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques. Sa perte d'expression, lors la progression du cancer de la prostate vers des stades plus agressifs, est donc un événement crucial. Orai1 semble donc être une cible thérapeutique très intéressante pour traiter les cancers prostatiques dans les stades précoces de la maladie.

### III.B) Article 6

#### **« TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways »**

Lehen'kyi V., Flourakis M., Skryma R and Prevarskaya N.

Oncogene (2007) 1-6 (inserm-00139720)

Depuis plusieurs années, l'étude du rôle du Ca<sup>2+</sup> dans le cancer de la prostate s'est focalisé sur l'étude de nouveaux canaux pouvant être dérégulés lors de cette pathologie. C'est notamment le cas pour le canal TRPV6 (TRP Vanilloid membre 6). Ce canal à forte sélectivité pour le Ca<sup>2+</sup> est fortement surexprimé dans les cancers de la prostate. Contrairement au canal TRPM8, son expression augmente pour les cancers les plus agressifs.

Des études réalisées dans le laboratoire indiquent que TRPV6 participe à l'homéostasie calcique intracellulaire en permettant une entrée massive de Ca<sup>2+</sup> à partir du milieu extracellulaire dans les cellules cancéreuses prostatiques. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a permis d'élucider pourquoi TRPV6 est surexprimé dans le cancer de la prostate et quel est le rôle de cette entrée de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules cancéreuses prostatiques.



## SHORT COMMUNICATION

## TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via $\text{Ca}^{2+}$ /NFAT-dependent pathways

V Lehen'kyi<sup>1,2</sup>, M Flourakis<sup>1,2</sup>, R Skryma<sup>1,2,3</sup> and N Prevarskaya<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U-800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France and <sup>2</sup>Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France

The transient receptor potential channel, subfamily V, member 6 (TRPV6), is strongly expressed in advanced prostate cancer and significantly correlates with the Gleason >7 grading, being undetectable in healthy and benign prostate tissues. However, the role of TRPV6 as a highly  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channel in prostate carcinogenesis remains poorly understood. Here, we report that TRPV6 is directly involved in the control of prostate cancer cell (LNCaP cell line) proliferation by decreasing: (i) proliferation rate; (ii) cell accumulation in the S-phase of cell cycle and (iii) proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression. We demonstrate that the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into LNCaP cells is mediated by TRPV6, with the subsequent downstream activation of the nuclear factor of activated T-cell transcription factor (NFAT). TRPV6-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is also involved in apoptosis resistance of LNCaP cells. Our results suggest that TRPV6 expression in LNCaP cells is regulated by androgen receptor, however, in a ligand-independent manner. We conclude that the upregulation of TRPV6  $\text{Ca}^{2+}$  channel in prostate cancer cells may represent a mechanism for maintaining a higher proliferation rate, increasing cell survival and apoptosis resistance as well.

*Oncogene* advance online publication, 28 May 2007; doi:10.1038/sj.onc.1210545

**Keywords:** prostate cancer; TRPV6;  $\text{Ca}^{2+}$  uptake; NFAT; proliferation; LNCaP cells

Prostate cancer remains the most common noncutaneous human malignancy and the second most lethal tumor among men with the highest incidence in industrialized countries (Cooperberg *et al.*, 2005). Androgen receptor (AR) and cognate ligands regulate vital aspects of prostate cell growth and functions, including proliferation, differentiation, apoptosis and secretion (Burnstein, 2005). The AR pathway also influences prostate pathological processes, such as benign prostatic hyperplasia and carcinogenesis. Standard therapies for prostate

cancer include androgen ablation, which causes tumor regression. However, under anti-androgen therapy, prostate cancer and metastases progress into an androgen-independent stage, causing cancer relapse with a more aggressive phenotype. Therefore, it is critical to understand the mechanisms involved in prostate cancer progression to develop reliable prognostic markers and define new treatment strategies.

It has been previously suggested that intracellular calcium is a second messenger playing a major role in the control of cell proliferation, differentiation and apoptosis. Indeed, alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis increase proliferation (Legrand *et al.*, 2001; Thebault *et al.*, 2006), as well as induce differentiation (Vanoverbergh *et al.*, 2004) and apoptosis (Skryma *et al.*, 2000; Vanden Abeele *et al.*, 2002, 2003). According to a growing number of articles, cationic channels of the TRP (transient receptor potential) family are key players in calcium homeostasis and cell physiopathology (Montell *et al.*, 2002). In recent years, TRPV6 (TRP, Vanilloid member 6), a highly  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channel, has emerged as a promising prognosis marker. TRPV6 is strongly expressed in advanced prostate cancer and significantly correlates with the Gleason >7 grading, making it a strong marker of tumor progression and subsequent invasion into healthy tissues (Fixemer *et al.*, 2003; Wissenbach *et al.*, 2004). Previous studies have shown that TRPV6 is involved in highly calcium-selective currents in prostate cells, and that it is tightly regulated by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Schindl *et al.*, 2002; Bodding and Flockerzi, 2004; Vanden Abeele *et al.*, 2004). However, the precise role of  $\text{Ca}^{2+}$  entry via TRPV6 in prostate physiopathology remains illusive. Furthermore, reports on its regulation by androgen are contradictory (Peng *et al.*, 2001).

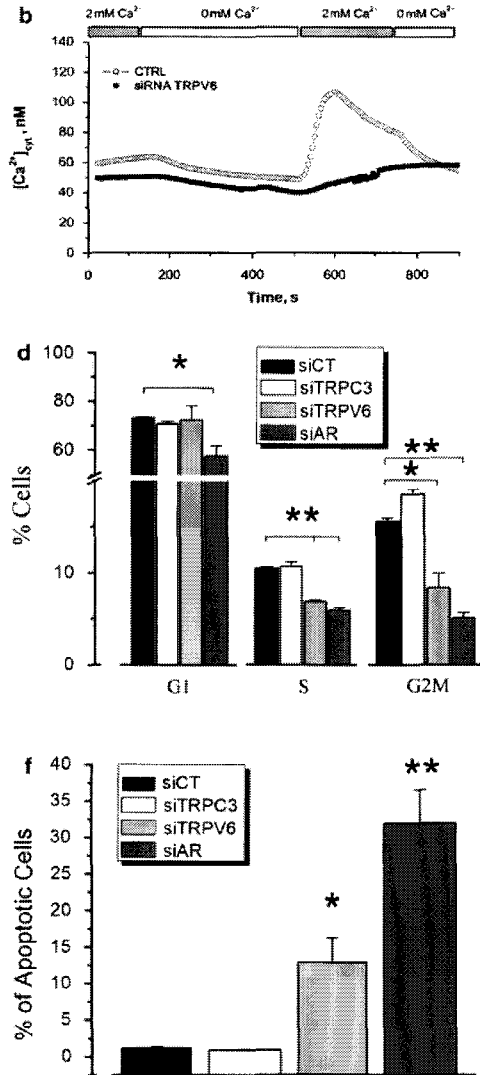
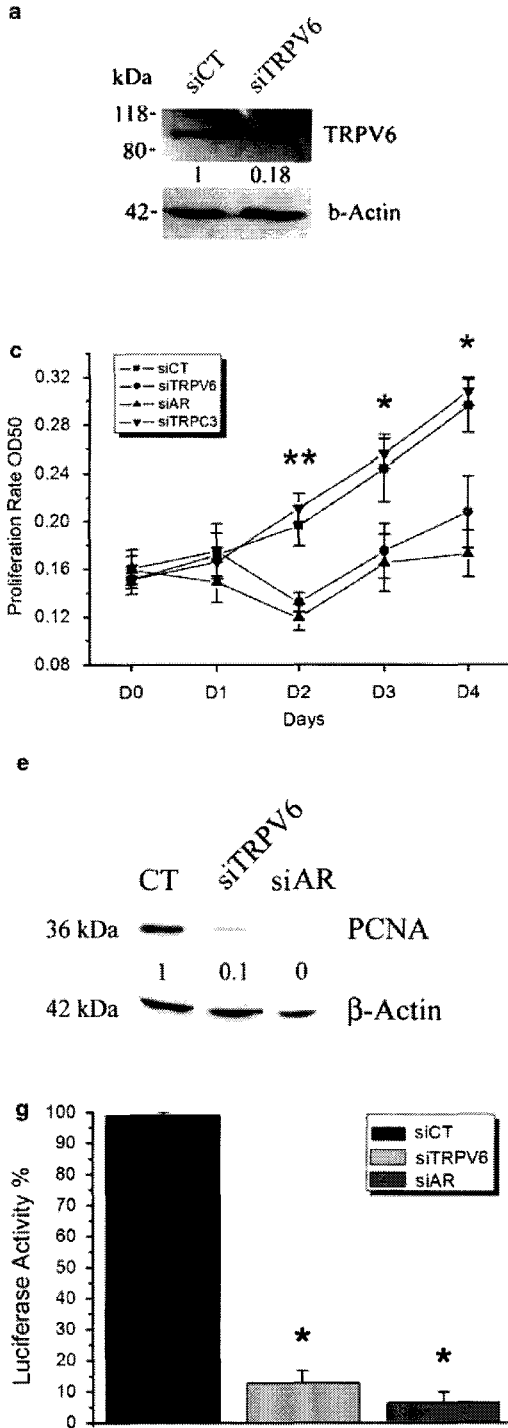
We initially studied TRPV6 protein expression in the LNCaP human prostate cancer cell line. Figure 1a shows detection of the expected 84 kDa TRPV6 protein. TRPV6 expression level decreased significantly after 4 days small interfering RNA (siRNA) transfection. In order to study the relative contribution of TRPV6, as a highly  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channel, to  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in LNCaP cells, we measured  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in LNCaP cells after subsequent changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ . In control cells, variations in  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  produced significant changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figure 1b). siRNA-TRPV6 knockdown decreased the

Correspondence: Professor N Prevarskaya, Laboratory of Cell Physiology, INSERM U800, Bat SN3, USTL, 59650 Villeneuve d'Ascq, France.

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

<sup>3</sup>These authors shared senior authorship.

Received 6 October 2006; revised 13 April 2007; accepted 19 April 2007



amplitude of the 2 mM  $[Ca^{2+}]_o$ -evoked  $[Ca^{2+}]_i$  increase. These data strongly suggest that TRPV6 is constitutively open and mediates  $Ca^{2+}$  uptake in LNCaP cells. Recent research has demonstrated that transfecting human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells with TRPV6 increases the  $Ca^{2+}$ -dependent cell proliferation rate, but the role of endogenous TRPV6 in prostate cancer cell growth control remains unknown (Schwarz *et al.*, 2006). It was, therefore, interesting to study the potential involvement of TRPV6 in LNCaP cell growth in greater depth. The number of viable proliferating cells, measured by (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) (MTS) assay, decreased significantly following TRPV6 knock-down from day 2 to 4 after transfection (D0) (Figure 1c). siRNA against AR, known to be crucial for prostate growth and development (Burnstein, 2005), was used as a positive control. We also performed a cell-cycle assay with propidium iodide staining to clarify TRPV6 knockdown effects on the cell-cycle phase distribution of LNCaP cells (Figure 1d). Indeed, siRNA-TRPV6 decreased the number of cells entering the S-phase (siRNA-AR, used as positive control, evoked the same decrease). To demonstrate the specificity of the studied effects ascribed to TRPV6, we performed the silencing of the other TRP channel in the plasma membrane, TRPC3, which had no significant effects on both cell proliferation and cell cycle (Figures 1c, d and f). Also, we monitored the protein level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Figure 1e shows one order decrease in PCNA level following siRNA-TRPV6 treatment, being almost undetectable in siRNA-AR-treated cells. It was previously shown that human primary prostate cancer epithelial cell proliferation was promoted by

store-independent  $Ca^{2+}$  entry and subsequent activation of nuclear factor of activated T-cell (NFAT) transcription factor (Thebault *et al.*, 2006). Interestingly, co-transfecting LNCaP cells with siRNA-TRPV6 and pNFAT-Luciferase plasmid revealed that TRPV6-induced  $Ca^{2+}$  entry contributed considerably to activating the promoter of  $Ca^{2+}$ -dependent NFAT transcription factor (Figure 1g), known to be involved in  $Ca^{2+}$ -dependent cell proliferation (Lipskaia and Lompre, 2004). Thus, TRPV6 is most probably involved in LNCaP cell proliferation by mediating  $Ca^{2+}$  entry, followed by the activation of  $Ca^{2+}$ -dependent NFAT transcription factor-mediated signaling pathways.

It is also well established that  $[Ca^{2+}]_i$  increase favors cell proliferation, whereas sustained  $[Ca^{2+}]_i$  increase, with the subsequent mitochondrial overload, has proapoptotic potential (for review see: Prevarskaya *et al.*, 2004). In this study, we investigated whether  $Ca^{2+}$  entry via TRPV6 was proapoptotic or antiapoptotic in cancer cells. A cell-cycle assay measured the number of apoptotic cells as a subG<sub>1</sub> population. siRNA-TRPV6 pretreatment significantly increased the number of apoptotic cells (~15%) as compared with ~35% induced by siRNA-AR (Figure 1f). Thus, our data indicate that TRPV6 expression promotes apoptosis resistance in the LNCaP cell line.

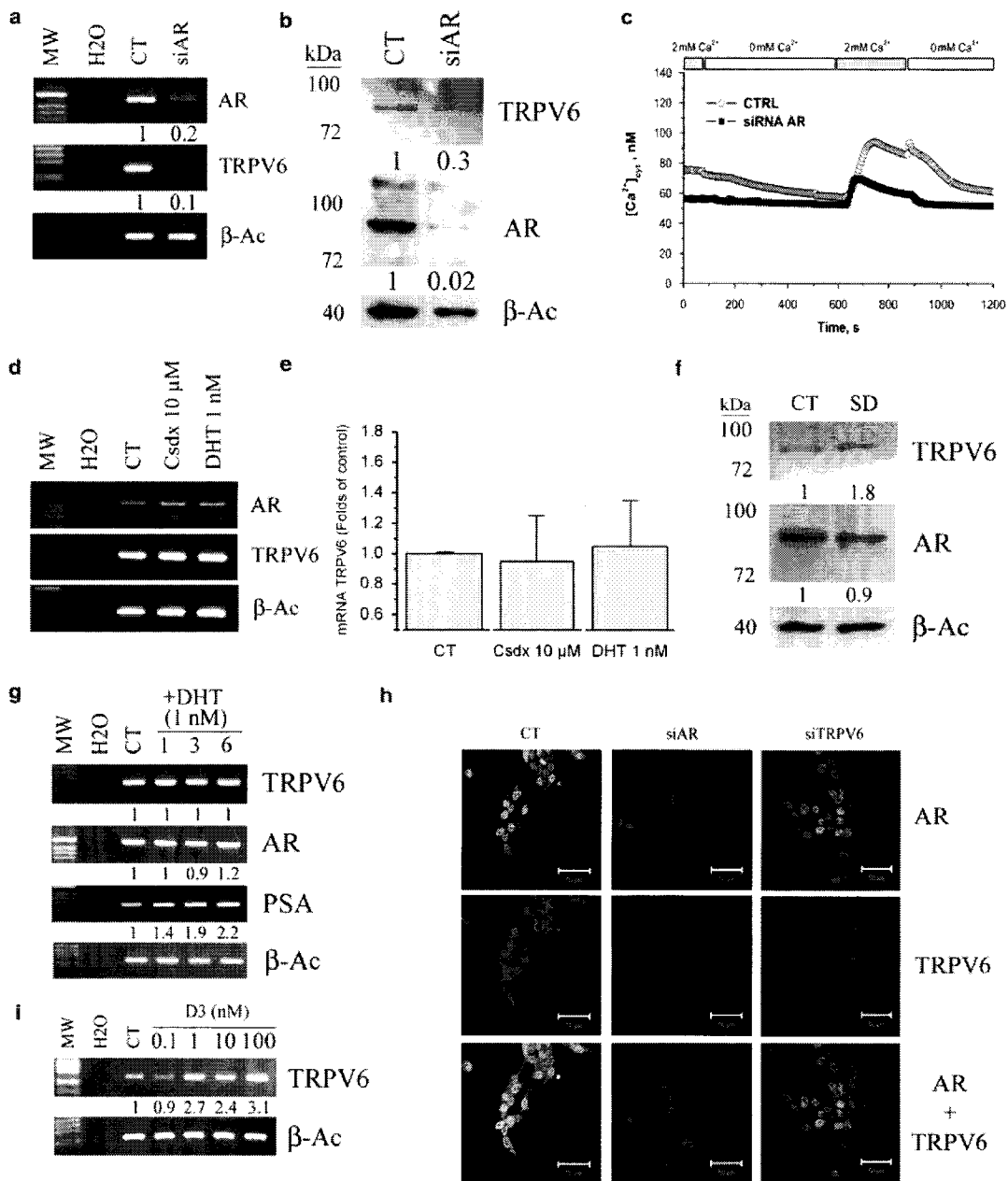
Therefore,  $Ca^{2+}$  entry via TRPV6 may not only be a mechanism for maintaining a high proliferation rate but also for increasing cell survival and inducing apoptosis resistance.

As, on the one hand, TRPV6 has previously been shown to be overexpressed in high-grade prostate cancer (Fixemer *et al.*, 2003; Wissenbach *et al.*, 2004), and on the other hand, prostate cancer development is

**Figure 1**  $Ca^{2+}$  via TRPV6 is involved in LNCaP cell proliferation. (a) A representative western blot of TRPV6 was performed on LNCaP cells as compared to  $\beta$ -actin. LNCaP cells were lysed and the lysates were centrifuged at 15 000 g and 4°C for 20 min, mixed with Laemmli buffer and boiled at 95°C for 5 min. Total protein samples were subjected to 8% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry Western blotting (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France). The membrane was probed using rabbit polyclonal anti-TRPV6 (Alomone Labs Ltd, Jerusalem, Israel, 1/200) and anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co., Fremont, CA, USA, 1/1000) antibodies followed by secondary antibodies. The bands on the membrane were displayed using enhanced chemiluminescence method (Pierce Biotechnologies Inc., Rockford, IL, USA). Densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories). (b) The effects of TRPV6 inhibition on  $Ca^{2+}$  entry into LNCaP cells. LNCaP cells were plated onto glass coverslips and transfected with functional noncoding siRNA#1 as a control and siRNA-TRPV6. Cells were loaded with 4  $\mu$ M Fura-2 AM in the growth medium at room temperature for 45 min.  $[Ca^{2+}]_i$  was measured after subsequent  $[Ca^{2+}]_o$  switches, as indicated;  $n = 150$  cells for each condition. (c) Cell proliferation of LNCaP cells measured using the CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (Promega, Charbonnier, France). LNCaP cells were plated in 96-well plate and transfected using 'Gene porter 2' (Gene Therapy Systems Inc., San Diego, CA, USA) reagents, with a functional noncoding siRNA#1 (Dharmacon Research Inc., Chicago, IL, USA) as a control, siRNA-TRPV6 (siTRPV6 (5'-CCUGCUGCAGCAGAAGAGGTT-3'), 200 nM, transfected at D0), siRNA-TRPC3 (siTRPC3 (5'-UGAUGUGGUCUGAAUGUAA(dTdT)-3'), 200 nM, transfected at D0) and siRNA-AR (siAR (5'-GACUCAGUCGCCCAUCCATT-3'), 200 nM, transfected at D0) as a positive control. Asterisks denote statistical significance as compared to control cells; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 4$ . (d) A cell-cycle distribution of LNCaP cells treated as above, carried out by flow cytometry of the cells stained with propidium iodide and analysed within 2 h on a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Asterisks denote statistical significance as compared to control cells; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ . (e) A western blot of PCNA. The membrane was probed using mouse monoclonal anti-PCNA (Santa-Cruz, 1/1000) and anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co., 1/1000) antibodies, followed by secondary antibodies;  $n = 3$ . (f) An apoptosis assay carried out by flow cytometry, as described above, on a subG<sub>1</sub> population of LNCaP cells. Asterisks denote statistical significance; \* $P < 0.01$  vs control, \*\* $P < 0.01$  vs siTRPV6 treatment;  $n = 3$ . (g)  $Ca^{2+}$  entry via TRPV6 is involved in the activation of  $Ca^{2+}$ -dependent transcriptional factor, NFAT. Cells were co-transfected with a functional noncoding siRNA#1 and pNFAT-Luciferase vector (Promega), pNFAT-Luciferase vector and siTRPV6 and siAR, respectively. In addition, all the cells were pre-transfected with  $\beta$ -galactosidase reporter vector (Promega) to normalize the results. The comparative histogram shows the effects of TRPV6 on NFAT signaling; \* $P < 0.01$  vs control (CT) + vector;  $n = 3$ . AR, androgen receptor; NFAT, nuclear factor of activated T-cell; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TRPV6, transient receptor potential channel, subfamily V, member 6.

androgen dependent (Burnstein, 2005), we investigated whether *trpv6* gene regulation was under AR control. Three approaches were used to study TRPV6 regulation by androgen in the LNCaP human cancerous androgen-responsive cell line: (i) siRNA-AR, (ii) AR-selective ligand dihydrotestosterone (DHT, 1 nM) and (iii) AR-selective antagonist Casodex (10 μM). These approaches were previously used to demonstrate a direct positive

regulation by AR of TRPM8, another channel in the TRP family (Bidaux et al., 2005). In this study, AR knockdown by 200 nM siRNA significantly decreased TRPV6 mRNA after 48 h and protein levels 72 h after transfection (Figures 2a and b). These data were confirmed by immunocytochemistry (Figure 2h). In the series of Ca<sup>2+</sup> imaging experiments, we studied whether Ca<sup>2+</sup> uptake into LNCaP cell was affected by siRNA



against AR. Figure 2c shows that  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is substantially suppressed upon AR knockdown. In these experiments, the amplitude of the global response, but not the initial rate of  $\text{Ca}^{2+}$  increase, has been affected by siRNA-AR treatment, suggesting that some other (AR independent) proteins could be involved in the first phase of the response to the ' $\text{Ca}^{2+}$  add back' assay. Thus, the results suggest that AR regulates the TRPV6 expression and/or activity. To elucidate the nature of this regulation, LNCaP cells grown in 2% serum-supplied Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) medium were treated with either 1 nM DHT AR-selective agonist or 10  $\mu\text{M}$  Casodex-selective antagonist for 24 h (Figure 2d). Both DHT and Casodex had no significant effect on TRPV6 mRNA expression (Figure 2e). DHT/Casodex effects were already studied in the context of androgen regulation of TRPV6 (Peng *et al.*, 2001; Bodding *et al.*, 2003; Vanden Abeele *et al.*, 2003). We believe that these variations in TRPV6 expression were too weak (for example, 0.6- and 1.5-fold changes upon DHT/Casodex treatments, respectively; Peng *et al.*, 2001) to suggest any ligand dependency of AR regulation of *trpv6* gene as compared to known androgen regulation of other TRP channel, for example, TRPM8 in LNCaP (five- to six-fold increase upon DHT treatment; Bidaux *et al.*, 2005). The absence of consistency/reproducibility in agonist/antagonist treatments had led us to check whether the functional blockade of AR affected TRPV6 protein expression. Thus, androgen deprivation for 6 days was used. In LNCaP cells, this treatment led to only a 1.8-fold increase in TRPV6 protein expression levels. These variations in both TRPV6 and AR protein levels are presented in Figure 2f. Taking the role of AR in differentiation of LNCaP cells upon androgen deprivation (Vanoverberghe *et al.*, 2004), it is likely that AR preserves its functionality. The addition of 1 nM

DHT to LNCaP cells deprived of steroids for 6 days did not lead to any significant change in either TRPV6 or AR mRNA expression levels (Figure 2g). The fact that the functional status of AR, that is, transcriptional activity, strongly correlates with its phosphorylation status other than activation by androgens, has already been considered for the treatment of prostate cancer (Wang *et al.*, 1999). Increasing evidence indicates that androgens may also have an indirect influence on the expression of genes that do not contain AR-responsive elements, by modulating the activity of other transcription factors, mediating growth factor expression in paracrine or autocrine mode, or inducing changes in the production of other hormones (Korkmaz *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2005). We chose another steroid receptor, vitamin D<sub>3</sub> receptor (VDR), as a positive model of TRPV6 regulation, since *trpv6* has already been identified as a VDR-regulated gene (Wang *et al.*, 2005). Unlike DHT, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increased TRPV6 mRNA expression in a steroid containing RPMI medium in a dose-dependent manner (Figure 2i). Taken together, these data on *trpv6* gene regulation suggest that *trpv6* is not a direct AR-responsive gene, however, the presence of AR is needed in this cell type to maintain the expression of TRPV6. We conclude that TRPV6 is regulated by AR in ligand-independent manner and probably constitutes an essential cofactor of *trpv6* gene transcription in prostate cancer cells.

In summary, this research demonstrated for the first time that  $\text{Ca}^{2+}$  entry via TRPV6 controlled proliferation directly and promoted apoptosis resistance in prostate cancer cells. In view of strong correlation of TRPV6 with the Gleason >7 tumor grading in prostate cancer, this channel is a promising therapeutic target for the development of new treatments.

**Figure 2** TRPV6 is an indirect androgen-dependent gene. The effects of AR knockdown on: (a) mRNA and (b) protein levels of TRPV6 and AR itself, compared to  $\beta$ -actin. (c) The effects of AR silencing on  $\text{Ca}^{2+}$  entry into LNCaP cells. LNCaP cells were plated onto glass coverslips and transfected with functional noncoding siRNA#1 as a control and siRNA-AR. Cells were loaded with 4  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM in the growth medium at room temperature for 45 min.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was measured after subsequent  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  switches, as indicated;  $n = 150$  cells for each condition. (d) The effects of AR agonist DHT (1 nM) and AR antagonist Casodex (Csdx, 10  $\mu\text{M}$ ) for 1 day on TRPV6 and AR mRNA levels as compared to  $\beta$ -actin. (e) The corresponding histogram of the DHT/Csdx effects on TRPV6 mRNA expression in LNCaP cells. (f) Effects of steroid deprivation (SD) on TRPV6 and AR protein levels as compared to  $\beta$ -actin. (g) Effects of 1 nM DHT on TRPV6, AR and prostate-specific antigen (PSA) as a control, mRNA expression levels in LNCaP cell line after 6 days of SD. (h) Immunocytochemistry of TRPV6 (red) and AR (green) in LNCaP cells following reciprocal knockdown by siAR and siTRPV6. Cells grown on glass coverslips were fixed in 3.5% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), then washed in PBS and stained with both rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody (Alomone Labs Ltd., 1/200) and mouse monoclonal anti-AR (Neomarkers, 1/500). Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France, 1/4000) was used as a secondary antibody for TRPV6 staining and Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (Molecular Probes, 1/4000) for AR staining. Fluorescence analysis was carried out using a Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200M with 63  $\times$  1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature, and data were processed using Carl Zeiss LSM Image Examiner software. (i) Effects of 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on TRPV6 mRNA level in LNCaP cells. PCR: total RNA was isolated using the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction procedure, reverse transcribed using moloney murine leukemia (MuLV) reverse transcriptase (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The following primers were used for PCR: TRPV6 (NM\_018646), F1: ATGGTGATGCGGCTCATCAGTG; B1: GTAGAAGTGGCCTAGCTCCTCG; AR (NM\_000044), F1: TGCCATCTTGT CGTCTTCG; B1: CTGGAGTTGACATTGGTGAAGG; PSA (NM\_001648), F1: CTCACCCGTCCGTGACGTGGATT; B1: AAGCTGTGGCTGACCTGAAATA;  $\beta$ -actin (NM\_001101), F1: CAGAGCAAGAGAGGCATCCT; B1: GTTGAAGTCTC AAACATGATC. DNA amplification procedure included an initial 5 min denaturation step at 95°C, and 33 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 59°C, 30 s at 72°C, and finally 7 min at 72°C. All experiments were performed at least three times, unless otherwise stated. Both PCR and western blotting bands were quantified using densitometric analysis option in the Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories). See Figure 1 for western blotting specifications. AR, androgen receptor; Csdx, Casodex; DHT, dihydrotestosterone; PBS, phosphate-buffered saline; SD, steroid deprivation; TRPV6, transient receptor potential channel, subfamily V, member 6.



## Acknowledgements

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Ministère de l'Éducation

## References

- Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crepin A, Delcourt P, Slomianny C *et al.* (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* **12**: 367–382.
- Bodding M, Fecher-Trost C, Flockerzi V. (2003). Store-operated  $Ca^{2+}$  current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J Biol Chem* **278**: 50872–50879.
- Bodding M, Flockerzi V. (2004).  $Ca^{2+}$  dependence of the  $Ca^{2+}$ -selective TRPV6 channel. *J Biol Chem* **279**: 36546–36552.
- Burnstein KL. (2005). Regulation of androgen receptor levels: implications for prostate cancer progression and therapy. *J Cell Biochem* **95**: 657–669.
- Cooperberg MR, Moul JW, Carroll PR. (2005). The changing face of prostate cancer. *J Clin Oncol* **23**: 8146–8151.
- Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. (2003). Expression of the  $Ca^{2+}$ -selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* **22**: 7858–7861.
- Korkmaz KS, Elbi C, Korkmaz CG, Loda M, Hager GL, Saatcioglu F. (2002). Molecular cloning and characterization of STAMP1, a highly prostate-specific six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. *J Biol Chem* **277**: 36689–36696.
- Légrand G, Humez S, Slomianny C, Dewailly E, Vanden Abeele F, Mariot P *et al.* (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.
- Lipskaia L, Lompre AM. (2004). Alteration in temporal kinetics of  $Ca^{2+}$  signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* **96**: 55–68.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**: 595–598.
- Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM *et al.* (2001). CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 729–734.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. (2004).  $Ca^{2+}$  homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 1326–1335.
- Schindl R, Kahr H, Graz I, Groschner K, Rومانin C. (2002). Store depletion-activated CaT1 currents in rat basophilic leukemia mast cells are inhibited by 2-aminoethoxydiphenyl borate. Evidence for a regulatory component that controls activation of both CaT1 and CRAC ( $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channel) channels. *J Biol Chem* **277**: 26950–26958.
- Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer BA, Strauss B, Philipp SE, Flockerzi V *et al.* (2006). TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium* **39**: 163–173.
- Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Vanden Abeele F *et al.* (2000). Store depletion and store-operated  $Ca^{2+}$  current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* **527**(Part 1): 71–83.
- Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V *et al.* (2006). Differential role of transient receptor potential channels in  $Ca^{2+}$  entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* **66**: 2038–2047.
- Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebault S, Lepage G, Parys JB, Shuba Y *et al.* (2004). Two types of store-operated  $Ca^{2+}$  channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* **279**: 30326–30337.
- Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. (2003). Store-operated  $Ca^{2+}$  current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous  $Ca^{2+}$  transporter type 1. *J Biol Chem* **278**: 15381–15389.
- Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, Roudbaraki M *et al.* (2002). Bel-2-dependent modulation of  $Ca^{2+}$  homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* **1**: 169–179.
- Vanoverberghe K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL *et al.* (2004).  $Ca^{2+}$  homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* **11**: 321–330.
- Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. (1999). Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 21–28.
- Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y *et al.* (2005). Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* **19**: 2685–2695.
- Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V. (2004). TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6  $Ca^{2+}$  channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 1359–1363.
- Xiao F, Mirwald A, Papaioannou M, Baniahmad A, Klug J. (2005). Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for Sp family transcription factors. *Mol Endocrinol* **19**: 2964–2978.

**Conclusion.**

Dans cette étude, nous avons donc montré que l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  par TRPV6 est responsable d'une part du contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques en régulant l'activité du facteur de transcription NFAT, et d'autre de la résistance à l'apoptose de ces cellules. Comme ce canal est surexprimé dans des cancers de la prostate les plus agressifs (Gleason>7), c'est un candidat intéressant pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant les cancers les plus avancés.

# Discussion

*« Il y a un proverbe chinois qui ne dit rien.  
Il m'arrive de le citer quand je n'ai rien à dire... »*

*Philippe Geluck*

*Extrait de Ma langue au chat*

## **I) Le translocon : canal de fuite majoritaire des cellules cancéreuses prostatiques humaines.**

Au cours de cette première partie de notre travail, nous avons démontré, à l'aide des techniques d'imagerie calcique, de microscopie confocale et de patch-clamp, que le translocon est impliqué dans la fuite passive de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme.

La concentration de calcium luminale joue un rôle essentiel dans la modulation de nombreux processus physiologiques tels que la maturation des protéines, la régulation de l'expression des gènes et l'apoptose (Nicotera and Rossi 1994; Berridge 1995). Dans les cellules LNCaP, il a été démontré, par des substances pharmacologiques telles que la thapsigargine, que la vidange des stocks calciques intracellulaires, pouvait induire l'apoptose des cellules (Skryma et al. 2000). De plus, dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes, l'activation des canaux calciques de type SOC, à la suite de la déplétion des stocks par la thapsigargine, pouvait également provoquer l'apoptose de ces cellules. Dès lors, il est important d'identifier les différents mécanismes intervenant dans la baisse de la concentration de calcium dans le RE et donc dans la régulation du processus apoptotique. C'est notamment le cas des canaux de fuite calcique, dont le translocon serait un candidat potentiel.

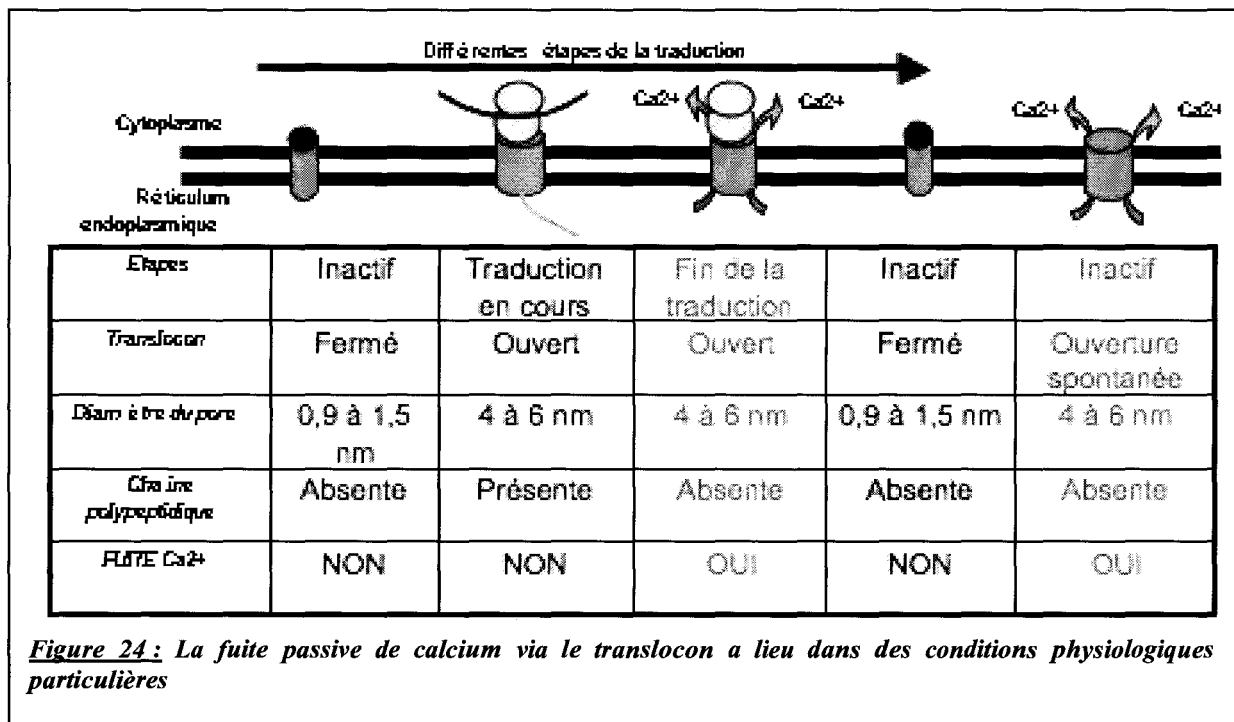
### **I.A) Conditions physiologiques pendant lesquelles a lieu la fuite passive de calcium**

Le translocon est un complexe multimoléculaire de la membrane du RE pouvant avoir un rôle dans la fuite de calcium. Heritage et Wonderlin (Heritage and Wonderlin 2001) ont démontré que le translocon est perméable aux ions et aux petites molécules neutres. Ils ont démontré également que cette perméabilité augmente en traitant les cellules avec de la puromycine. Ainsi, la perméabilité du RE est couplée à la traduction. En ce qui concerne la perméabilité du translocon au calcium, des études préliminaires effectuées sur des cellules pancréatiques de souris (Lomax *et al.* 2002) ont montré que la fuite calcique globale augmente en présence de puromycine.

Dans notre étude, nous avons observé que la puromycine pouvait induire la fuite passive de calcium à partir du RE des cellules cancéreuses prostatiques humaines. En effet, la puromycine est un inhibiteur de la traduction. Elle agit en libérant la chaîne polypeptidique naissante du canal du translocon tout en laissant le ribosome fixé sur celui-ci. Ainsi, le

translocon est maintenu en configuration ouverte (Roy and Wonderlin 2003) ce qui permet au calcium qui se trouve à l'intérieur du RE de fuir vers le cytoplasme. De plus, un prétraitement avec de l'anisomycine, qui agit en amont de la puromycine et prévient la fixation du ribosome sur le translocon, inhibe la fuite calcique induite par la puromycine. Nous avons également vérifié l'action de l'anisomycine sur l'activation du translocon grâce à la technique d'immunofluorescence et à la mesure de la colocalisation entre le translocon (Sec61) et le ribosome (sous-unité 60S). Ainsi, lors d'un prétraitement d'une heure avec l'anisomycine 200µM, la colocalisation entre le translocon et le ribosome diminue. Le nombre de translocons ouverts serait donc plus faible et de ce fait la fuite calcique est diminuée.

Ainsi, la fuite calcique transitant par le translocon pourrait avoir lieu dans des conditions physiologiques. En effet, comme le montre l'équipe de Nicchitta (Potter and Nicchitta 2002), à la fin de la traduction il y a une association stable entre le ribosome et le translocon. A ce moment, la chaîne polypeptidique naissante est absente du canal du translocon (ceci est mimé dans nos conditions expérimentales par la puromycine). Il faut également noter que des ouvertures spontanées du translocon ont été observées (Simon *et al.* 1989) : la fuite de calcium pourrait également se produire à ce moment. Ces données sont résumées dans la figure 24.



Nos expériences démontrent également que la fuite induite par la puromycine n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteurs des récepteurs IP<sub>3</sub> et des récepteurs à la ryanodine. Un prétraitement avec des inhibiteurs des récepteurs IP<sub>3</sub> ou des récepteurs à la ryanodine ne

modifie pas la fuite passive induite par la puromycine. Par ailleurs, un prétraitement avec de l'anisomycine, qui inhibe la fuite passive transitant par le translocon, ne fait pas varier la vidange induite par l'IP<sub>3</sub>. Ceci démontre donc que la fuite engendrée par la puromycine est indépendante des récepteurs IP<sub>3</sub> et des récepteurs à la ryanodine. De ce fait, la fuite provoquée par la puromycine est spécifique du translocon.

Pour la première fois, nous avons démontré que le translocon est un canal de fuite calcique. En raison de l'ubiquité du translocon dans les cellules de mammifères, nos résultats suggèrent que la fuite de calcium par le translocon au cours de la synthèse protéique pourrait être un processus ubiquitaire dans la physiologie cellulaire. Néanmoins, le rôle physiologique de la fuite calcique transitant par le translocon reste actuellement inconnu.

### I.B) Le translocon est impliqué dans la vidange de calcium réticulaire induite par la thapsigargine

Après avoir mis en évidence le rôle du translocon comme canal de fuite passif, nous nous sommes intéressés à l'importance de la fuite par le translocon. Le translocon est-il l'un des canaux de fuite majoritaire de la cellule ? La vidange induite par la puromycine, la thapsigargine ou l'EGTA est inhibée par l'anisomycine. Le translocon serait donc impliqué de façon majoritaire dans la vidange déclenchée par ces substances. Cependant, ce même prétraitement ne bloque pas totalement la vidange, en effet nous avons observé une petite vidange résiduelle. Ces expériences semblent indiquer que le translocon serait l'un des canaux de fuite principaux des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Néanmoins, il existerait d'autres canaux de fuite dont la nature moléculaire est inconnue à ce jour. Ceci se révèle d'autant plus intéressant que la mise en évidence d'un des canaux de fuite principaux va faciliter l'étude des autres canaux, dont la fuite est facilement masquée par celle transitant massivement par le translocon.

**Ces résultats permettent de caractériser, et ce, pour la première fois, l'un des mécanismes d'action de la thapsigargine. L'inhibition du translocon par l'anisomycine réduit l'amplitude de la vidange réticulaire induite par la thapsigargine. La fuite passive de calcium du RE transite donc en grande partie par le translocon.**

### **I.C) La vidange transitant par le translocon active un courant calcique de type SOC**

Comme nous l'avons vu précédemment, le translocon intervient dans la fuite passive de calcium en provoquant la vidange réticulaire. Or, il est connu que la vidange réticulaire active des canaux calciques de type SOC se trouvant sur la membrane plasmique ayant pour rôle le remplissage des stocks intracellulaires via la phospholipase A2 (iPLA2) qui produit des lysophospholipides. Ces lysophospholipides activent directement les canaux SOC. Ces canaux sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Par exemple, dans les cellules LNCaP, l'activation de ces canaux par la thapsigargine provoque l'apoptose de ces cellules. Nous avons donc déterminé, à l'aide d'études électrophysiologiques, que ces canaux pouvaient être activés par la vidange réticulaire transitant par le translocon. La puromycine induit l'activation d'un courant calcique de type SOC similaire au courant SOC activé par la thapsigargine.

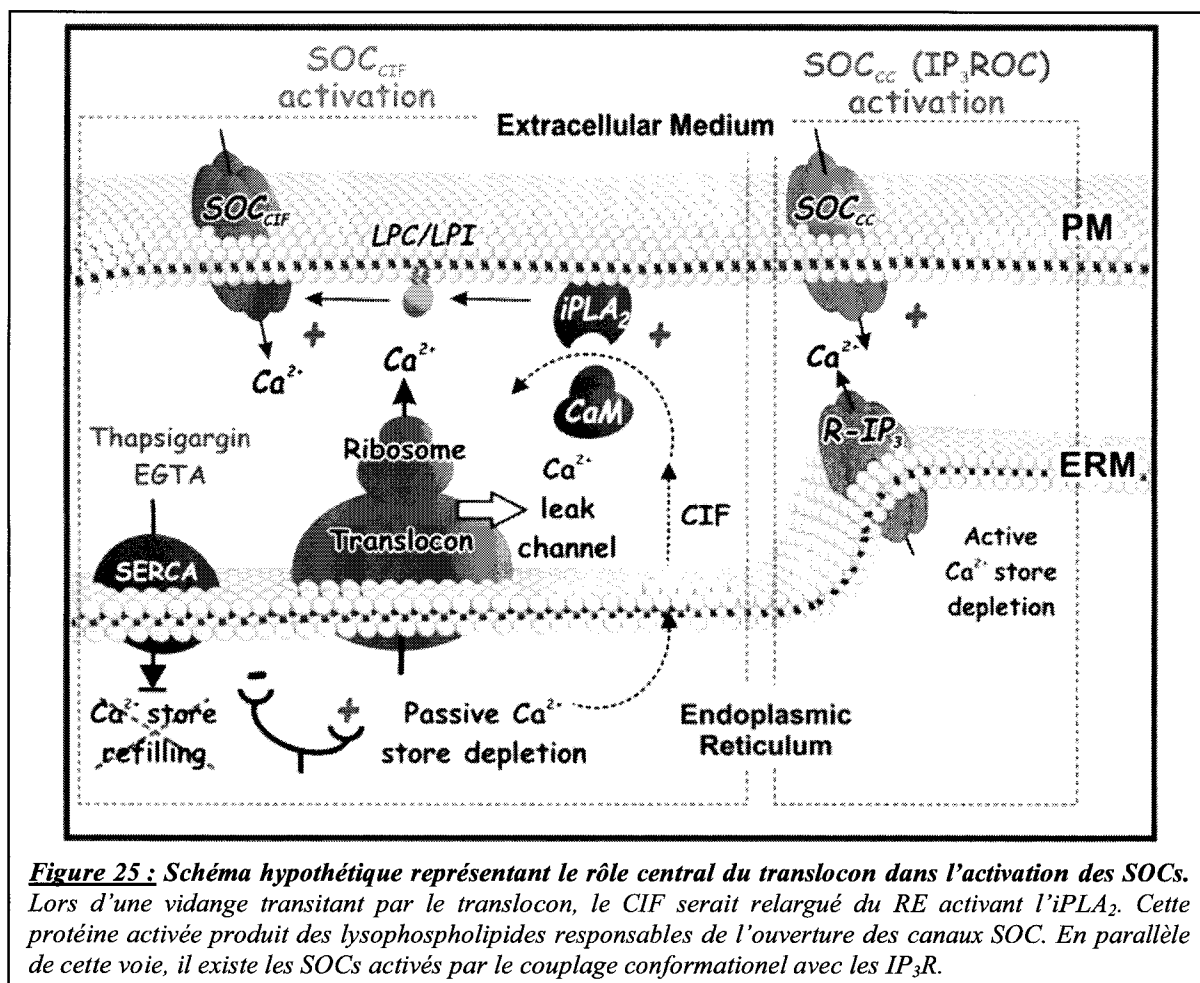
**Ainsi, dans nos conditions expérimentales, le translocon peut laisser fuir le calcium à partir du RE induisant alors l'activation des canaux calciques de type SOC.**

De ce fait, la fuite transitant *via* le translocon pourrait jouer un rôle très important dans la régulation de nombreux processus physiologiques. En effet, la concentration de calcium dans le RE peut moduler l'apoptose. De plus, l'influx de calcium induit par l'activation des SOC peut également moduler ces mêmes phénomènes. Comme l'illustre la *figure 25*, la fuite de calcium (en particulier celle transitant par le translocon) fait partie intégrante de la signalisation calcique intra-cytoplasmique. En effet, celle-ci se trouve à un « carrefour » de régulation entre les signaux modulés par le RE et les signaux calciques provenant de la membrane plasmique. Ainsi, une modulation de la fuite calcique traversant le translocon pourrait provoquer une variation de la régulation de la signalisation calcique et donc déclencher des processus physiologiques aussi divers que la prolifération, l'apoptose ou la différenciation.

### **I.D) Conclusion**

**Notre travail nous a donc permis d'identifier, et ce pour la première fois, que le translocon est le canal de fuite majoritaire des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Celui-ci serait donc impliqué de façon physiologique dans la vidange passive du réticulum endoplasmique et dans l'activation des canaux calciques de type SOC. Le translocon serait donc un élément majeur de la signalisation calcique en régulant d'une part la concentration de calcium dans le RE et d'autre part en participant à tous les processus physiologiques régulés par le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire.**

Grâce à ce travail, nous avons également mis en évidence l'un des mécanismes d'action de la thapsigargine, molécule couramment utilisée en recherche sur la signalisation calcique et actuellement en essai clinique dans le cadre de traitements du cancer de la prostate.

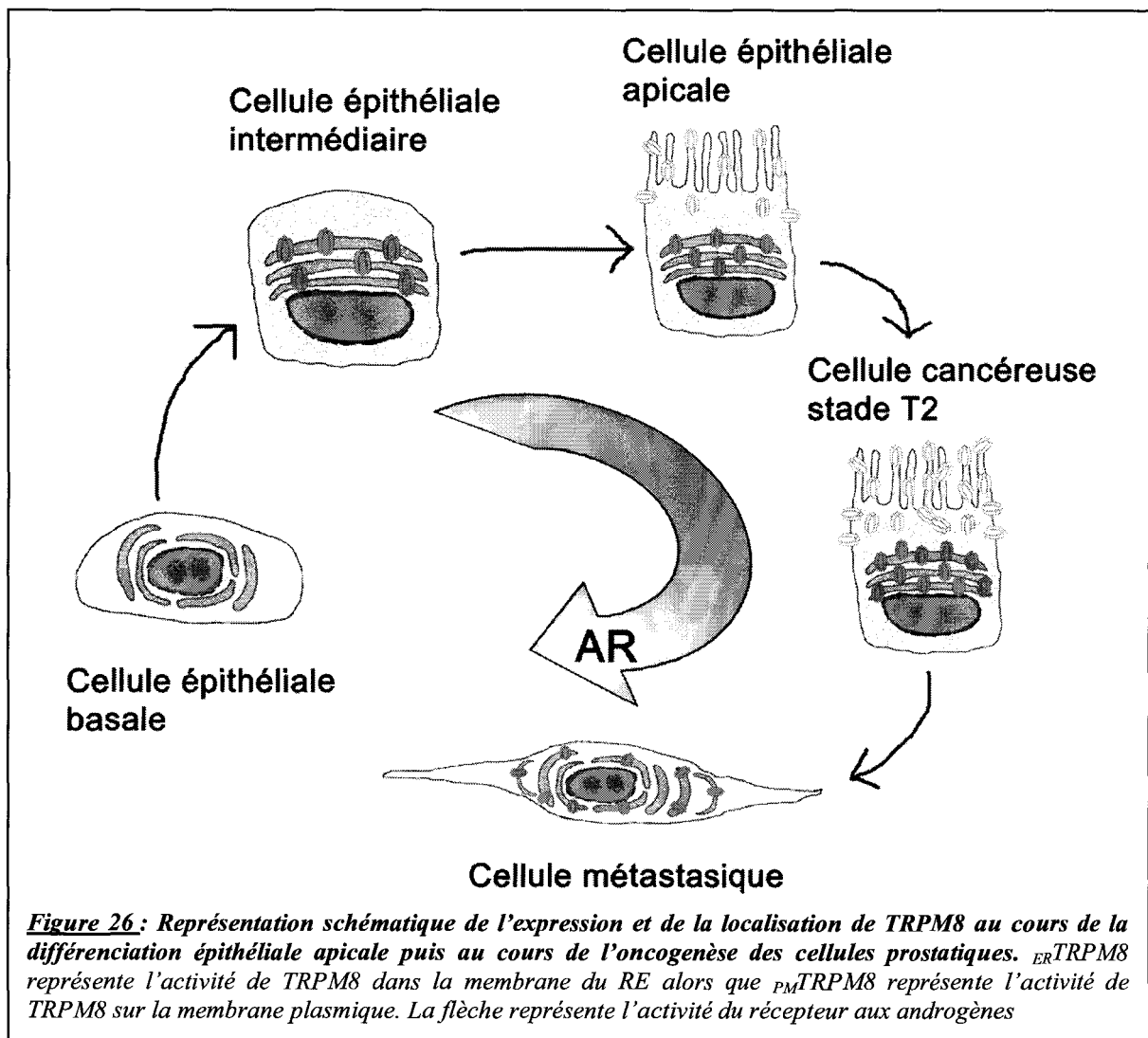


**Figure 25 :** Schéma hypothétique représentant le rôle central du translocon dans l'activation des SOCs. Lors d'une vidange transitant par le translocon, le CIF serait relargué du RE activant l'iPLA<sub>2</sub>. Cette protéine activée produit des lysophospholipides responsables de l'ouverture des canaux SOC. En parallèle de cette voie, il existe les SOCs activés par le couplage conformationnel avec les IP<sub>3</sub>R.



## II) Rôle de TRPM8 dans la physiopathologie prostatique.

L'expression du gène *trpm8* dans la prostate a été décrite 2001 lorsque Tsavaler *et col* ont reporté la présence de l'ARNm de TRPM8 dans le tissu de la prostate humaine (Tsavaler, Shapero, Morkowski et al. 2001). L'année suivante, les groupes de Julius et Patapoutian ont démontré que TRPM8 était exprimé dans les neurones sensoriels de la moelle épinière où il fonctionnait comme un récepteur au froid (McKemy, Neuhauser and Julius 2002; Peier, Moqrich, Hergarden et al. 2002). Depuis, plusieurs études ont reporté l'expression de TRPM8 dans différents tissus dont le foie (Henshall, Afar, Hiller et al. 2003), les muscles lisses des artères (Yang *et al.* 2006), ou encore les cellules papillaires de la langue (Abe *et al.* 2005).



En se basant sur ces études et sur nos travaux portant sur l'expression de TRPM8 au cours de la différenciation apicale des cellules épithéliales de la prostate, nous avons proposé un modèle expliquant la régulation des fonctions de TRPM8 au cours de l'oncogenèse (figure 26). Les cellules cancéreuses apicales surexpriment fortement TRPM8 et possèdent les deux fonctions  $_{ER}TRPM8$  et  $_{PM}TRPM8$ . Cette dernière est considérablement stimulée lors du cancer. Ce modèle correspond bien au phénotype cancéreux « peu prolifératif » et « hypersécrétoire » (révélé par le taux sanguin de PSA) des cancers intracapsulaires de la prostate. Au fur et à mesure de l'acquisition de mutations, le cancer devient métastatique, s'affranchit en partie du récepteur aux androgènes ou détourne sa fonction de contrôle de la différenciation apicale au bénéfice de la prolifération (Karayi and Markham 2004; Reddy *et al.* 2006). Lors de cette transition, la décroissance de l'activité  $_{PM}TRPM8$  est due soit à une répression génique (diminution de la transcription) soit à l'inhibition de la translocation vers la membrane plasmique (ex : lignée LNCaP). Cependant, la fonction  $_{ER}TRPM8$  se maintient, probablement pour stimuler la prolifération.

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont également permis de mettre en évidence que le canal TRPM8 est aussi bien exprimé dans les cellules épithéliales que dans les cellules musculaires lisses. Cependant, outre la forme classique connue, nous avons identifié une forme fonctionnelle tronquée de ce canal. La double localisation de TRPM8 sur la membrane du RE et sur la membrane plasmique complexifie la compréhension de son rôle dans la prostate. Nous commencerons donc par discuter le rôle hypothétique de la fonction plasmique avant d'aborder le rôle de la fonction réticulaire.

## II.A) Rôle de TRPM8 membranaire

D'après nos travaux, le canal TRPM8 classique est principalement exprimé dans la zone péri-luminale des cellules apicales épithéliales de la prostate. Nos résultats d'électrophysiologie ont démontré la fonctionnalité de TRPM8 dans les membranes plasmiques et réticulaires. Néanmoins, TRPM8 semble aussi localisé dans les vésicules de sécrétion des cellules apicales épithéliales.

Compte-tenu des travaux publiés sur la translocation stimulée de TRPC5 et TRPV5 respectivement dans les vésicules des neurones et de l'épithélium rénal, il est fortement probable que TRPM8 soit présent dans les vésicules de sécrétion des cellules sécrétrices matures (Bezzarides *et al.* 2004; Lambers *et al.* 2006). Le canal TRPM8 pourrait soit participer directement au phénomène de sécrétion, soit être acheminé à la membrane plasmique pour y remplir son rôle.

La fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique nécessite un remodelage des lipides membranaires afin d'augmenter la proportion des lipides à capacité fusogène comme les lysophospholipides (Karli *et al.* 1990; Roldan and Fragio 1993). Or, la phospholipase A2 est connue pour jouer un rôle dans le remodelage de la composition lipidique des membranes (Balsinde *et al.* 1995; Balsinde *et al.* 1997; Kudo and Murakami 2002), ainsi que dans la sécrétion stimulée d'insuline par les cellules  $\beta$  de Langerhans dans le pancréas (Ma *et al.* 2001).

En accord avec notre travail sur l'activation du canal TRPM8 par les lysophospholipides (Vanden Abeele *et al.* 2006), il est probable que TRPM8 puisse être activé pendant la fusion vésiculaire et ainsi provoquer l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol afin d'activer des protéines  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes intervenant dans la fusion membranaire. Néanmoins, TRPM8 pourrait aussi intervenir en aval de la fusion vésiculaire.

De plus, dans la prostate, la sécrétion a pour but de libérer de nombreuses substances dans le liquide séminal comme la PSA, la PAP, le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), le citrate et d'autres molécules. TRPM8 pourrait éventuellement participer à la sécrétion du  $\text{Zn}^{2+}$ . Bien que n'ayant pas de rôle direct dans la reproduction, le  $\text{Zn}^{2+}$  agit comme anti-bactérien, protège le citrate de l'oxydation par la  $\mu$ -aconitase, inhibe en partie l'activité du PSA dans le sperme et participe à la stabilisation de la chromatine des spermatozoïdes (Evenson *et al.* 1993; Costello and Franklin 1998; Malm *et al.* 2000). D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence le lien étroit entre diminution des concentrations des ions  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans le liquide spermatique avec l'infertilité (Chia *et al.* 2000).

Or, TRPM8 est un canal cationique dit « non-sélectif » car il transporte indifféremment les cations monovalents et divalents. Des résultats non publiés du laboratoire ont confirmé que la perméabilité au  $\text{Zn}^{2+}$  de TRPM8 est quasi identique à celle du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, en tenant compte de la sélectivité de TRPM8 pour cet ion et du gradient électrochimique du  $\text{Zn}^{2+}$ , il est très probable que l'ouverture de TRPM8 sur la membrane luminale des cellules apicales de la prostate laisse passer l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  dans une proportion importante.

En conclusion, l'analyse de nos résultats nous conduit à penser que l'activité  $\text{PMTRPM8}$  pourrait participer au phénomène de sécrétion du liquide prostatique.

## II.B) Rôle de TRPM8 réticulaire

Comme nous l'avons décrit, la vidange réticulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  par le canal TRPM8 entraîne l'activation de ECC. Ainsi, le premier rôle de TRPM8 réticulaire ( $\text{ERTRPM8}$ ) pourrait simplement d'être de participer à l'activation de l'ECC, elle-même nécessaire au remplissage des stocks réticulaires de calcium. Ce remplissage des stocks assure l'homéostasie calcique, mais aussi la régulation des grandes fonctions physiologiques comme la prolifération et l'apoptose.

Cependant les différents travaux portant sur le rôle de  $\text{ERTRPM8}$  indique un rôle beaucoup plus vaste de ce canal. Il faut toutefois distinguer le type cellulaire étudié.

### II.B.1) Dans les cellules musculaires lisses.

Les cellules musculaires lisses sécrètent de nombreux facteurs (hormones, facteurs de croissance) qui vont agir de façon paracrine sur l'épithélium adjacent pour contrôler sa croissance. Parmi les différents facteurs étudiés, une des voies hormonales les mieux décrites dans les cellules musculaires lisses prostatiques est la voie  $\alpha$ 1-adrénergique.

Dans les cellules musculaires lisses innervées par le système nerveux autonome, la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques entraîne la production d' $\text{IP}_3$  *via* l'activation de la PLC, qui vidange les stocks calciques intracellulaires contribuant ainsi à la dépolarisation membranaire et à la contraction (Amedee and Large 1989; Huang, Maher and McCormick 1999). A ce titre, les antagonistes  $\alpha$ -adrénergiques sont couramment utilisés dans le traitement symptomatique des hyperplasies bénignes de la prostate (HBP) afin de relaxer le muscle lisse (Hedlund and Hedlund 1999; Schwinn and Price 1999).

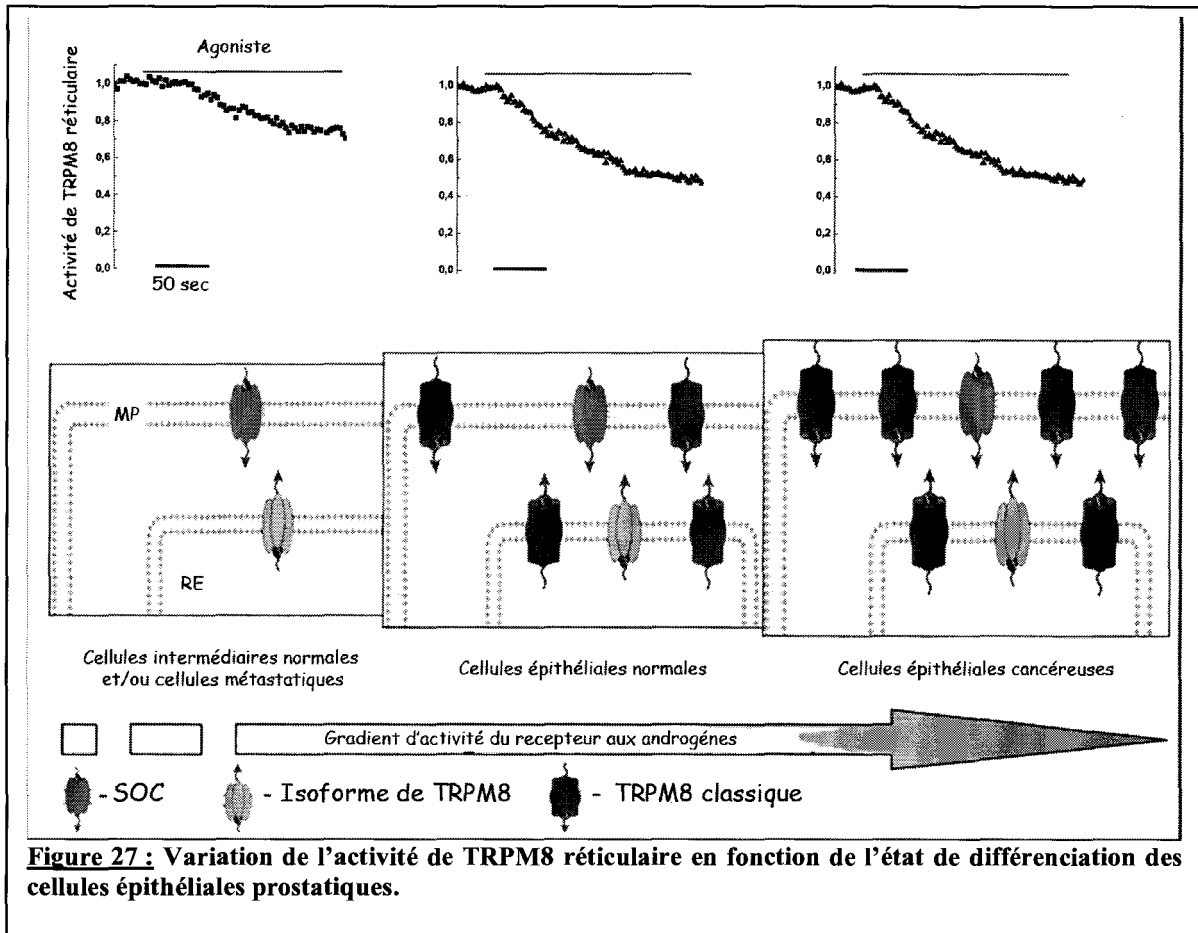
Les travaux effectués au cours de ma thèse ont permis d'identifier un nouveau mécanisme de contraction de ces cellules indépendant de la voie des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques. Nos résultats démontrent l'expression d'une isoforme de TRPM8 dans les cellules musculaires lisses prostatiques. D'après nos premiers résultats, il ne s'agit pas de la forme longue classique présente sur la membrane plasmique des cellules épithéliales. L'étude de la structure de l'ARN et de la protéine renforce l'hypothèse de l'existence d'une isoforme tronquée de TRPM8 dans ces cellules musculaires. Cette isoforme de TRPM8 est fonctionnelle sur la membrane du RE et son activation provoque une vidange massive du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire. Cette étude permet de mettre en évidence, et ce pour la première fois, un rôle physiologique de TRPM8 dans la prostate. Ainsi, la contraction des cellules musculaires lisses prostatiques interviendrait dans la sécrétion du liquide prostatique indispensable à l'activation des spermatozoïdes. Cette étude représente donc une base de recherche pour de nouvelles cibles thérapeutiques contre l'infertilité masculine.

## II.B.2) Dans les cellules épithéliales.

Le rôle de TRPM8 réticulaire dans les cellules épithéliales prostatiques est plus complexe à élucider. En effet, en fonction de l'état de différenciation des cellules, l'activité de TRPM8 réticulaire est composée de la forme classique et de la forme courte de TRPM8. En effet, dans les cellules de la prostate, la fonction  $ER$ TRPM8 est la résultante de l'expression de la forme classique de TRPM8 et d'une isoforme de TRPM8. Comme nous l'avons démontré, la forme classique de TRPM8 est androgéno-dépendante alors que la forme courte réticulaire n'est pas sensible aux androgènes. Ainsi, l'isoforme de TRPM8 est toujours présente quelle que soit l'activité du récepteur aux androgènes et donc ne dépend pas de la différenciation des cellules. Les cellules épithéliales prostatiques normales sont sensibles aux androgènes et expriment donc la forme classique de TRPM8. Ainsi, l'activité réticulaire dans ces cellules est une combinaison des deux isoformes. La même combinaison est présente dans les cellules épithéliales cancéreuses. Dans les cellules où l'activité du récepteur aux androgènes est la plus faible, seule l'isoforme tronquée de TRPM8 est présente sur le RE (figure 27).

Par ailleurs, certains résultats obtenus au cours de ma thèse semblent indiquer que TRPM8 est localisé dans des régions spécifiques de la membrane du RE. En effet, TRPM8 serait localisé dans des régions du RE qui sont très proches des mitochondries. Ainsi, l'activation de TRPM8 réticulaire induit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_m$ .

De plus, il a été démontré que la recapture soutenue du  $Ca^{2+}$  par les mitochondries entraîne l'activation du Pore Transitoire de Perméabilité (PTP) et provoquerait ainsi la libération vers le cytoplasme de deux facteurs pro-apoptotiques : le cytochrome C et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Korge and Weiss 1999). Paradoxalement, d'autres travaux démontrent que l'augmentation transitoire et cyclique de  $[Ca^{2+}]_m$  induit la stimulation du cycle de Krebs par l'activation des pyruvate-, isocitrate- et oxoglutarate-déhydrogénases. Cette stimulation conduit à une augmentation de la synthèse d'ATP au sein des mitochondries. La synthèse optimale d'ATP par les mitochondries a été observée pour une concentration de  $[Ca^{2+}]_c$  d'environ 1  $\mu$ M, ce qui représente la concentration atteinte localement lors d'une vidange réticulaire (Moreno-Sanchez 1985). La balance entre apoptose/prolifération serait alors définie par l'intensité et la durée de cette augmentation de  $[Ca^{2+}]_m$ .



Ainsi, dans les cellules n'exprimant que l'isoforme de TRPM8 (les cellules basales et les cellules intermédiaires), l'activité de TRPM8 réticulaire est assez faible, ce qui n'entraîne qu'une faible augmentation de la  $[Ca^{2+}]_m$ . Nous pensons que le rôle de l'activité  $ER$ TRPM8 est de moduler le cycle cellulaire. En effet, les cellules basales ont un taux de prolifération très élevé et sont considérées comme étant le compartiment de réserve de l'épithélium prostatique. L'expression de la forme classique de TRPM8 est, quant à elle, concomitante à la différenciation des cellules apicales intermédiaires en cellules apicales sécrétrices matures, qui ne prolifèrent plus. Dans ces cellules, l'activité de TRPM8 réticulaire est donc considérablement augmentée. L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_m$  semble donc être beaucoup plus soutenue. Nous pensons donc que l'augmentation de l'activité  $ER$ TRPM8 due à l'expression de la forme classique de TRPM8 est associée à la génération d'un signal calcique différent dont le rôle ne serait plus de moduler la prolifération mais peut-être de participer soit à l'activité de sécrétion, soit à l'apoptose des cellules sécrétrices matures.

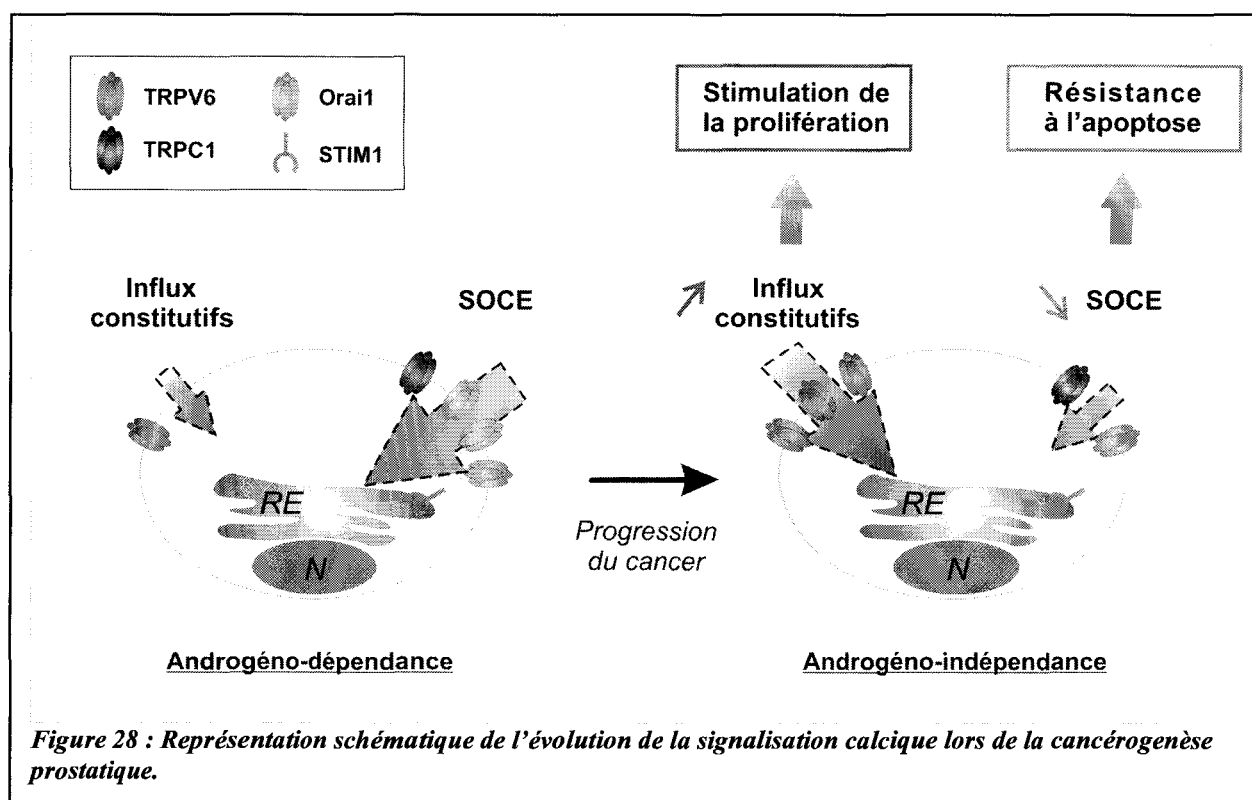
**En conclusion, nous pensons que le rôle du signal calcique engendré par l'activation de TRPM8 est différent selon les isoformes présentes sur la membrane du**

**RE et selon leur quantité. Ainsi, lorsque seule l'isoforme réticulaire est présente, TRPM8 pourrait intervenir dans la régulation de la synthèse d'ATP et participer indirectement à la prolifération des cellules. Alors que la présence supplémentaire de la forme classique de TRPM8 pourrait intervenir dans la sécrétion ou l'apoptose des cellules. Dans les deux cas, TRPM8 semble jouer un rôle essentiel dans la fonction physiologique de la prostate.**

### **III) Evolution de la signalisation calcique durant la cancérogenèse prostatique**

Il est généralement admis que le cancer de la prostate résulte plutôt d'un défaut d'apoptose des cellules épithéliales lié entre autres à la surexpression de l'oncoprotéine Bcl-2 et de la différenciation des cellules épithéliales cancéreuses en cellules neuroendocrines que d'un excès de prolifération (Raffo *et al.* 1995; Skryma *et al.* 2000; Fixemer *et al.* 2002). Néanmoins, des études rapportent que le contrôle de la croissance cellulaire par des facteurs de croissance et des hormones se dérégule et implique notamment une hausse de la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques (Montano and Djamgoz 2004). Il est actuellement bien établi que le calcium joue un rôle crucial dans le contrôle de la croissance cellulaire. Cependant à l'heure actuelle, les mécanismes calciques qui interviennent dans la cancérogenèse prostatique sont peu connus.

Comme l'illustre la figure 28, les résultats ont permis de mieux caractériser les évolutions de la signalisation calcique lors de la cancérogenèse prostatique. Nous avons démontré, lors de la progression du cancer de la prostate, la perte d'expression d'Orai (la protéine responsable de l'entrée capacitive de  $Ca^{2+}$  dans les cellules cancéreuses prostatiques) ainsi que la surexpression de TRPV6. Ces variations d'expression de ces protéines impliquées dans l'homéostasie calcique seraient responsables de la transition du cancer de la prostate vers des stades plus agressifs.



### III.A) Orai1 et résistance à l'apoptose

Il est largement établi que la vidange des stocks calciques réticulaires entraîne une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à l'activation des canaux SOCs. Plusieurs travaux, notamment des études menées au laboratoire, ont permis de mettre en évidence que cette entrée serait responsable de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes. Ainsi, les modifications survenant dans le processus d'apoptose lors de la transition des cellules tumorales de l'état d'androgéno-dépendant vers l'état androgéno-indépendant pourraient être liées à des perturbations de la signalisation calcique impliquant les SOCs.

Des travaux du laboratoire ont montré d'une part, que le courant de type SOC activé par l' $\text{IP}_3$  était diminué dans les cellules androgéno-indépendantes (Vanoverberghe, Vanden Abeele et al. 2004) et d'autre part, que les canaux TRPC1, TRPC4 sont impliqués dans la constitution du canal SOC (Vanden Abeele, Lemonnier et al. 2004). Deux types de courants SOC relatifs à des sous-compartiments du RE ont été décrits : un courant SOC- $\text{IP}_3$  activé par un couplage conformationnel, régulé par le cytosquelette ainsi que par la calmoduline kinase II et la PKC et un courant SOC-Tg induit par le « CIF », insensible au cytosquelette, à la CaMKII et à la PKC. TRPC1 serait préférentiellement impliquée dans le SOC- $\text{IP}_3$  alors que TRPC4 serait plutôt recruté dans le SOC-Tg (Vanden Abeele, Lemonnier et al. 2004).

Ces mécanismes d'activation des canaux SOC n'expliquent cependant pas la diminution du courant SOC observée dans les cellules épithéliales androgéno-indépendantes.



Plusieurs explications étaient alors envisagées : une diminution d'expression des canaux SOC, une modulation de l'activité de ces canaux par des protéines accessoires ou par absence ou défaut de translocation à la membrane plasmique impliquant le cytosquelette et/ou des modifications des voies de signalisation activant les canaux SOC.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de démontrer que la protéine Orai1/CRACM1 (protéine ubiquitaire de 33kDa possédant 4 domaines transmembranaires) est responsable de l'entrée capacitive de  $Ca^{2+}$  des cellules cancéreuses prostatiques. De plus, l'expression d'Orai1 varie en fonction du stade du cancer de la prostate. En effet, son expression ainsi que l'amplitude du courant SOC qu'elle porte diminuent de façon significative lors de l'évolution des cellules cancéreuses prostatiques vers l'androgéno-indépendance. Cette diminution d'expression entraîne une baisse de l'ECC et par conséquent induit une diminution du taux d'apoptose  $Ca^{2+}$  dépendante de ces cellules.

De façon intéressante, l'inhibition d'expression d'Orai1 par des siRNA protège les cellules LNCaP contre l'apoptose  $Ca^{2+}$  dépendante. Ainsi, on observe que dans les cellules androgéno-dépendantes, l'inhibition de l'expression d'Orai1 mime parfaitement cette résistance à l'apoptose  $Ca^{2+}$  dépendante des cellules androgéno-indépendantes.

De plus, nous avons démontré que l'expression de Orai est dépendante de l'activité du récepteur aux androgènes. En effet, lors de l'évolution du cancer prostatique vers des stades plus agressifs, l'activité du récepteur aux androgènes diminue, provoquant ainsi une baisse d'expression de Orai.

L'entrée de  $Ca^{2+}$  par Orai joue donc bien un rôle central dans l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques. La perte d'expression de cette protéine, lors la progression du cancer de la prostate vers des stades plus agressifs, provoque une diminution significative de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans ces cellules et donc une baisse du taux d'apoptose  $Ca^{2+}$  dépendant.

Orai est donc une protéine majeure intervenant dans l'évolution du cancer prostatique en permettant aux cellules cancéreuses prostatiques de devenir résistante à l'apoptose. Orai1 semble donc être une cible thérapeutique très intéressante pour traiter les cancers prostatiques dans les stades précoces de la maladie.

### **III.B) TRPV6 et prolifération**

TRPV6 appartient à la famille TRPV constituée de six membres. Mis à part les quatre premiers membres de cette famille (TRPV1-4) qui constituent des canaux cationiques non-sélectifs sensibles à la chaleur ou à l'osmolarité, seules les protéines TRPV6 et TRPV5 forment des canaux hautement sélectifs pour le calcium dont la fonction est de permettre une entrée de calcium au niveau apical de cellules des tissus digestifs, rénaux et sécréteurs.

TRPV6 est également fortement exprimée au niveau des tissus exocrines comme le pancréas, la prostate, et les glandes salivaires où elle est probablement impliquée dans la recapture du calcium suite à la libération de vésicules de sécrétion. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par cette protéine au niveau des cellules impliquées dans l'absorption du calcium (reins ou tube digestif) est un processus ne requérant aucun signal spécifique.

Au niveau prostatique, TRPV6 est fortement exprimé. Son expression est augmentée dans les cancers les plus agressifs. TRPV6 est donc un bon marqueur de cancérisation. Des études réalisées dans le laboratoire indiquent que TRPV6 participe à l'homéostasie calcique intracellulaire en permettant une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du milieu extracellulaire dans les cellules cancéreuses prostatiques.

Les résultats obtenus au cours de la thèse ont permis de préciser le rôle de cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par TRPV6. Dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes, l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  par TRPV6 permet le maintien de l'homéostasie calcique intracellulaire. Dans ces cellules, l'expression de TRPV6 est régulée par l'activité du récepteur aux androgènes : celui-ci permettrait de maintenir un niveau d'expression relativement faible de TRPV6. Ainsi, lors de l'évolution du cancer de la prostate d'un stade androgéno-dépendant vers un stade androgéno-indépendant, la perte de l'activité du récepteur aux androgènes provoquerait une perte de régulation de l'expression de TRPV6. Celui-ci est donc surexprimé dans des stades plus agressifs du cancer prostatique. L'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  par TRPV6 est donc beaucoup plus importante. Une telle entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule entraîne l'activation de certains facteurs de transcription tels que NFAT ce qui provoque une hausse du taux de prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines androgéno-indépendantes. TRPV6 semble donc être une cible thérapeutique très intéressante pour traiter les cancers prostatiques dans les stades avancés de la maladie.

### III.C) Conclusion

Ces résultats ont donc permis de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles contre le cancer de la prostate. Ces nouvelles cibles permettent d'envisager un traitement « à la carte » du cancer de la prostate. En effet, pour des cancers précoces, il faut cibler préférentiellement Orail qui est impliqué dans l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes. Pour les cancers plus agressifs, l'inhibition de TRPV6 serait intéressante afin de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes.

# Perspectives

*« Ce qu'il y a de réconfortant dans le cancer,  
c'est que même un imbécile peut attraper une tumeur maligne. »*

*Philippe Geluck*

*Extrait de la bande dessinée Le Chat*

## I) Régulation de la fuite de Ca<sup>2+</sup> par le translocon

### I.A) Lors de la synthèse protéique

La fuite transitant par le translocon devrait varier en fonction de l'état physiopathologique de la cellule. En effet, une variation du taux de synthèse protéique induirait une variation du nombre de translocons actifs et modifierait, de ce fait, la fuite passive transitant par le translocon. Afin d'étudier cela, il serait intéressant de pouvoir mesurer le taux de synthèse protéique et de pouvoir corréler ce taux à la vidange induite par la puromycine.

### I.B) Lors d'un stress réticulaire

De plus, il a été décrit un système permettant aux protéines mal conformées qui se trouvent dans le RE de sortir vers le cytoplasme pour y être dégradées : il s'agit du système ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) (*Kaneko and Nomura 2003*). Le mécanisme par lequel les protéines sont dégradées est le suivant : les protéines mal maturées sortent par le canal formé par Sec61 qui serait directement couplé au protéasome. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le translocon pourrait faire sortir le calcium au cours d'un stress réticulaire mettant en jeu le système ERAD au moment où les protéines sortent par le canal du translocon.

Ainsi, grâce à ces études nous pourrions voir s'il existe un lien entre la fuite de calcium transitant par le translocon et l'état pathologique de la cellule.

### I.C) Par interaction avec les SERCAs

D'après les travaux de Brenner (*Stefanovic et al. 2004*), il existerait une interaction possible entre les SERCA et la protéine TRAM2 (protéine associée au translocon). Il serait donc intéressant de voir si des inhibiteurs spécifiques du translocon (anisomycine) ou des SERCA (thapsigargine) peuvent modifier cette interaction et par conséquent perturber l'équilibre physiologique entre la fuite transitant par le translocon et l'influx de calcium créé par les pompes SERCA.

L'activité des SERCA pourrait donc moduler la perméabilité du translocon.

## **II) Description du(es) rôle(s) physiologique(s) de TRPM8 dans la prostate.**

Afin de mieux appréhender le rôle physiologique de TRPM8 dans la prostate, nous avons initié le développement d'un modèle de souris Knock-out pour TRPM8. Ce modèle animal, en plus de nos études *in vitro*, devrait nous permettre d'appréhender un rôle de TRPM8 dans la fonction de reproduction. Nous réaliserons l'analyse fonctionnelle de la prostate pendant que notre laboratoire partenaire étudiera l'implication de TRPM8 dans les testicules et plus exactement dans la spermatogenèse.

Parmi les axes en développement, se trouve l'étude du rôle du PSA sur l'activité de TRPM8. Nos résultats préliminaires, non présentés dans cette thèse, suggèrent que l'application du PSA induit l'activation du courant TRPM8. Le but premier de cette étude pourrait être de déterminer le mécanisme moléculaire par lequel le PSA active le canal TRPM8.

Ce premier travail pourrait s'achever par l'étude du trio PSA,  $Zn^{2+}$  et TRPM8. En effet, l'ion  $Zn^{2+}$  est reconnu pour avoir un effet inhibiteur sur l'activité protéasique du PSA. En outre, il n'est pas à exclure que le canal TRPM8 pourrait faire transiter le  $Zn^{2+}$  du lumen vers le cytosol des cellules épithéliales apicales. Néanmoins, ce type de sujet nécessite le développement d'une lignée cellulaire présentant un phénotype proche de celui des cellules épithéliales sécrétrices matures.

Le développement d'un modèle de cellules épithéliales apicales sécrétrices est, depuis l'initiation du projet TRPM8, le point le plus important mais aussi le plus problématique que j'ai pu rencontrer. Comme nous l'avons expliqué au cours de cette thèse, la lignée LNCaP est la seule lignée cellulaire à exprimer la forme classique de TRPM8, mais n'est en aucun cas un modèle d'étude pour le rôle physiologique de TRPM8 puisqu'il n'est pas exprimé à la membrane de ces cellules. Les cultures primaires de cellules épithéliales ne produisent que peu de cellules, rapidement différenciées et présentant une certaine variabilité en fonction des patients et des zones prélevées. C'est pourquoi, dans le but de décrypter le rôle hypothétique de TRPM8 dans la sécrétion de l'épithélium prostatique, il reste essentiel de développer une lignée de cellules épithéliales apicales présentant les fonctions  $PM$ TRPM8 et  $ER$ TRPM8 et sécrétant le PSA. Par exemple, l'utilisation d'une lignée surexprimant le récepteur des androgènes pourrait peut-être présenter les deux activités de TRPM8. Une alternative possible serait de développer la coculture primaire de cellules épithéliales et de cellules musculaires lisses. En effet, nos premiers résultats semblent montrer un maintien de

l'expression du TRPM8 classique dans les cellules épithéliales dans ces conditions de coculture.

### **III) Implication de TRPM8 dans la métastase des cellules de la prostate**

Bien que n'étant pas un modèle de choix pour l'étude de la fonction normale de TRPM8, la lignée LNCaP reste un modèle cohérent pour l'étude du rôle de TRPM8 dans la métastase de la prostate. Plusieurs problématiques font ou devraient faire l'objet de recherches :

- (i) Comprendre les mécanismes moléculaires expliquant le rôle de l'activité  $_{ER}$ TRPM8 dans la prolifération et la survie de ces cellules.
- (ii) Rechercher une éventuelle corrélation entre le taux d'expression des isoformes de TRPM8 et le grade du cancer.
- (iii) Décrypter le mécanisme de rétention de TRPM8 dans le réticulum endoplasmique de ces cellules.
- (iv) Le développement de lignées cellulaires Knock-down pour TRPM8 ou réexprimant  $_{PM}$ TRPM8, et leur utilisation dans des modèles de xénogreffes pourraient permettre d'analyser l'impact de l'expression de TRPM8 et de sa rétention dans le réticulum endoplasmique sur le pouvoir métastatique de ces cellules.

### **IV) Régulation de l'activité du canal TRPM8.**

Certains de nos travaux préliminaires, non évoqués dans cette thèse, portent sur la régulation de l'activité du canal TRPM8 par le couple Protéine Kinase A (PKA) / PhosphoDiEstérase (PDE). Grâce à la génération, par mutagenèse dirigée, d'un canal TRPM8 dont l'unique site consensuel de phosphorylation par la PKA a été muté, nous avons mis en évidence que la phosphorylation de ce site est essentielle à l'activité du canal. D'autre part, l'inhibition de l'activité de la PKA provoque une diminution de l'activité du canal. La poursuite de ces travaux devrait permettre de confirmer ces résultats, d'essayer d'en comprendre le mécanisme et le rôle physiologique.

Le recouplement de nos travaux portant sur : 1) la régulation de  $PM$ TRPM8 par la phospholipase A2 indépendante du calcium, groupe VIA (iPLA2 $\beta$ ), 2) la mise en évidence d'une isoforme de TRPM8 spécifique de la membrane du réticulum endoplasmique, et 3) l'existence d'une phospholipase A2 indépendante du calcium, groupe VIB (iPLA2 $\gamma$ ), spécifique du réticulum endoplasmique (Kinsey *et al.* 2005), nous conduisent à émettre l'hypothèse que l'activité de la iPLA2 $\gamma$  dans le réticulum endoplasmique pourrait participer à la régulation physiologique de l'activité  $ER$ TRPM8. En effet, la iPLA2 $\gamma$  est encodée par un gène différent de celui encodant la iPLA2 $\beta$  et possède une séquence protéique différente de cette dernière (Mancuso *et al.* 2000). Cependant, iPLA2 $\beta$  et iPLA2 $\gamma$  présentent une conservation remarquable de leurs sites catalytiques et produisent les mêmes catabolites (lysophospholipides). Nos premiers résultats indiquent que l'ARN de l'iPLA2 $\gamma$  est exprimé dans la lignée cellulaire LNCaP, ainsi que dans les cellules musculaires lisses de la prostate. Nous développerons donc une approche utilisant l'ARN interférence contre l'iPLA2 $\gamma$  dans le but d'étudier son impact sur l'activité de  $ER$ TRPM8.

L'étude de la structure du pore ionique du canal TRPM8 est un axe de recherche capital dans l'optique de développer de nouveaux outils permettant de moduler sélectivement l'activité du canal TRPM8. Ainsi, la mutagenèse dirigée du pore ionique peut mener au développement de canaux mutants dont la sélectivité ionique serait modifiée ou encore de mutants inactivés du canal. Au-delà de l'analyse purement biophysique, ce type de mutant pourrait conférer la capacité d'altérer le fonctionnement du canal endogène de manière plus ciblée que l'extinction pure et simple du gène. Nous pourrions même envisager d'inhiber spécifiquement la fonction  $ER$ TRPM8 sans modifier  $PM$ TRPM8 ou réciproquement dans le but d'analyser le rôle de chacune de ces fonctions.

Enfin, nos travaux ont mis en évidence un système d'activations croisées de plusieurs canaux :  $ER$ TRPM8,  $PM$ TRPM8, SOC. En effet, nous avons démontré que l'activation de  $ER$ TRPM8 entraîne l'activation du SOC et que la vidange de  $Ca^{2+}$  réticulaire induite par l'application de la thapsigargine provoque l'activation de  $PM$ TRPM8 *via* l'iPLA2 $\beta$ .

La seule question restant en suspens dans ce schéma est de savoir si la vidange de  $Ca^{2+}$  réticulaire par  $ER$ TRPM8 peut entraîner l'activation de  $PM$ TRPM8 *via* l'iPLA2 $\beta$ . La génération d'un canal  $PM$ TRPM8 insensible à l'icilin et la cotransfection avec une isoforme  $ER$ TRPM8 activable par l'icilin pourraient nous permettre de tester cette hypothèse.

## **V) Etude du mécanisme d'activation des canaux SOCs**

Des études précédentes du laboratoire ont étudié l'implication des protéines TRP exprimées dans les cellules LNCaP, à savoir TRPC1, TRPC3 et TRPC4 dans le mécanisme d'activation des canaux SOCs. Dans ces études, l'inhibition spécifique de ces différentes protéines TRP a permis de démontrer l'implication de TRPC1 et TRPC4 dans le phénomène d'entrée capacitive de calcium. La protéine TRPC1 serait préférentiellement impliquée dans le SOC activé par couplage conformationnel. La protéine TRPC4 est quant à elle préférentiellement impliquée dans le SOC activé par le CIF.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons démontré que Orai est l'une des protéines responsables de l'entrée capacitive des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ainsi, il sera intéressant de poursuivre ce travail en étudiant les interactions éventuelles de Orai avec certains de ces canaux TRP. Des études réalisées par le Pr. Ambudkar semblent indiquer que Orai et TRPC1 peuvent interagir afin de former les canaux SOC. Il est donc primordial d'étudier l'interaction de ces canaux TRP avec Orai afin de mieux comprendre le mécanisme d'activation des canaux SOCs.

Il est également intéressant d'étudier si des mutations de Orai pourraient être responsables de certains cancers de la prostate. En effet, des mutations d'Orai sont responsables d'un grand nombre d'immonodéficiences chez l'homme. La détection de telles mutations pour le cancer de la prostate serait donc très novateur.

De plus, il est primordial de découvrir la nature moléculaire du CIF. La découverte d'Orai et de STIM (le senseur calcique réticulaire) pourrait faciliter cette recherche. En effet, l'une des hypothèses du laboratoire est que le CIF serait une partie clivée de STIM (quelques acides aminés). En effet, lors d'une vidange calcique, des enzymes  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes sont activées et pourraient cliver STIM. Cette partie de STIM détacherait la CaM de l'iPLA2 et ainsi activer les SOCs.



# Conclusion générale

*« Au pays des cyclopes, les borgnes sont aveugles. »*

*Philippe Geluck*

*Extrait de Le succulent du chat*

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont donc permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes de régulation de la concentration calcique intra-réticulaire dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ces nouveaux mécanismes peuvent être impliqués dans la cancérogenèse prostatique.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le rôle du translocon dans la régulation de la concentration calcique réticulaire. Nous avons également identifié le rôle des canaux TRPM8 et TRPV6 dans la signalisation calcique des cellules cancéreuses prostatiques humaines. L'expression, la localisation ainsi que la fonction de ces canaux varient en fonction du stade du cancer. Compte-tenu de leur accessibilité et de la spécificité de leur expression, ces canaux TRP sont autant de cibles pharmacologiques potentielles.

Enfin, nous avons découvert la nature moléculaire des canaux SOC. Orai serait impliqué dans longueurs qui est directement couplée à la vidange calcique réticulaire. Cette protéine est donc une nouvelle candidate en vue du développement de molécules pharmacologiques contre le cancer de la prostate.

# Publications

*« Il m'arrive de me parler à moi-même pour être certain que quelqu'un m'écoute. »*

*Philippe Geluck*

*Extrait de la bande dessinée Le Chat*

1. Flourakis M., Beck B., Lehen'kyi, V., Roudbaraki, M., Skryma, R., and Prevarskaya N. Orai 1 downregulation: a missing link in understanding the prostate cancer apoptosis resistance (Soumis, Cancer Research).
2. Flourakis M., Bidaux G., Beck B., Gordienko D., Roudbaraki, M., and Prevarskaya N. Involvement of ER-TRPM8 in prostate smooth muscle cells contraction (en préparation).
3. Prevarskaya, N., Skryma, R., Bidaux, G., Flourakis, M., and Shuba, Y. 2007. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 14:1295-1304.
4. Prevarskaya, N., Flourakis, M., Bidaux, G., Thebault, S., and Skryma, R. 2007. Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans* 35:133-135.
5. Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., and Prevarskaya, N. 2007. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*.
6. Flourakis, M., Bidaux, G., 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.
7. Beck, B., Lehen'kyi, V., Roudbaraki, M., Flourakis, M., Charveron, M., Bordat, P., Polakowska, R., Prevarskaya, N., and Skryma, R. 2007. TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: New insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium*.
8. Vanden Abeele, F., Zholos, A., Bidaux, G., Shuba, Y., Thebault, S., Beck, B., Flourakis, M., Panchin, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. 2006. Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids. *J Biol Chem* 281:40174-40182.
9. 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 Ca<sup>2+</sup> entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* 66:2038-2047.
10. Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R., and Prevarskaya, N. 2006. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *Faseb J* 20:1215-1217.
11. 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.
12. 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.

# Annexes

*« Moi tout le monde m'attend au tournant, voilà pourquoi j'ai décidé d'aller tout droit. »*

*Philippe Geluck*

*Extrait de Ma langue au chat*

Pour des raisons de compréhension, je vais présenter dans cette partie deux études annexes que j'ai mené au cours de la thèse. La première étude est basée sur le rôle des canaux TRP dans la cancérogenèse prostatique. La deuxième étude s'attache à découvrir l'un des mécanismes d'activation des canaux SOC.

## **I) Rôle des canaux de type TRP dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques.**

### **Differential role of Transient Receptor Potential channels in Ca<sup>2+</sup> entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells.**

Stephanie Thebault, Matthieu Flourakis, Karine Vanoverberghe, Franck Vandermoere, Morad Roudbaraki, V'yacheslav Lehen'kyi, Christian Slomianny, Benjamin Beck, Pascal Mariot, Jean-Louis Bonnal, Brigitte Mauroy, Yaroslav Shuba, Thierry Capiod, Roman Skryma, et Natalia Prevarskaya

Des travaux effectués au laboratoire ont démontré que des antagonistes  $\alpha 1A$ -adrénergiques ainsi qu'un inhibiteur des canaux de type ROC inhibent à la fois l'entrée calcique et l'augmentation de la prolifération résultant de l'activation des récepteurs  $\alpha 1A$ -adrénergiques dans la lignée LNCaP. Par ailleurs, il a été montré au laboratoire que longueurs induit un arrêt de la croissance cellulaire d'une lignée androgéno-indépendante, les DU-145 (Vanoverberghe, Mariot, Vanden Abeele et al. 2003). Afin d'étudier plus précisément les voies par lesquelles ces influx calciques ont lieu et leur implication dans la régulation de la prolifération cellulaire, nous avons établi un modèle de culture primaire de cellules épithéliales cancéreuses prostatiques humaines issues de biopsies, qui exprime les récepteurs  $\alpha 1A$ -adrénergiques et purinergiques et qui s'avère plus informatif d'un point de vue clinique que les lignées.

Tout d'abord, nous avons confirmé que la stimulation des récepteurs  $\alpha 1A$ -adrénergiques promeut la prolifération cellulaire alors que celle des récepteurs purinergiques induit un arrêt de croissance dans les cultures primaires.

En outre, l'activation des récepteurs  $\alpha 1A$ -adrénergiques génère un courant à forte rectification entrante qui est suivi d'oscillations calciques régulières qui sont sensibles au calcium extracellulaire. Grâce à un vecteur rapporteur de l'activation de facteurs de transcription tels que NFAT (« Nuclear Factor of Activated T-cell ») et NFkB (« Nuclear Factor kappa B »), nous avons observé que les oscillations calciques induisent la translocation du facteur de transcription NFAT alors que NFkB est constitutivement actif. En utilisant la stratégie des oligonucléotides antisens dirigés contre chaque canal TRPC exprimé

dans notre modèle, nous avons montré que le canal TRPC6 était spécifiquement impliqué dans l'influx calcique déclenché par la voie alpha1A-adrénergique ainsi que dans son action sur la prolifération cellulaire. Enfin, contrairement à la voie alpha1A-adrénergique, la voie purinergique n'active ni le canal TRPC6 ni celle du facteur NFAT pour induire l'arrêt de croissance cellulaire.

**Nous montrons donc que la stimulation de la voie alpha1A-adrénergique dépendante du calcium augmente la prolifération cellulaire *via* l'activation spécifique du canal TRPC6 couplé à NFAT dans les cellules épithéliales prostatiques cancéreuses humaines.**



## Research Article

Differential Role of Transient Receptor Potential Channels in Ca<sup>2+</sup> Entry and Proliferation of Prostate Cancer Epithelial Cells

Stephanie Thebault,<sup>1</sup> Matthieu Flourakis,<sup>1</sup> Karine Vanoverberghe,<sup>1</sup> Franck Vandermoere,<sup>2</sup> Morad Roudbaraki,<sup>1</sup> Vyacheslav Lehen'kyi,<sup>1</sup> Christian Slomianny,<sup>1</sup> Benjamin Beck,<sup>1</sup> Pascal Mariot,<sup>1</sup> Jean-Louis Bonnal,<sup>1</sup> Brigitte Mauroy,<sup>1</sup> Yaroslav Shuba,<sup>1</sup> Thierry Capiod,<sup>1</sup> Roman Skryma,<sup>1</sup> and Natalia Prevarskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and <sup>2</sup>Laboratoire de Biologie du Développement, Centre National de la Recherche Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

## Abstract

One major clinical problem with prostate cancer is the cells' ability to survive and proliferate upon androgen withdrawal. Because Ca<sup>2+</sup> is central to growth control, understanding the mechanisms of Ca<sup>2+</sup> homeostasis involved in prostate cancer cell proliferation is imperative for new therapeutic strategies. Here, we show that agonist-mediated stimulation of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors ( $\alpha_1$ -AR) promotes proliferation of the primary human prostate cancer epithelial (hPCE) cells by inducing store-independent Ca<sup>2+</sup> entry and subsequent activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor. Such an agonist-induced Ca<sup>2+</sup> entry (ACE) relied mostly on transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) channels, whose silencing by antisense hybrid depletion decreased both hPCE cell proliferation and ACE. In contrast, ACE and related growth arrest associated with purinergic receptors (P2Y-R) stimulation involved neither TRPC6 nor NFAT. Our findings show that  $\alpha_1$ -AR signaling requires the coupled activation of TRPC6 channels and NFAT to promote proliferation of hPCE cells and thereby suggest TRPC6 as a novel potential therapeutic target. (Cancer Res 2006; 66(4): 2038-47)

## Introduction

After androgen escape, the prostate tumor cell proliferation becomes independent of normal growth control mechanisms. Various growth factors, neurotransmitters, and hormones, known to control physiologic and pathologic cell proliferation, participate in the maintenance of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Although the nature of these agonists has yet to be well established during prostate cancer progression, they invariably induce a Ca<sup>2+</sup> entry called "agonist-induced Ca<sup>2+</sup> entry" (ACE; refs. 1-4).

Despite  $\alpha_1$ -adrenoceptor ( $\alpha_1$ -AR) antagonists being already widely used for the clinical treatment of benign prostate hyperplasia (5), the exact role of  $\alpha_1$ -AR-coupled signaling pathway in prostate cancer growth control remains unclear.  $\alpha_1$ -AR antagonists induce apoptosis in human prostate cancer epithelial (hPCE) and smooth muscle cells without affecting the cellular proliferation (6), independently of their effects on  $\alpha_1$ -AR (7, 8). Using an androgen-

dependent lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cell line (9), we have previously shown that  $\alpha_1$ -AR stimulation activates nonspecific cationic channels leading to ACE (10).

Interestingly, we have also shown that in contrast to the stimulatory role of  $\alpha_1$ -ARs on prostate cancer cell growth, metabotropic purinergic receptors (P2Y-R) are involved in the growth arrest of DU-145 human prostate cancer cells (11). Such divergent effects of two receptors on cell proliferation are surprising, because both  $\alpha_1$ -AR and P2Y-R are known to be coupled to the common phospholipase C (PLC)-catalyzed inositol phospholipids breakdown signaling pathway, via which  $\alpha_1$  agonists and extracellular ATP are capable of inducing apparently similar increases in intracellular free Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; refs. 12, 13). The opposite end effects on cell proliferation can only be explained if the ACE controlled by each receptor uses different but still undetermined Ca<sup>2+</sup>-permeable membrane channels ultimately destined to target various intracellular effectors. Currently, the members of the extensively studied transient receptor potential (TRP) channel family, especially TRP canonical (TRPC) subfamily (14), are considered as the most promising candidates as underlying various types of ACE, including ACE involved in proliferative cell activity (15-18). However, the involvement of TRPs in the mechanisms of translation of generated Ca<sup>2+</sup> signal into proliferative activity of prostate cancer cells is far from being understood.

The expression of genes involved in cell proliferation and apoptosis is regulated by nuclear transcriptional factors. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins represent a family of Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription factors (19) whose activity is regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin (19). Another ubiquitously expressed transcription factor is represented by the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) family (20), which is known to be dependent on Ca<sup>2+</sup> homeostasis, especially on the filling status of Ca<sup>2+</sup> endoplasmic reticulum (ER) stores (14).

In the present study, we asked first whether the divergent effects on prostate cancer epithelial cell proliferation of ACE triggered by distinct membrane receptors via common signaling cascade could be explained by different coupling efficiencies of Ca<sup>2+</sup> entry pathways involved in either NFAT or NF- $\kappa$ B activation. Second, we wished to ascertain, if the latter were so, what type of membrane channels underlies these pathways. To this end, we used primary cultures of hPCE cells established from resection specimens, which is much more relevant from practical perspectives than using cell lines.

## Materials and Methods

**Primary culture.** Human prostate specimens were mechanically dissociated and then cultivated in KSF medium (Life Technologies Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) supplemented with 50  $\mu$ g/mL bovine pituitary extract and 50 ng/mL epidermal growth factor to

**Note:** Y. Shuba is currently at the Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Bogomoletz Street, 4, 01024 Kiev, Ukraine.

M. Hourakas and K. Vanoverberghe contributed equally to this work.

**Requests for reprints:** Stephanie Thebault, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale EMI 0228, Bâtiment SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: 33-3-20-43-40-77; E-mail: stephanie.thebault@yahoo.fr.

©2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CCR-05-0376

specifically select epithelial cells. Each sample was analyzed by immunofluorescence staining to verify the epithelial marker expression (cytokeratins 14 and 18; ref. 21; data not shown). The culture medium also contained 50,000 IU/L penicillin and 50 mg/L streptomycin. Cells were routinely grown in 50-mL flasks (Nunc, Poly Labo, Strasbourg, France) and kept at 37°C in a humidified incubator in an 95% air/5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For electrophysiology and calcium imagery experiments, the cells were subcultured in Petri dishes (Nunc, Naperville, IL) and used after 3 to 6 days. Each primary culture was only maintained for 2 weeks to prevent the loss of their differentiated phenotype.

We used specimens from four localized prostate cancers of Gleason score 8 to 10, prostate-specific antigen (PSA) level of  $\geq 4.0$  ng/mL, and clinical tumor stage T<sub>2</sub>, from patients having undergone a radical prostatectomy, selected on the criteria that the tumors were nonmetastatic, and had no history of chemotherapy and/or antiandrogen therapy. Thus, the prostate cancer epithelial cells derived from the specimens most likely represented androgen-dependent population. The absence of normal epithelial cells was confirmed by independent histologic and anatomopathologic analyses. All experimentations on patients tissues were done according to the medical ethics under the agreement number "CP 01/33" delivered by the "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille."

**Calcium imaging.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured using fura-2 (as previously described; refs. 22, 23). The extracellular solution contained 120 mmol/L NaCl, 6 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L HEPES, and 12 mmol/L glucose. For Ca<sup>2+</sup>-free HBSS, CaCl<sub>2</sub> was removed, and EGTA (0.5 mmol/L) was added.

**Electrophysiology and solutions.** Whole-cell patch-clamp techniques were used for current recording, as detailed elsewhere (24, 25). The extracellular solution contained 150 mmol/L NMG, 20 mmol/L CsCl or 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 20 mmol/L TEA(Cl) at pH 7.3 (adjusted with HCl). The intracellular solution contained 125 mmol/L NMG, 10 mmol/L HCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.6 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (calculated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> = 100 nmol/L),

10 mmol/L HEPES, 8 mmol/L EGTA, and 20 mmol/L NaCl at pH 7.2 (adjusted with glutamic acid).

**Reverse transcription-PCR analysis.** Total RNA from the hPCE cells was isolated as previously detailed (10). For the PCR reaction, specific sense and antisense primers were designed, based on Genbank hTRP sequences, using GeneJockey II (Biosoft, Cambridge, United Kingdom) as listed in Table 1. To further identify the PCR-amplified products, each PCR band was subjected either to the restriction analysis using the specific enzymes for each amplified fragment or subcloned in TA-cloning vector (Invitrogen, San Diego, CA) followed by the sequencing analysis.

The sequences of selected oligonucleotides used as sense and antisense are presented in Table 1.

**Transient transfection.** For antisense assays, the sense (control) and antisense oligonucleotides (Eurogentec, Southampton, United Kingdom) targeted against each TRPC (TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6) were designed at the initiating ATG codon level (see Table 1 for sequences). The hPCE cells treated for up to 72 hours with either 0.5  $\mu$ mol/L phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides and 2.5  $\mu$ mol/L cytofectin (GS 3815 to DOPE at a 2:1 molar ratio, unsized; Eurogentec) or sense oligodeoxynucleotides by adding them directly to the culture medium. The oligodeoxynucleotides transfection procedures were as detailed previously (26).

**Cis-reporting systems** (pNFAT-Luc plasmid, pNF-kBLuc plasmid and pCIS/CK negative control plasmid) were provided by Stratagene (Pathdetect In vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting Systems, La Jolla, CA). hPCE cells maintained in DMEM-HG were plated in six-well plates overnight and transfected with the cis-reporting system selected using Geneporter-2 (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) in 2 mL serum-free DMEM-HG. After 8 hours, 2 mL serum-free media were added, containing either 10  $\mu$ mol/L phenylephrin or 100  $\mu$ mol/L ATP (Sigma, St. Louis, MO).

**Western blot.** TRPC6, cyclin-dependent kinase 4 (cdk4), cdk inhibitor p27 (p27),  $\beta$ -actin, and calnexin protein expression was assayed by Western blot with anti-TRPC6-specific (ACC-017, Alomone, Jerusalem, Israel),

**Table 1.** Sequences of selected oligonucleotides used as reverse transcription-PCR primers or as sense and antisense

Targets fragment	Oligonucleotides sequences	Position in Genbank sequence (accession no.)	Expected size (bp)
<b>PCR primers</b>			
hTRPC1	Forward: 5'-AGTGGGAACGACTCATCCTTTT-3'	300-322 (NM_003304)	632 (TRPC1)
	Backward: 5'-CATAGTTGTACGATGAGCAGC-3'	931-910 (NM_003304)	530 (TRPC1A)
hTRPC3	Forward: 5'-CTTCTCTAGGTCCATGGAGGGAA-3'	150-172 (U47050)	417
	Backward: 5'-TCAGAGTGAGACGCTTGCTGGC-3'	568-547 (U47050)	
hTRPC4	Forward1: 5'-GCAGAGACGAAGAAATAGCATGGCA-3'	205-229 (AF063822)	455
	Backward1: 5'-CTGGAGTGAATTCAGAGAACTGCT-3'	659-636 (AF063822)	
hTRPC4	Forward2: 5'-CTCTGGTTGTTCTACTCAACATG-3'	2058-2082 (AF063822)	781 (TRPC4)
	Backward2: 5'-CCTGTTGACGAGCAACTTCTTCT-3'	2861-2839 (AF063822)	528 (TRPC4b) 356 (TRPC4d) 332 (TRPC4g)
hTRPC6	Forward1: 5'-TTCCCGCCATGAGCCAC-3'	420-436 (AJ006276)	208
	Backward1: 5'-CGGTGAGCCAGTCTGTGTCAGAT-3'	627-604 (AJ006276)	
hTRPC6	Forward2: 5'-GAACTTAGCAATGAACTGGCAGT-3'	1322-1345 (AJ006276)	625 (TRPC6)
	Backward2: 5'-CATATCATGCCTATTACCCAGGA-3'	1947-1925 (AJ006276)	461 (TRPC6b) 277 (TRPC6g)
Actin	Forward: 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3'	248-267 (NM_001101)	210
	Backward: 5'-GTTGAAGGICTCAAACATGATC-3'	457-436 (NM_001101)	
<b>Sense and antisense oligonucleotides</b>			
hTRPC1	Antisense: 5'-GCCATCATCGCGGCCAT-3'	405-388 (NM_003304)	
	Sense: 5'-ATGGGCCGCGATGATGC-3'	388-405 (NM_003304)	
hTRPC3	Antisense: 5'-CCATGGACCTAGAGAAGC-3'	166-149 (U47050)	
	Sense: 5'-GCTTCTCTAGGTCCATGG-3'	149-166 (U47050)	
hTRPC4	Antisense: 5'-GTAATAGAAGCTAGCCAT-3'	236-253 (AF063822)	
	Sense: 5'-ATGGCTCAGTCTTATTAC-3'	253-236 (AF063822)	
hTRPC6	Antisense: 5'-TCTGGCTCATGGCGGGAA-3'	437-420 (AJ006276)	
	Sense: 5'-TTCCCGCCATGAGCCAGA-3'	420-437 (AJ006276)	

## Cancer Research

anti-cdk4-specific (NCL-cdk4-35 from Novocastra, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), anti-p27-specific (sc-1641 from Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA), anti- $\beta$ -actin-specific (Lab Vision Co., Fremont, CA), and anti-calnexin-specific (SPA-860, Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada) antibodies, as previously described (25). Quantification of the band intensity was done by densitometry on Quantity-One software (Bio-Rad, Hercules, CA). For each experiment, the signal intensity obtained for TRPC6, cdk4, and p27 were normalized to calnexin or  $\beta$ -actin value, as loading control.

**Immunofluorescence staining.** cdk4 and cdk inhibitor p27 expression was assessed by immunofluorescence staining with cdk4 (NCL-cdk4-35 from Novocastra) and p27 (sc-1641 from Santa Cruz Technology) antibodies as previously described (10).

**Luciferase assay.** The cultures were harvested for luciferase activities 48 hours after transfection. After cell lysis, the level of extracted luciferase from these cells was determined by bioluminescence measurement (Biocounter M1500 luminometer, Lumac, Landgraaf, the Netherlands) using the Luciferase Assay kit (Kit Galacto-Light, Tropix).

**Proliferation assays.** The CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corp., Madison, WI) was used to determine the number of viable cells in proliferation as previously described (10). Cells were seeded at an initial density of  $7.5 \times 10^3$  per well in 96-well plates (Poly Labo). After 48 hours of treatment or growth in control conditions, cells were trypsinized, transferred to separate tubes, and centrifuged at  $350 \times g$  for 10 minutes. Each well in the 96-well plate was carefully inspected in the microscope to make sure that all cells were recovered. The supernatant after centrifugation was poured off; the cells were carefully suspended and counted in a Malassez chamber.

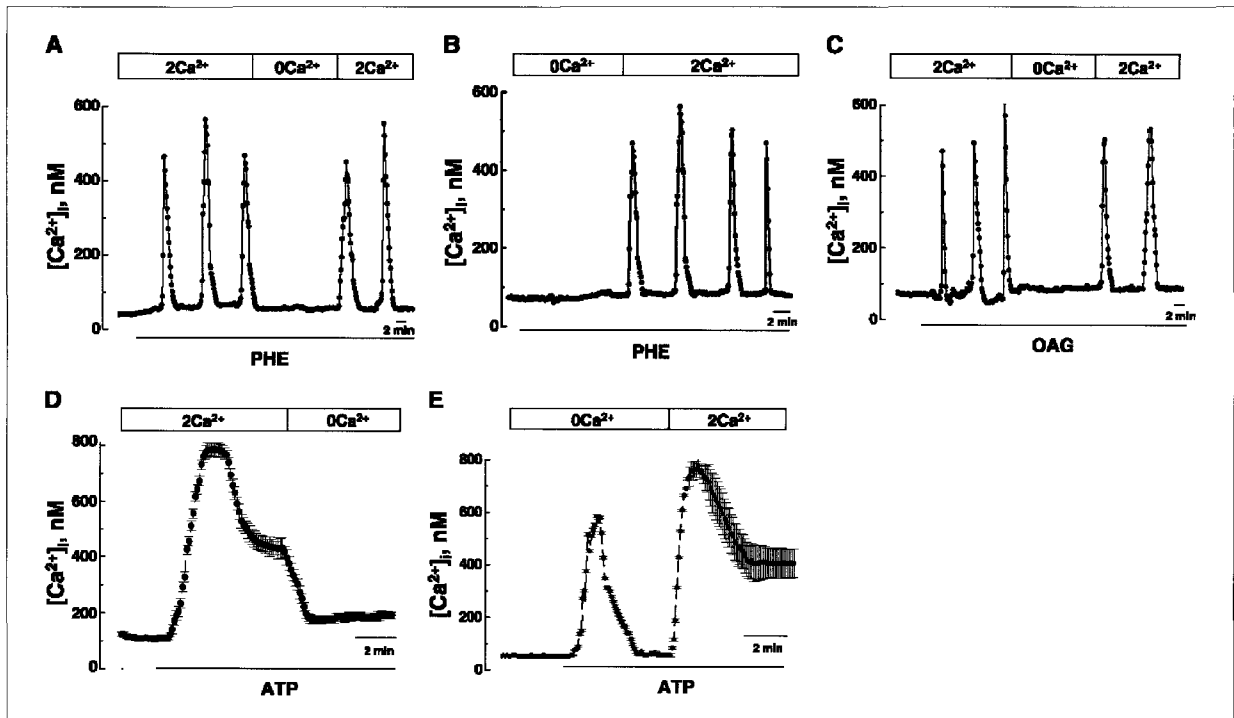
**Data analysis.** Each experiment was repeated several times, and the results were expressed as mean  $\pm$  SE where appropriate. Data analysis was done by using Origin 5.0 software (Microcal, Northampton, MA).

## Results

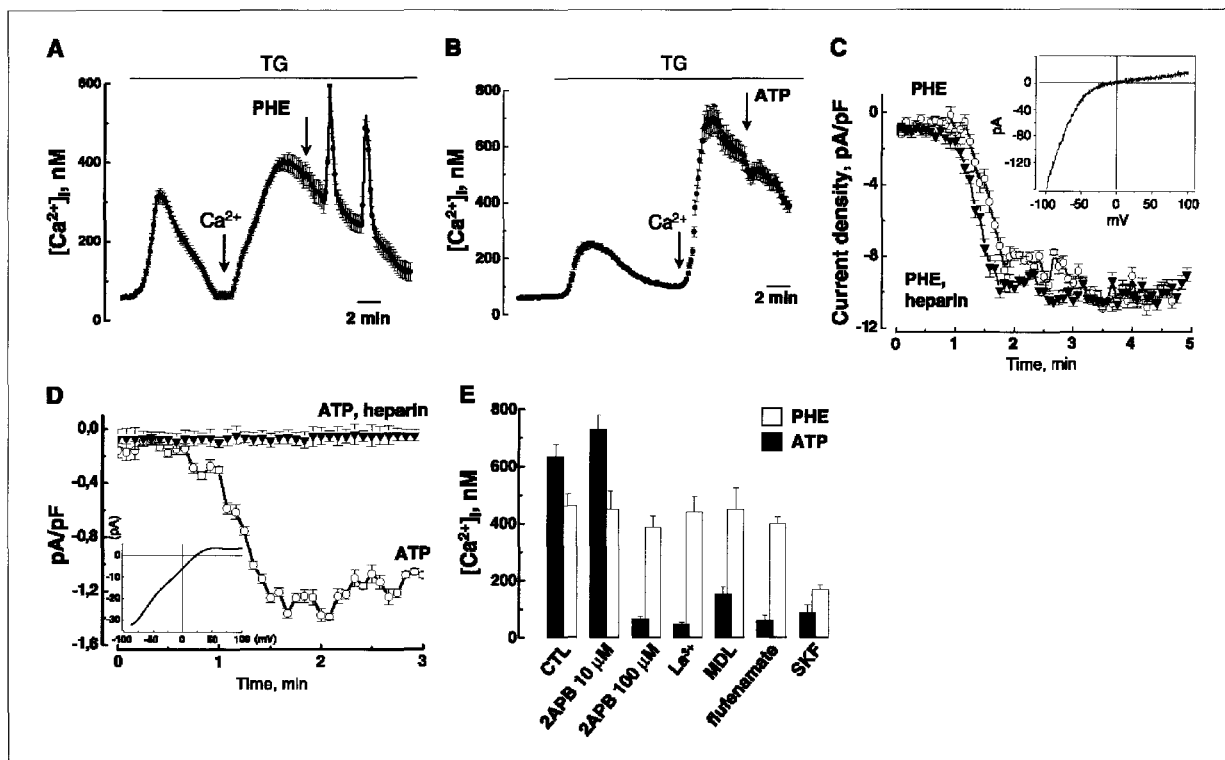
**$\alpha_1$ -AR- and P2Y-R-coupled  $\text{Ca}^{2+}$  signaling involves different types of  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways in hPCE cells.** Both  $\alpha_1$ -adrenergic and P2Y-purinergic receptors are known to stimulate PLC-catalyzed inositol phospholipids breakdown, resulting in the derivation of two secondary messengers important for  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: inositol trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) and diacylglycerol (DAG).  $\text{IP}_3$  releases  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores, and the concomitant store depletion activates  $\text{Ca}^{2+}$  influx via store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (SOC), whereas DAG induces  $\text{Ca}^{2+}$  entry by directly gating some cationic  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable membrane channels. Interplay among various sources of  $\text{Ca}^{2+}$  largely determines the profile of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

We first sought to examine the specifics of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  signals elicited by the stimulation of each receptor in hPCE cells. This was done based on fluorimetric  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  measurements on hPCE cells loaded with  $\text{Ca}^{2+}$  indicator fura-2AM in response to the bath applications of an  $\alpha_1$ -specific agonist, phenylephrine, or a purinergic receptor agonist, ATP.

Figure 1A shows that phenylephrine (10  $\mu\text{mol/L}$ ) elicited regular slow intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. The quantification of the amplitude and temporal variables of these oscillations ( $n = 67$  cells) provided the  $\text{Ca}^{2+}$  wave peak value of  $512 \pm 43$  nmol/L, the average wave duration of  $2.18 \pm 0.13$  minutes, and the average period of wave generation of  $4.2 \pm 1.06$  minutes. Phenylephrine-evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations were strictly dependent on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ ) completely vanishing upon its withdrawal (Fig. 1A), thereby suggesting the absolute requirement of  $\text{Ca}^{2+}$  influx across the plasma membrane for their support. Moreover, first time



**Figure 1.**  $\alpha_1$ -AR- and P2Y-purinoreceptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in primary hPCE cells. A and B, patterns of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by  $\alpha_1$ -AR agonist phenylephrine (PHE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) in hPCE cells initially maintained either in 2 mmol/L (A, 2/ $\text{Ca}^{2+}$ ,  $n = 67$ ) or 0 mmol/L (B, 0/ $\text{Ca}^{2+}$ ,  $n = 98$ ) extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and their sensitivity to the subsequent  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  variations. C, pattern of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by the membrane-permeable DAG analogue OAG (100  $\mu\text{mol/L}$ ,  $n = 79$ ) in hPCE cells maintained at 2 mmol/L  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  (2/ $\text{Ca}^{2+}$ ) and its sensitivity to extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  removal (0/ $\text{Ca}^{2+}$ ). D and E, patterns of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by P2Y-R agonist ATP (100  $\mu\text{mol/L}$ ) in hPCE cells initially maintained either in 2 mmol/L (D, 2/ $\text{Ca}^{2+}$ ,  $n = 93$ ) or 0 mmol/L (E, 0/ $\text{Ca}^{2+}$ ,  $n = 64$ )  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  and their sensitivity to the subsequent  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  variations. Points, means; bars, SE. All interventions are marked by horizontal bars.



**Figure 2.** Differential store-dependency of  $\alpha_1$ -AR- and P2Y-R-mediated responses in the primary hPCE cells. **A** and **B**,  $[Ca^{2+}]_i$  changes in response to hPCE cell exposure to thapsigargin (TG, 1  $\mu$ mol/L) showing  $Ca^{2+}$  liberation under 0 mmol/L  $[Ca^{2+}]_{out}$  ( $0/Ca^{2+}$ ) followed by SOCE upon addition of 2 mmol/L  $[Ca^{2+}]_{out}$  ( $2/Ca^{2+}$ ) and the ability of phenylephrine (PHE, 10  $\mu$ mol/L,  $n = 61$ , **A**) but not ATP (100  $\mu$ mol/L,  $n = 63$ , **B**) to evoke characteristic  $[Ca^{2+}]_i$  signal on top of thapsigargin-induced SOCE. Points, mean ( $n = 61$  (**A**) and  $n = 63$  (**B**)); bars, SE. **C** and **D**, averaged time courses of the inward whole-cell membrane currents activated by phenylephrine (10  $\mu$ mol/L, **C**) and ATP (10  $\mu$ mol/L, **D**) in hPCE cells under control conditions (open symbols in **C** and **D**) and following the cell's predialysis with  $IP_3$ -receptor antagonist heparin (0.1 g/L, filled symbols in **C** and **D**) via patch pipette. Currents were measured at membrane potential  $-100$  mV and related to the cells' capacitance to yield current density (pA/pF) before averaging. *I/V* relationships of phenylephrine and ATP-evoked currents (inset, **C** and **D**). Points, means ( $n = 5-11$ ); bars, SE. **E**, quantification of the effects of common cationic channels inhibitors, 2-APB (10 and 100  $\mu$ mol/L),  $La^{3+}$  (1 mmol/L), MDL (100  $\mu$ mol/L), flufenamate (50  $\mu$ mol/L), and SK&F 98365 (SKF, 10  $\mu$ mol/L), on the amplitude of phenylephrine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (white columns) and ATP-induced SOCE (black columns) in hPCE cells. Columns, means ( $n = 95-102$ ); bars, SE.

phenylephrine application in  $Ca^{2+}$ -free solution did not cause the mobilization of intracellularly stored  $Ca^{2+}$  (Fig. 1B;  $n = 98$ ), hence indicating the poor accessibility of  $IP_3$ -dependent stores for  $\alpha_1$ -AR-triggered signaling and pointing to DAG as a major messenger in this signaling pathway.

Consistent with this notion and in a full agreement with our previous studies (10, 27), the application of 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG, 100  $\mu$ mol/L), a membrane-permeable DAG analogue, exactly mimicked phenylephrine action in terms of inducing  $[Ca^{2+}]_{out}$ -dependent  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (Fig. 1C). OAG-induced oscillations even had the same amplitude ( $546 \pm 39$  nmol/L,  $n = 79$ ), duration ( $1.81 \pm 0.22$  minutes), and period ( $3.1 \pm 0.9$  minutes) as the phenylephrine-induced ones, suggesting common mechanisms downstream from DAG and basically ruling out any essential involvement in the  $IP_3$ -dependent processes.

In contrast to these observations, ATP (100  $\mu$ mol/L) evoked a large transient  $[Ca^{2+}]_i$  increase ( $763 \pm 25$  nmol/L,  $n = 93$ ) followed by a sustained plateau on a considerably lower level, which was sensitive to extracellular  $Ca^{2+}$  removal (Fig. 1D). Initially administered in the  $Ca^{2+}$ -free solution, ATP caused only a transient  $[Ca^{2+}]_i$  elevation of  $580 \pm 28$  nmol/L ( $n = 64$ ) without a plateau, as one would expect for pure intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization (Fig. 1E). The reintroduction of

$Ca^{2+}$  in the continuing presence of ATP produced a rapid  $[Ca^{2+}]_i$  increase followed by a slow decline (Fig. 1E), probably reflecting the  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation mechanism of underlying membrane  $Ca^{2+}$  influx channels. Thus, experiments with ATP provide clear evidence for the contribution of both  $Ca^{2+}$  release and  $Ca^{2+}$  entry in overall  $[Ca^{2+}]_i$  and suggest that P2Y-R-controlled  $Ca^{2+}$  signaling mostly recruits  $IP_3$ - and store-dependent processes in hPCE cells.

Altogether, the results strongly suggest that  $Ca^{2+}$  entry pathways participating in  $\alpha_1$ -AR-mediated signaling rely on store-independent DAG-gated membrane channels, whereas P2Y-R-mediated signaling engages plasma membrane SOCs, which are activated upon  $IP_3$ -dependent  $Ca^{2+}$  store depletion.

**Differential store dependency of phenylephrine- and ATP-stimulated ACE.** To obtain more direct evidence of the differing store dependency and origin of  $Ca^{2+}$  entry pathways involved in  $\alpha_1$ -AR- and P2Y-R-mediated signaling, we used several approaches. In the first one, we tested for phenylephrine and ATP effects on the background of the ER  $Ca^{2+}$  store depletion produced by thapsigargin, a known store-depleting agent acting via inhibition of SERCA-pump  $Ca^{2+}$  uptake. In the second, we examined the effect of  $IP_3$  receptor inhibition by heparin on the ability of phenylephrine and ATP to activate membrane currents. Finally, we screened a

Cancer Research

number of blockers of various types of native cationic channels and TRP members on their ability to inhibit phenylephrine- and ATP-induced  $[Ca^{2+}]_i$  responses.

In the experiments with thapsigargin, we applied it first in  $Ca^{2+}$ -free solution to liberate intracellularly stored  $Ca^{2+}$  and then we readed  $Ca^{2+}$  to initiate store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE). As Fig. 2A shows, if phenylephrine was applied during thapsigargin-induced SOCE, it was still able to activate characteristic  $Ca^{2+}$  oscillations on top of SOCE ( $n = 61$ ). In contrast, the same type of ATP application failed to produce any change in  $[Ca^{2+}]_i$  on top of thapsigargin-induced SOCE (Fig. 2B;  $n = 63$ ).

The inclusion of the  $IP_3$  receptor antagonist heparin (0.1 g/L) in the intracellular pipette solution used in the whole-cell, patch-clamp experiments did not affect phenylephrine-induced membrane current (Fig. 2C) but totally abrogated ATP-evoked current (Fig. 2D;  $n = 5-11$ ). Phenylephrine and ATP both activated inwardly rectifying membrane currents: *I-V* relationships for both currents are presented in *inset* of Fig. 2C and D. Phenylephrine-evoked current reached its full amplitude in about  $2.0 \pm 0.7$  minutes, and its average density was  $11 \pm 1.5$  pA/pF at  $V_m = -100$  mV ( $n = 11$ ), whereas the average density of ATP-induced current, which reached its full amplitude in about  $1.5 \pm 0.8$  minutes, was  $1.3 \pm 0.6$  pA/pF at  $V_m = -100$  mV ( $n = 5$ ).

We also compared the effects of such widely used inhibitors of store-dependent and store-independent membrane  $Ca^{2+}$  transport as 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB),  $La^{3+}$ , MDL, flufenamate, and SK&F 96365 on phenylephrine- and ATP-induced  $Ca^{2+}$  entry. Given that none of the drugs used was able to affect the temporal

variables of phenylephrine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations, their effectiveness was evaluated on the basis of their ability to reduce either the amplitude of oscillations in the event of phenylephrine or maximal  $[Ca^{2+}]_i$  elevation following  $Ca^{2+}$  readdition in the event of ATP. As shown in Fig. 2E ( $n = 95-102$ ), all agents except for 2-APB at low (10  $\mu$ mol/L) concentration strongly inhibited the ATP-induced response. They exerted virtually no effect on the phenylephrine-induced one except for the SK&F 96365, which blocked the response to phenylephrine by about 50%. Such divergent sensitivity is again consistent with the substantial role played by store-dependent processes in ATP actions but not in those of phenylephrine, because all the agents used are generally known to be more specific to store-operated channels than to other types of cationic channels. Moreover, although 2-APB effects can block both  $IP_3$  receptors and SOCs (28), its ability to stimulate ATP response at a low concentration (10  $\mu$ mol/L) and to inhibit it at a high concentration (100  $\mu$ mol/L) agrees closely with the known dual potentiation/inhibition 2-APB action on SOCs (28).

Thus, our results unequivocally show that in hPCE cells, ATP-stimulated P2Y-R-coupled  $Ca^{2+}$  signaling involves  $Ca^{2+}$  entry via store-operated membrane channels, whereas phenylephrine-stimulated  $\alpha_1$ -AR-coupled  $Ca^{2+}$  signaling involves  $Ca^{2+}$  entry via store-independent DAG-gated  $Ca^{2+}$  permeable cationic channels.

**TRPC channel expression in hPCE cells.** To define the molecular identity of the channels underlying phenylephrine- and ATP-induced ACE, using specific primers (Table 1) and the reverse transcription-PCR technique, we first studied the expression of the mRNA of the human isoforms of the TRPCs (TRPC1, TRPC3,

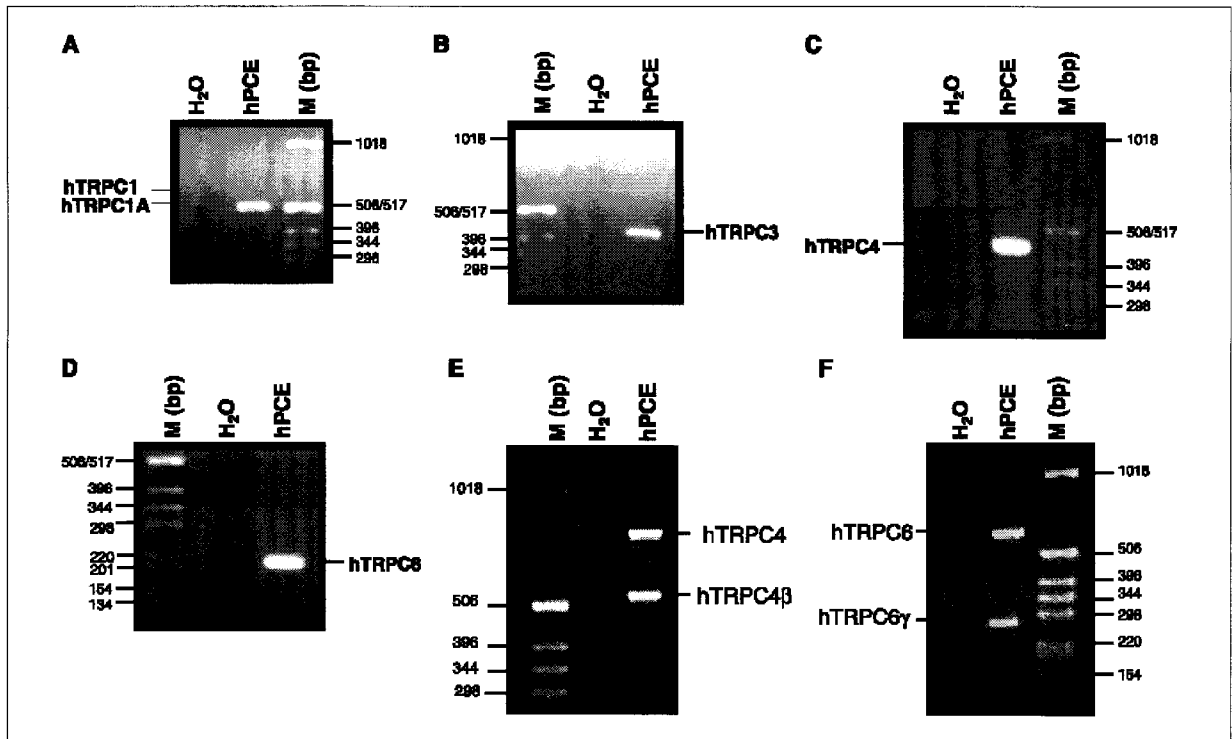
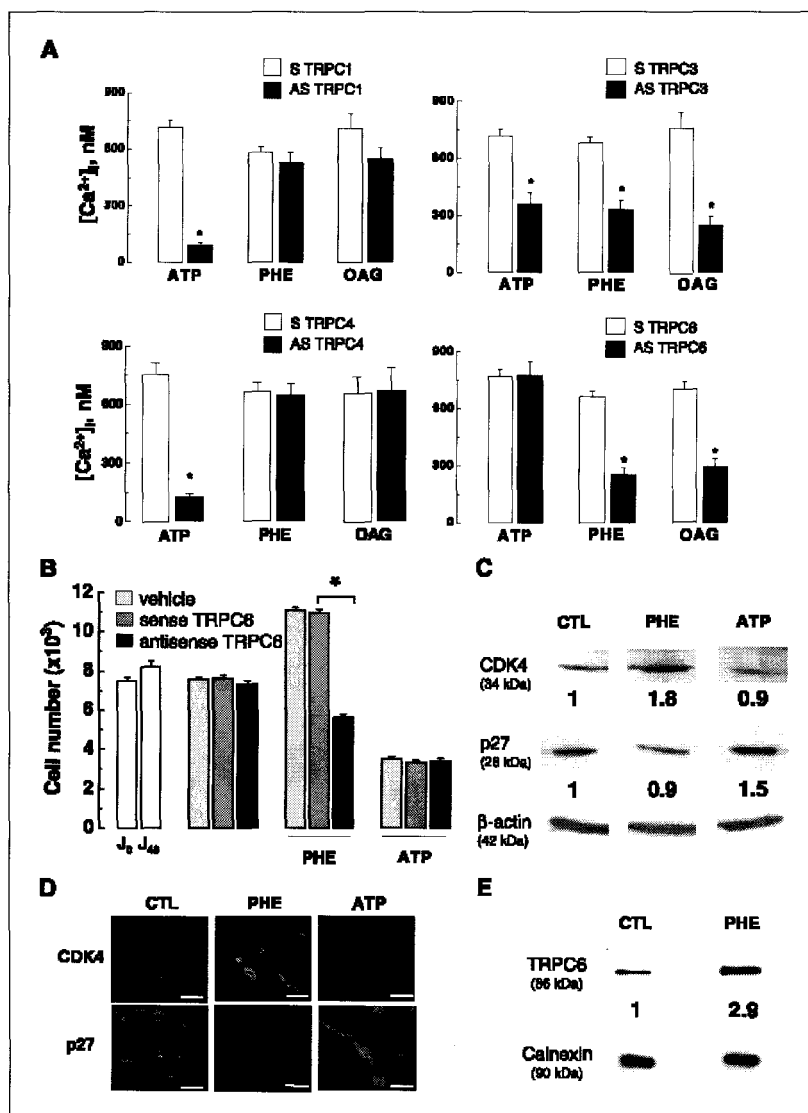


Figure 3. Reverse transcription-PCR analysis of the expression of human TRPC1A (A), TRPC3 (B), TRPC4 (C), and TRPC6 (D) transcripts and of human splice variants of TRPC4 (E) and TRPC6 (F) transcripts in hPCE cells. The expression products were obtained using the primers described in Materials and Methods. M, DNA ladder.

**Figure 4.** TRPC6 is an important determinant in phenylephrine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  response and in proliferation-promoting effects of  $\alpha_1$ -AR stimulation in hPCE cells. **A**, quantification of  $[Ca^{2+}]_i$  signals (see text for details) induced by ATP (100  $\mu$ mol/L), phenylephrine (PHE, 10  $\mu$ mol/L), and 100  $\mu$ mol/L OAG in hPCE cells treated for 48 hours with sense (white columns) or antisense (black columns) oligonucleotides directed against TRPC1 (top left;  $n = 48-85$ ), TRPC3 (top right;  $n = 54-87$ ), TRPC4 (bottom left;  $n = 72-105$ ), or TRPC6 (bottom right;  $n = 59-59$ ). Columns, means; bars, SE. \*,  $P < 0.01$ . **B**, changes in the density of vehicle-treated hPCE cells (light gray columns) and hPCE cells treated with either TRPC6 sense (dark gray columns) or TRPC6 antisense (black columns) oligonucleotides following 48 hours of incubation under control conditions (CTL) and in the presence of phenylephrine (10  $\mu$ mol/L, gray column) or ATP (100  $\mu$ mol/L, black column). \*,  $P < 0.001$ , significantly different values.  $J_0$  corresponds to the initial cell density and  $J_{48}$  to the cell density after 48 hours in culture under regular conditions; cells treated with the transfection reagent alone (vehicle) served as control for oligonucleotide treatments. **C**, Western blotting analysis for the expression of cdk4, p27, and  $\beta$ -actin proteins in hPCE cells following 48 hours of culturing in the presence of phenylephrine (10  $\mu$ mol/L), ATP (100  $\mu$ mol/L), or in control conditions. **D**, representative epifluorescence images of hPCE cells labeled with FITC-conjugated anti-CDK4 (top) and anti-p27 (bottom) antibodies under control conditions and following 48 hours of culturing in the presence of phenylephrine (10  $\mu$ mol/L) or ATP (100  $\mu$ mol/L). Bar, 10  $\mu$ m. **E**, Western blot analysis for the expression TRPC6 protein in hPCE cells following 48 hours of incubation under control conditions or in the presence of phenylephrine (10  $\mu$ mol/L). Each experiment was repeated thrice.



TRPC4, and TRPC6) in hPCE cells. In the first set of experiments, the specific primers were designed to amplify a portion of the NH<sub>2</sub>-terminal sequence surrounding the initiating codon ATG of each TRPC member (Fig. 3A and D). In the second set of experiments, specific primers were designed to identify the TRPC4 and TRPC6 splice variants isoforms (Fig. 3E and F), except for the TRPC1 where the NH<sub>2</sub>-terminal primers allow us to identify the splice variants. Figure 3 shows the expression of the transcripts for the TRPC1A splice variant (Fig. 3A), and the PCR products of the expected sizes for the TRPC3 (Fig. 3B), TRPC4 (Fig. 3C), and TRPC6 (Fig. 3D) in hPCE cells. The study of the splice variants isoforms (Fig. 3E and F) shows that the TRPC4 $\beta$  and TRPC6 $\gamma$  spliced isoforms were expressed in hPCE cells in addition to unspliced forms of TRPC4 and TRPC6.

**Effects of targeted TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 hybrid depletion on ACE.** To elucidate the contribution of each of the identified TRPC members to  $\alpha_1$ -AR- and P2Y-R-mediated  $Ca^{2+}$

signaling, we employed antisense hybrid depletion technology. We thereby reduced TRPC1/3/4/6 expression, allowing the subsequent evaluation of their effect on phenylephrine-, OAG-, and ATP-stimulated  $Ca^{2+}$  influx. We treated the cells with antisense oligonucleotides specific to each TRPC member before using them for  $Ca^{2+}$  imaging. Cells treated for the same period of time with respective sense oligonucleotides, which are not supposed to affect endogenous mRNA levels, served as a control. We have previously shown the reduction of specific TRPC1, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 mRNA expression in antisense versus sense treated cells by Western blotting analysis in prostate cell line (29, 30).

Because of the oscillatory nature of phenylephrine- and OAG-induced  $[Ca^{2+}]_i$  responses and the possibility that altered TRPC expression may potentially affect the amplitude as well as the temporal variables of oscillations, we opted to characterize the resulting effects of antisense treatments by calculating the area under oscillations (i.e., calculating an integral) over the 30-minutes

observation period ( $S_{Ca}$ ) and then subtracting the  $[Ca^{2+}]_i$  baseline. For the phenylephrine-induced oscillations in nontreated hPCE cells under standard conditions,  $S_{Ca} = 2,700 \pm 210$  nmol/L · min. In the event of ATP responses, the effects of TRPC depletion was evaluated based on the changes of maximal  $[Ca^{2+}]_i$  during the transition from  $Ca^{2+}$ -free to  $Ca^{2+}$ -containing solution (see Fig. 1E).

Figure 4A shows that antisense hybrid depletion of TRPC1 (*top left*;  $n = 48-85$ ) as well as of TRPC4 (*bottom left*;  $n = 72-105$ ) exerted a pronounced down-regulatory effect on ATP-induced response (i.e., 87% and 84% inhibition, respectively) virtually without affecting phenylephrine- and OAG-induced ones. On the contrary, the antisense knockout of TRPC6 strongly inhibited responses to phenylephrine and OAG (i.e., by 62% and 59%, respectively) leaving the ATP one intact (*bottom right*;  $n = 59-99$ ). Finally, TRPC3 hybrid depletion affected ATP-, phenylephrine-, and OAG-induced responses almost equally, inhibiting them by 50%, 52%, and 68%, respectively (*top right*;  $n = 54-87$ ).

Thus, these data indicate that endogenous TRPC1 and TRPC4 channels are exclusively involved in ATP-stimulated store-dependent type  $Ca^{2+}$  entry, whereas TRPC6 is the DAG-gated channel mediating phenylephrine-stimulated, store-independent  $Ca^{2+}$  entry in hPCE cells. Endogenous TRPC3 is probably plays an equal role in both store-dependent and store-independent  $Ca^{2+}$  influx pathways.

**$\alpha_1$ -AR agonist phenylephrine but not ATP promotes hPCE cell proliferation via TRPC6 up-regulation.** In our previous studies, we have shown that phenylephrine promotes the proliferation of androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells via the mechanism involving  $Ca^{2+}$  influx (10, 11), whereas extracellular ATP causes the growth arrest of androgen-independent prostate cancer DU-145, by affecting store-dependent processes (10, 11). Therefore, it was natural to examine how the two agonists influence the proliferation of primary hPCE cells as well.

Consistent with our observations of other prostate cancer cell types, 2-day treatments of primary hPCE cells with phenylephrine (10  $\mu$ mol/L) enhanced their proliferation by  $37.3 \pm 2.0\%$ , whereas the same period of ATP (100  $\mu$ mol/L) treatment inhibited cell proliferation by  $61.6 \pm 1.6\%$  (Fig. 4B). To prove the critical involvement of TRPC6 in growth-regulating properties of  $\alpha_1$ -AR and P2Y-R agonists, we used hPCE cells subjected to TRPC6 hybrid depletion. In the absence of agonists, TRPC6 sense (TRPC6/s) or antisense (TRPC6/as) oligonucleotides treatment did not modify hPCE cell proliferation activity (Fig. 4B). However, in the presence of phenylephrine, the proliferation of TRPC6 sense- and antisense-treated cells becomes dramatically different: if sense treatment did not change the usual proliferation-promoting effects of phenylephrine, then antisense treatment not only abolished these effects but even reversed the trend, consequently resulting in proliferation inhibition. At the same time, TRPC6 sense or antisense treatments did not influence the inhibitory action of ATP on hPCE cell proliferation.

Specific effect of the agonists on cell's proliferation was further confirmed by assaying the expression of two cell cycle regulators, cdk4 and cdk inhibitor p27 (31), by semiquantitative Western blot analysis with anti-cdk4 and anti-p27 antibodies. Inspection of the images presented in Fig. 4C shows that phenylephrine treatment resulted in the up-regulation of cdk4 expression and down-regulation of p27 expression in contrast to ATP, whose action on the expression of these cell cycle regulators was exactly opposite. These results were confirmed by immunostaining with FITC-conjugated anti-cdk4 and anti-p27 antibodies (Fig. 4D). These data permitted us to conclude that the effects of phenylephrine and ATP

on cell count were indeed related to cell proliferation and growth arrest, respectively.

Moreover, semiquantitative Western blot analysis for possible changes in the expression of TRPC6 involved in phenylephrine-induced  $Ca^{2+}$  signaling, which is likely to underlie growth-regulating effects, have revealed a ~3-fold up-regulation of TRPC6 expression in response to phenylephrine treatment (Fig. 4E).

Altogether, these results point to the key role of TRPC6 in phenylephrine growth-regulating functions.

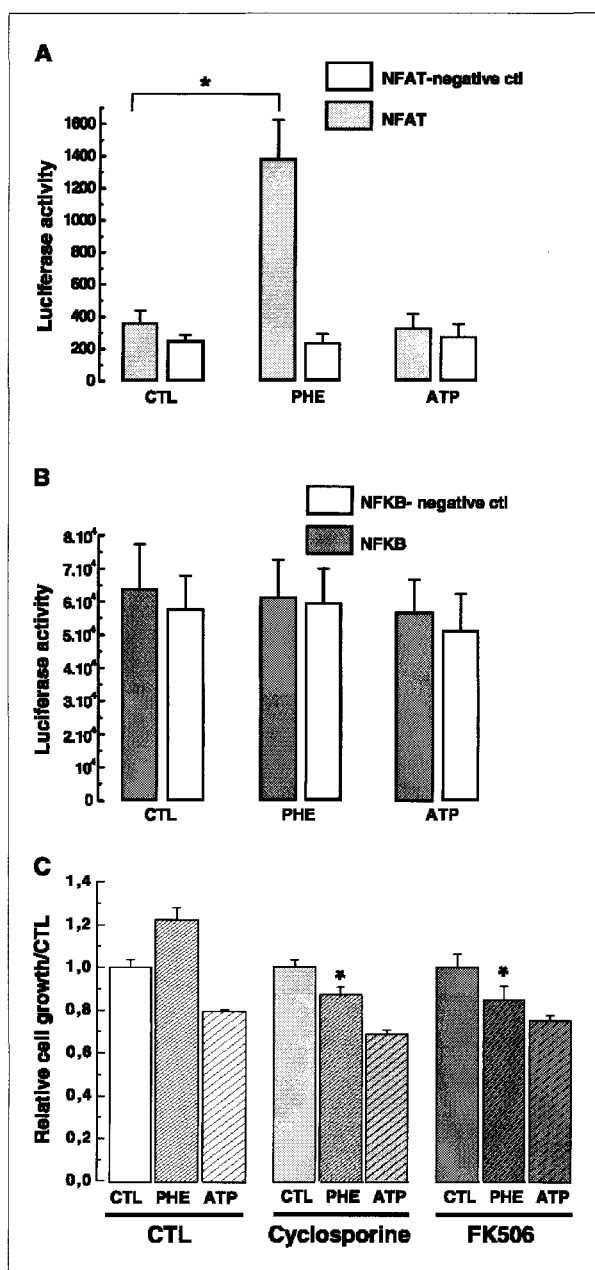
**Proliferation-promoting effects of  $\alpha_1$ -AR agonists involve NFAT activation.** To determine which transcription factor(s) mediate opposing effects of  $\alpha_1$ -AR and P2Y-R agonists on primary hPCE cell growth, we used cells transiently transfected with the pClIS-CK plasmid containing an insert of luciferase reporter gene driven by either synthetic NFAT- or NF- $\kappa$ B-dependent promoter (see Materials and Methods).

Figure 5A shows that a 2-day treatment with phenylephrine (10  $\mu$ mol/L) increased NFAT-dependent luciferase expression by ~5-fold compared with the transfected hPCE cells maintained under control conditions, whereas the same period of ATP (100  $\mu$ mol/L) treatment did not alter NFAT-dependent luciferase expression, which remained identical to control values. At the same time, neither agonist produced a significant change in NF- $\kappa$ B-dependent luciferase expression (Fig. 5B). Moreover, phenylephrine-induced increase in cell proliferation was specifically related to the increased NFAT activity, as blocking calcineurin by cyclosporin A (100 nmol/L) or FK506 (10  $\mu$ mol/L), thereby impeding nuclear NFAT translocation, prevented the ability of phenylephrine to induce cell proliferation without affecting the ATP-induced growth arrest (Fig. 5C). Thus,  $\alpha_1$ -AR-mediated stimulation of hPCE cell proliferation mainly occurs via NFAT activation.

## Discussion

In the present work, we report three major findings on  $Ca^{2+}$  signaling involved in the opposing effects on hPCE cell proliferation of  $\alpha_1$ -AR and P2Y-purinergic receptor agonists: (a)  $\alpha_1$ -AR agonist, phenylephrine, stimulates intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations sustained by  $Ca^{2+}$  entry via store-independent DAG-gated membrane channels predominantly represented by TRPC6, whereas P2Y-R agonist, ATP, stimulates store-dependent and transient  $Ca^{2+}$  signal involving SOC activation, to which the major contributors are TRPC1 and TRPC4. (b) TRPC6 is a key determinant in proliferation-promoting effects of  $\alpha_1$ -AR agonists via oscillatory-type  $Ca^{2+}$  signaling. (c)  $\alpha_1$ -AR agonist-stimulated  $Ca^{2+}$  oscillations enhances the coupling efficiency to nuclear  $Ca^{2+}$ -dependent transcription factor, NFAT, involved in the activation of proliferation-promoting gene expression.

**Agonist-dependent growth regulation of hPCE cells.** In this study, we confirmed that the major conclusions regarding the growth-regulating properties of  $\alpha_1$ -AR and P2Y-R signaling systems reached in our previous works on model systems of prostate cancer cell lines (10, 11) apply to the primary hPCE cells as well. Our study is the first of its kind to be conducted on primary cells, and its results allow all data, including those obtained in cell lines, to be taken into consideration from a common perspective. This is of importance in view of the widespread usage of cell lines due to their convenience and accessibility, although for practical applications primary hPCE cells represent the preferred model for such studies (for details, see Materials and Methods).



**Figure 5.**  $\alpha_1$ -AR-mediated proliferation-promoting effects involve NFAT activation in hPCE cells. **A**, quantification of luciferase activity in hPCE cells transiently transfected either with a luciferase reporter gene with a NFAT-dependent promoter (gray columns) or with a reporter vector lacking NFAT response elements in the promoter (white columns) following 48 hours of incubation under control conditions (CTL) and in the presence of phenylephrine (PHE, 10  $\mu$ M) or ATP (100  $\mu$ M). Columns, mean of three independent experiments; bars, SE. \*,  $P < 0.01$ . **B**, same as in (A), but for hPCE cells transiently transfected with a luciferase reporter gene with (gray columns) or without (white columns) NF- $\kappa$ B-dependent promoter. **C**, changes in the density of hPCE cells in response to 48-hour-long treatment with phenylephrine (10  $\mu$ M) or ATP (100  $\mu$ M) under regular (control, CTL) conditions and in the presence of calcineurin inhibitors, cyclosporine A (100 nmol/L), or FK506 (10  $\mu$ M). \*,  $P < 0.001$ , compared with phenylephrine-treated cells under control conditions.

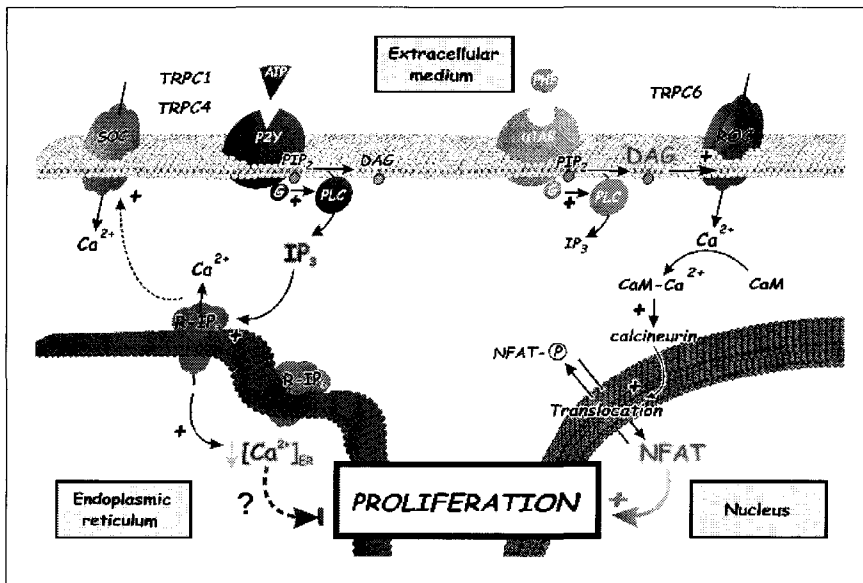
Thus, it seems to be proven that  $\alpha_1$ -AR-coupled signaling is associated with the enhancement of hPCE cell proliferation, whereas P2Y-R signaling induces a cessation of proliferative activity. We have shown that despite being initiated by the common PLC-catalyzed inositol phospholipid breakdown, the downstream pathways for the two receptors diverge by preferentially relying on the two different secondary messengers (i.e., IP<sub>3</sub> or DAG). Such a divergence permits the generation of the two different patterns of intracellular Ca<sup>2+</sup> signal in response to agonist-mediated stimulation of the two receptors, which ultimately result in opposite end effects on cell proliferation.

We show that the pattern of Ca<sup>2+</sup> signaling initiated by  $\alpha_1$ -AR stimulation is characterized by regular oscillatory activity, which is almost exclusively based on Ca<sup>2+</sup> entry pathway directly gated by DAG with no apparent role for IP<sub>3</sub>-mediated store depletion. The latter is shown by the inability of phenylephrine to produce measurable Ca<sup>2+</sup> release in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. Generally, this is surprising as most models of Ca<sup>2+</sup> wave generation involve interplay between Ca<sup>2+</sup> entry and IP<sub>3</sub>-mediated, store-dependent processes (25, 26). It may therefore suggest either very localized and compartmentalized Ca<sup>2+</sup> releases incapable of changing global [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> or the involvement of store-independent Ca<sup>2+</sup> uptake/extrusion mechanisms, such as, for instance, a mitochondrial one. In contrast, Ca<sup>2+</sup> signaling coupled to P2Y-R stimulation is largely determined by IP<sub>3</sub>-mediated, store-dependent processes, including robust Ca<sup>2+</sup> release and the activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx (Fig. 6). Currently, it is well known that IP<sub>3</sub> has a short half-life within the cell, and that the diffusion of locally produced IP<sub>3</sub> is rate limiting (32–34). However, little is known about assessing these variables in single cell: there are rather used computational models, but no indicator is available that would allow IP<sub>3</sub> to be visualized (35). Similar difficulties seem to study the intracellular signaling of DAG. The carbon-11-labeled DAG was proposed to evaluate its intracellular signaling, but its use needs further investigations (36). Due to these technical limitations, addressing the question of such divergence between  $\alpha_1$ -AR-coupled and P2Y-R signaling seems unrealistic.

Recent data suggest that oscillatory [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activity may be especially suited to the specificity of Ca<sup>2+</sup> signaling (37), as the possibility of amplitude and frequency signal encoding permits distinct effectors to be targeted. Our data on selective proliferation promoting  $\alpha_1$  agonist action via the induction of Ca<sup>2+</sup> oscillation in hPCE cells are consistent with this notion. Moreover, the fact that these oscillations translate into enhanced hPCE cell proliferation, via the activation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription factor, NFAT, generally agrees with previous findings on the importance of Ca<sup>2+</sup> signal amplitude and frequency characteristics, in determining the efficiency and specificity of coupling to various transcription factors, including NFAT (37). In contrast, Mignen et al. have reported that repetitive Ca<sup>2+</sup> oscillations due to low agonist concentration could not enhance the Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of NFAT in m3-HEK293, whereas high agonist concentration that induced a sustained elevation in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration was able to translocate NFAT (38). However, the Ca<sup>2+</sup> signal pattern was markedly different in their experiments: the Ca<sup>2+</sup> concentrations were elevated for only a few seconds (~10–15) during each oscillation (39), whereas the oscillatory period in T cells and in hPCE cells was ~2 minutes.

On the other hand, the antiproliferative effect of ATP-mediated P2Y-purinergic receptor stimulation, via the induction of store-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling, are generally consistent with the critical





**Figure 6.** Schematic depiction of  $\alpha_1$ -AR- and P2Y-purinoreceptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the primary hPCE cell proliferation.  $\alpha_1$ -AR stimulation by agonist (phenylephrine, PHE) via G-protein-coupled PLC-catalyzed  $\text{PIP}_2$  breakdown causes generation of two secondary messengers,  $\text{IP}_3$  and DAG, of which DAG directly activates the plasma membrane receptor-operated channel (ROC) represented by TRPC6, whereas  $\text{IP}_3$  due to some limitations of a yet unknown nature, is unable to produce visible effects. Consequent  $\text{Ca}^{2+}$  entry via ROC/TRPC6 causes NFAT activation due to  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/calcineurin-assisted translocation to the nucleus, where NFAT initiates the expression of the genes necessary for proliferation. In contrast, agonist-mediated P2Y-R stimulation (ATP), although causing the same PLC-catalyzed derivation of  $\text{IP}_3$  and DAG, further down employs  $\text{IP}_3$  to release  $\text{Ca}^{2+}$  from ER via  $\text{IP}_3$  receptor ( $\text{IP}_3$ -R) with the subsequent activation of plasma membrane SOC, mainly represented by TRPC1 and TRPC4. Associated ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion most probably serves as a primary stress factor for proliferation inhibition.

role of the ER  $\text{Ca}^{2+}$  store content and SOCs in the regulation of prostate cancer cell apoptosis, as shown in our previous works (23, 25). Indeed, persistent activation of P2Y-purinergic receptors may cause chronic underfilling of ER  $\text{Ca}^{2+}$  store and an adaptive decrease in SOCE, which although may not be sufficient to induce apoptosis (23, 25), but sufficient to exert antiproliferative effects (11).

**TRP members involved in agonist-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in hPCE cells.** Our results also highlight the importance of  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways in the discrimination of the signaling via  $\alpha_1$ -adrenergic and P2Y-purinergic receptors in hPCE cells. Indeed, the  $\alpha_1$ -AR agonists, phenylephrine, as well as the DAG analogue, OAG, activate  $\text{Ca}^{2+}$  entry mainly via the TRPC6 channel, whereas ATP-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  entry predominantly involves TRPC1 and TRPC4 channels.

The literature ascribing various TRPC members to the DAG-gated or SOC type and their mode of activation is quite conflicting and controversial (40–42). Therefore, a thorough assessment of the contribution of each particular TRP in the creation of the specific type of  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathway is required in every case. Thus far, our own data on LNCaP cell line only suggests that TRPC1 and the member of the "vanilloid" TRP subfamily, TRPV6, are predominantly involved in SOC formation (26), which agrees closely with the TRPC1 role in ATP-induced store-dependent type  $\text{Ca}^{2+}$  entry established above. Moreover, TRPC1 is one of those channels most involved in store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in general (40). Another TRPC member, TRPC4, which we also identified as essentially contributing to ATP-induced, store-dependent type  $\text{Ca}^{2+}$  entry in hPCE cells, has been shown both in the SOCE and in other cell models (41).

Although the existence of a direct DAG-gated activation mode for heterologously expressed TRPC6 is well established (42–44), our study is the first to identify endogenous TRPC6 as a primary determinant in physiologically relevant agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry operating on the direct DAG gating mechanism in cells of prostate origin. Moreover, we not only uncover the TRPC6 involvement in the generation of phenylephrine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in hPCE cells but also show the likely role of this channel in the enhance-

ment of the pro-proliferative effects of  $\alpha_1$ -AR agonists, because chronic exposure to phenylephrine causes TRPC6 overexpression. It is also quite plausible that promotion of proliferation in response to  $\alpha_1$ -ARs stimulation may result not only from the higher coupling efficiency of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations to NFAT activation but also from the spatial colocalization of TRPC6 with the machinery of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NFAT activation.

In general, the role of TRP members in proliferation activity has been best studied for smooth muscle cells. Interestingly, the results of these studies point to both TRPC1 and TRPC6 as important determinants in the promotion of pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation (45, 46). However, the underlying mechanisms seem to involve the enhancement of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx only, including both TRPCs channels.

**Potential clinical implications.** Our present study together with the aforementioned recent one (10) reveals new, previously unanticipated clinical effects for  $\alpha_1$ -AR blockade in the control of prostate epithelial cell proliferation, which can be further exploited for growth suppression in the benign and malignant prostate. Moreover, because we have identified the signaling pathway mediating  $\alpha_1$ -AR-stimulated proliferation promotion, all the molecular entities involved can potentially represent suitable targets for therapeutic intervention. This is especially true with respect to the TRPC6 channel, which determines the oscillatory pattern of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling that couples agonist-mediated  $\alpha_1$ -AR stimulation to  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of the NFAT transcription factor, as disrupting this pattern would ultimately terminate proliferative gene expression.

## Acknowledgments

Received 2/3/2005; revised 11/25/2005; accepted 12/21/2005.

Grant support: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Ligue Nationale Contre le Cancer, Association pour la Recherche Contre le Cancer, and Ministère de l'Éducation Nationale, France (Y. Shuba).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Etienne Dewailly and Philippe Delcourt for technical support.

## References

1. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium: a life and death signal. *Nature* 1998;395:645-8.
2. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995;80:259-68.
3. Patterson RL, van Rossum DB, Ford DL, et al. Phospholipase C-gamma is required for agonist-induced  $Ca^{2+}$  entry. *Cell* 2002;111:529-41.
4. Putney JW, Jr., Broad LM, Braun FJ, Lievreumont JP, Bird GS. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 2001;114:2223-9.
5. Caine M. Alpha-adrenergic blockers for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 1990;17:641-9.
6. Kyprianou N, Chon J, Benning CM. Effects of alpha(1)-adrenoceptor (alpha(1)-AR) antagonists on cell proliferation and apoptosis in the prostate: therapeutic implications in prostatic disease. *Prostate Suppl* 2000; 9:42-6.
7. Kyprianou N, Benning CM. Suppression of human prostate cancer cell growth by alpha(1)-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:4550-5.
8. Benning CM, Kyprianou N. Quinazoline-derived alpha(1)-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via an alpha(1)-adrenoceptor-independent action. *Cancer Res* 2002;62:597-602.
9. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983; 43:1809-18.
10. Thebault S, Roudbaraki M, Sydorenko V, et al. Alpha(1)-adrenergic receptors activate  $Ca^{2+}$ -permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest* 2003;111:1691-701.
11. Vanoverberghe K, Mariot P, Vanden Abeele F, Delcourt P, Parys JB, Prevarskaya N. Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium* 2003;34: 75-85.
12. Minneman KP. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell  $Ca^{3+}$ . *Pharmacol Rev* 1988;40:87-119.
13. Marshall I, Burt RP, Chapple CR. Signal transduction pathways associated with alpha(1)-adrenoceptor subtypes in cells and tissues including human prostate. *Eur Urol* 1999;36:42-7; discussion 65.
14. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-24.
15. Golovina VA. Cell proliferation is associated with enhanced capacitative  $Ca^{2+}$  entry in human arterial myocytes. *Am J Physiol* 1999;277:C343-9.
16. Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, et al. Upregulated TRP and enhanced capacitative  $Ca^{2+}$  entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H746-55.
17. Inoue R, Okada T, Onoue H, et al. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel. *Circ Res* 2001;88:325-32.
18. Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2001; 2001:RE1.
19. Crabtree GR. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem* 2001;276:2313-6.
20. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002;30:285-95.
21. van Leenders GJ, Aalders TW, Hulsbergen-van de Kaa CA, Ruiter DJ, Schalken JA. Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines. *J Pathol* 2001;195:563-70.
22. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-50.
23. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, et al. Store depletion and store-operated  $Ca^{2+}$  current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 2000;527 Pt 1:71-83.
24. Skryma RN, Prevarskaya NB, Dufy-Barbe L, Odessa MF, Audin J, Dufy B. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation. *Prostate* 1997;33: 112-22.
25. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, et al.  $Ca^{2+}$ -dependent modulation of  $Ca^{2+}$  homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 2002;1:169-79.
26. Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Store-operated  $Ca^{2+}$  current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous  $Ca^{2+}$  transporter type 1. *J Biol Chem* 2003;278: 15381-9.
27. Sydorenko V, Shuba Y, Thebault S, et al. Receptor-coupled, DAG-gated  $Ca^{2+}$ -permeable cationic channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Physiol* 2003;548:823-36.
28. Fang WG, Pirnia F, Bang YJ, Myers CE, Trepel JB. P2-purineric receptor agonists inhibit the growth of androgen-independent prostate carcinoma cells. *J Clin Invest* 1992;89:191-6.
29. Thebault S, Zholos A, Enfissi A, et al. Receptor-operated  $Ca^{2+}$  entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J Cell Physiol* 2005;204:320-8.
30. Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebault S, et al. Two types of store-operated  $Ca^{2+}$  channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 2004;279: 30326-37.
31. Sotillo R, Renner O, Dabus P, et al. Cooperation between Cdk4 and p27kip1 in tumor development: a preclinical model to evaluate cell cycle inhibitors with therapeutic activity. *Cancer Res* 2005;65:3846-52.
32. Pattni K, Millard TH, Banting G. Calpain cleavage of the B isoform of Ins(1,4,5)P3 3-kinase separates the catalytic domain from the membrane anchoring domain. *Biochem J* 2003;375:643-51.
33. Sims CE, Allbritton NL. Metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate by the oocytes of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 1998;273: 4052-8.
34. Allbritton NL, Meyer T, Stryer L. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 1992;258:1812-5.
35. Wang SS, Alousi AA, Thompson SH. The lifetime of inositol 1,4,5-trisphosphate in single cells. *J Gen Physiol* 1995;105:149-71.
36. Fujii R, Imahori Y, Ido T, et al. [Carbon-11 labeled diacylglycerol for signal transduction imaging by positron CT: evaluation of the quality and safety for clinical use]. *Kaku Igaku* 1995;32:191-8.
37. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 1998;392:933-6.
38. Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ. Calcineurin directs the reciprocal regulation of calcium entry pathways in nonexcitable cells. *J Biol Chem* 2003;278: 40088-96.
39. Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ. Reciprocal regulation of capacitative and arachidonate-regulated noncapacitative  $Ca^{2+}$  entry pathways. *J Biol Chem* 2001; 276:35676-83.
40. Beech DJ, Xu SZ, McHugh D, Flemming R. TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* 2003;33:433-40.
41. Plant TD, Schaefer M. TRPC4 and TRPC5: receptor-operated  $Ca^{2+}$ -permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium* 2003;33:441-50.
42. Trebak M, Bird GS, McKay RR, Birnbaumer L, Putney JW, Jr. Signaling mechanism for receptor-activated TRPC3 channels. *J Biol Chem* 2003;278:16244-52.
43. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999;397:259-63.
44. Estacion M, Li S, Sinkins WG, et al. Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem* 2004;279:22047-56.
45. Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JX. Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative  $Ca^{2+}$  entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L144-55.
46. Yu Y, Sweeney M, Zhang S, et al. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C316-30.

## **II) Résultats préliminaires : caractérisation moléculaire du Calcium Induced Factor (CIF).**

Matthieu Flourakis, Benjamin Beck, Christian Rolando, Roman Skryma, et Natalia Prevarskaya.

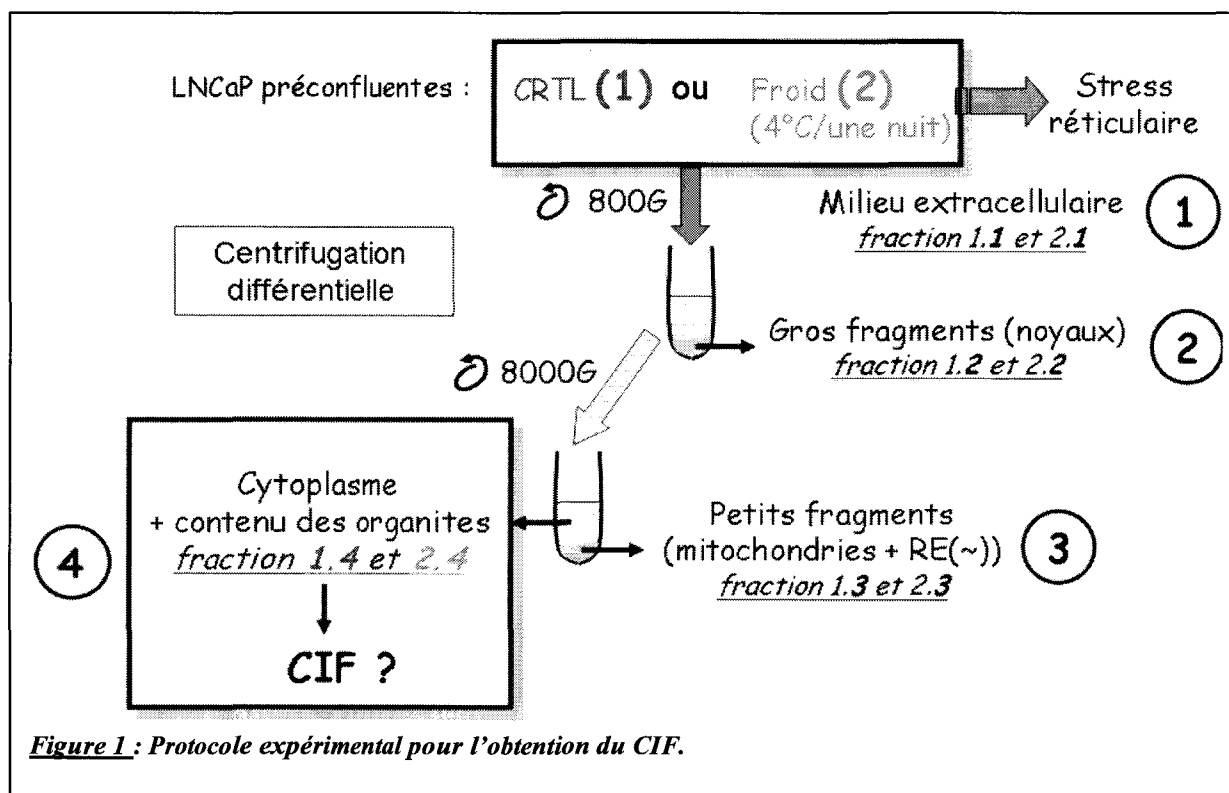
Dans cette partie de ma thèse, nous avons étudié l'un des mécanismes les plus mystérieux de la signalisation calcique : la découverte du mécanisme d'activation des canaux SOC.

Avant la découverte de STIM1 et Orai1, deux hypothèses d'activation étaient émises : le couplage conformationnel et le CIF (Calcium Induced Factor). Le mécanisme de couplage conformationnel est bien établi, à l'opposé la nature moléculaire du CIF est inconnue.

A l'aide d'une collaboration avec le laboratoire de protéomique du Pr Rolando, nous avons tenter de caractériser le CIF.

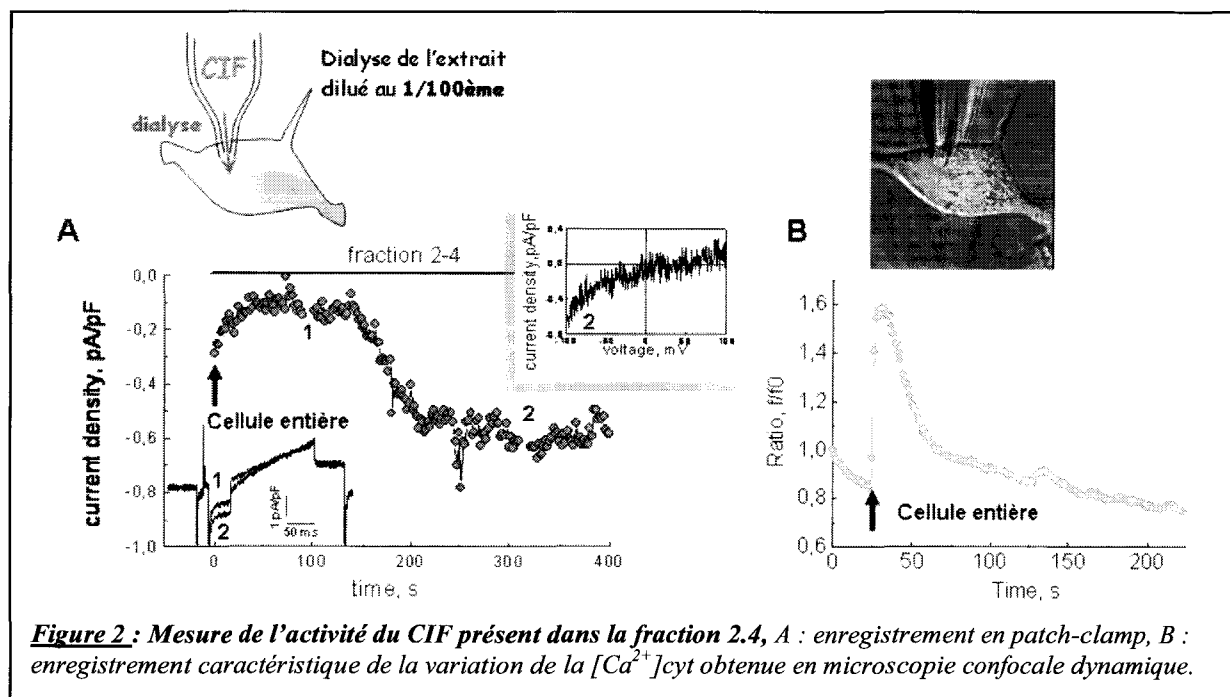
L'étude est basée sur un article fondateur du Pr Randriamanpita repris ces dernières années par d'autres équipes (Bolotina and Csutora 2005). La première étude a permis de caractériser le CIF comme étant un composé actif contenu dans les organites puis dans le cytoplasme après stimulation par un agoniste. Dix ans de recherche supplémentaires n'ont pas réussi à faire avancer beaucoup la thématique : le CIF serait un petit composé (<500Da), anionique et hydrophobe. L'étude de l'équipe de Bolotina met en évidence le rôle de la phospholipase A2 dans le mécanisme d'activation des SOCs par le CIF. Le CIF induit la dissociation du complexe Calmoduline - iPLA<sub>2</sub>. L'iPLA<sub>2</sub> ainsi activée provoque la production de lysophospholipides qui activent les SOCs (Bolotina and Csutora 2005)

Pour obtenir le CIF, les cellules sont placées pendant une nuit à 4°C. Le froid induit un stress réticulaire qui provoque le relargage du CIF dans le cytoplasme. Grâce à deux centrifugations successives (800 et 8000G), nous obtenons une fraction contenant en majorité le cytoplasme et le contenu des organites. La fraction 1.4 est obtenue à partir des cellules non stimulées, la fraction 2.4 est obtenue quand les cellules sont activées (figure 1).

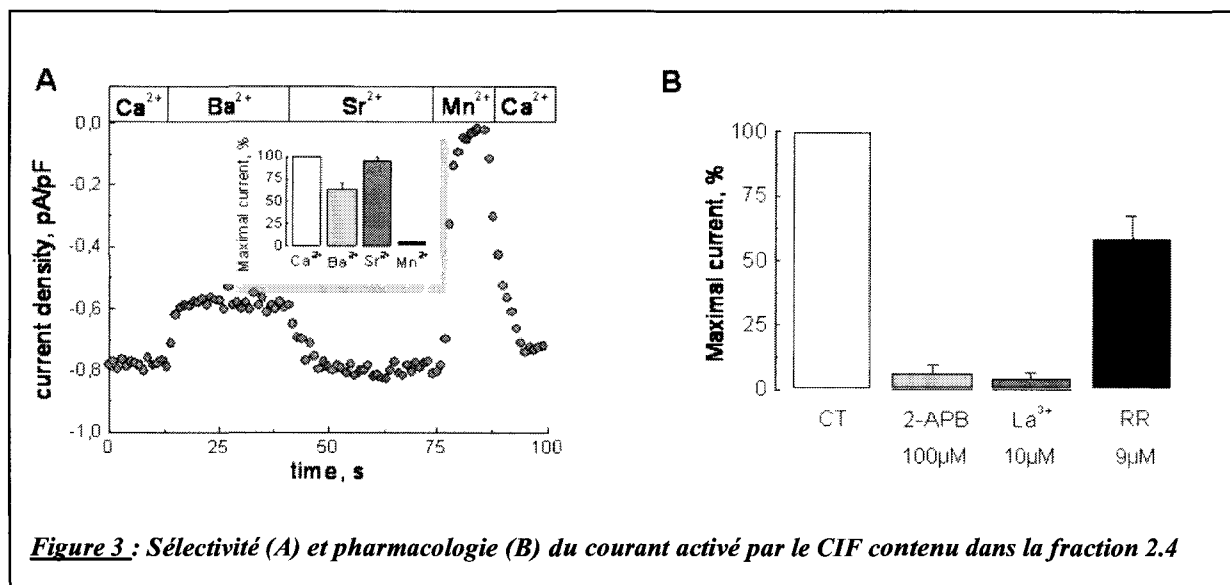


Une fois les fractions obtenues, nous avons testé leurs activités grâce aux techniques d'électrophysiologie et de microscopie confocale. La figure 2 indique que, contrairement à la fraction 1.4, la fraction 2.4 possède bien une activité. En effet, en configuration cellule entière, la diffusion du CIF contenu dans la fraction 2.4 active un courant ressemblant au

courant porté par les canaux SOCs (figure 2A) et provoque une hausse de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (figure 2B).

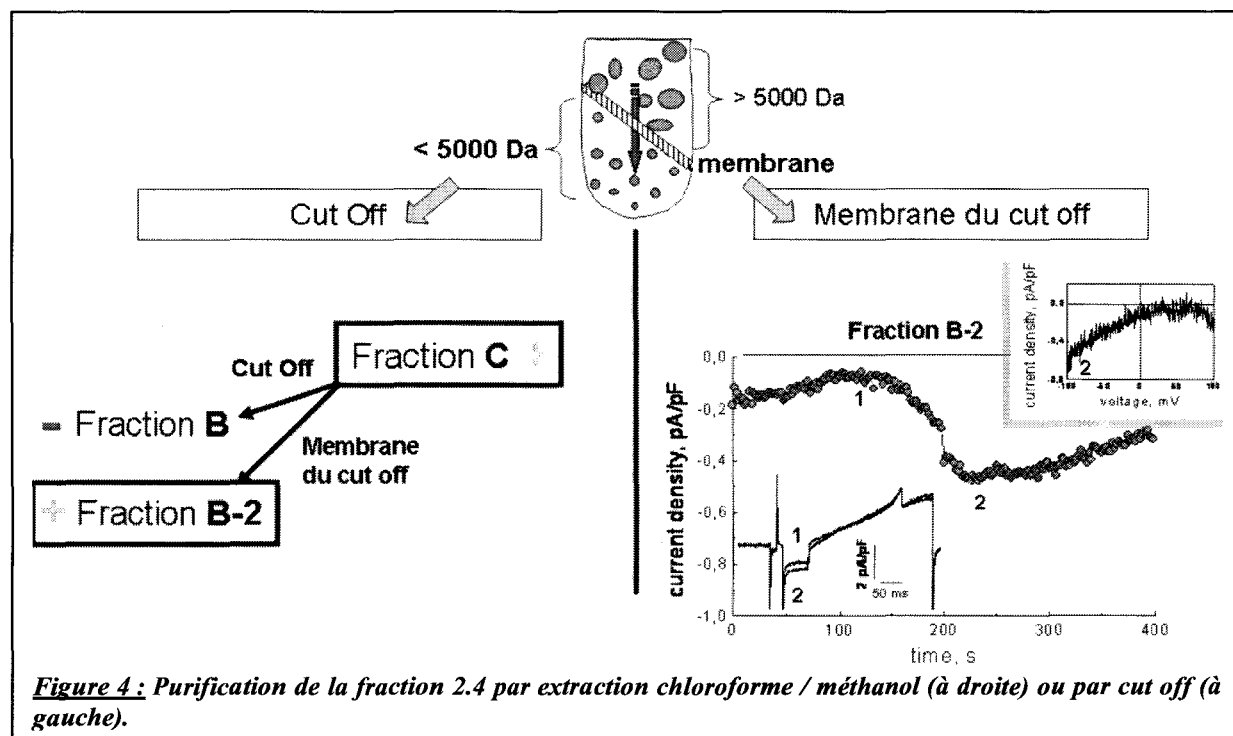


Le CIF semble donc être présent dans la fraction 2.4. Nous avons donc vérifié si l'activité obtenue est bien due à l'activation des canaux SOCs. Pour cela, nous avons vérifié la sélectivité et la pharmacologie du courant activé par le CIF.



Le courant activé par le CIF a une sélectivité ( $Mn^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Ca^{2+}$ ) et une pharmacologie (Ruthenium Red  $\ll$   $La^{3+}$  < 2-APB) caractéristique du courant SOC identifié dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. De plus, les caractéristiques biophysiques (potentiel d'inversion proche de 50mV et la rectification entrante) sont similaires aux caractéristiques du courant SOC. Ainsi, le CIF contenu dans la fraction 2.4 active donc bien un courant calcique de type SOC.

Le CIF est donc bien dans la fraction 2.4, cependant ces fractions sont composées de nombreuses molécules. Nous avons donc voulu purifier cette fraction. Tout d'abord, nous avons effectué des extractions avec un mélange chloroforme/méthanol afin de supprimer la majorité des lipides et des protéines. Les fractions obtenues suite à l'extraction (appelée fraction C) sont toujours actives (figure 4 gauche). Puis nous avons séparé les molécules restantes en fonction du poids moléculaire grâce à des membranes de Cut off.



**Figure 4 :** Purification de la fraction 2.4 par extraction chloroforme / méthanol (à droite) ou par cut off (à gauche).

Malheureusement, nous n'avons pas retrouvé le CIF dans les fractions contenant des molécules d'un poids moléculaire inférieur ou supérieur à 5000Da. Des analyses supplémentaires semblent indiquer que le CIF reste dans la membrane (figure 4 droite). En effet, lorsque l'on extrait ce qui est bloqué dans la membrane, on retrouve l'activité du CIF. Ce dernier résultat permet de confirmer que le CIF est bien un composé hydrophobe.

Nous avons alors, à partir des fractions purifiées grâce à l'extraction chloroforme / méthanol (fraction C), effectué de nouvelles purifications par des chromatographies à phase liquide (HPLC) soit anionique soit cationique afin de séparer les molécules en fonction de leurs charges. Comme le montre la figure 5, nous avons obtenu 25 fractions pour chaque HPLC. Après avoir testé ces 50 fractions, nous avons détecté l'activité du CIF que dans quatre fractions : les fractions 1 et 2 de l'HPLC cationique et les fractions 24 et 25 anioniques. Les courants obtenus en configuration cellule entière sont proches des courants calciques de type SOC. Cependant, il est intéressant de noter que les courants obtenus ont des cinétiques assez différentes : les courants activés par les fractions 1 et 2 cationiques sont activés assez lentement et ne sont pas transitoires. Pour les courants activés par les fractions 24 et 25 anioniques la cinétique d'activation est rapide et transitoire.

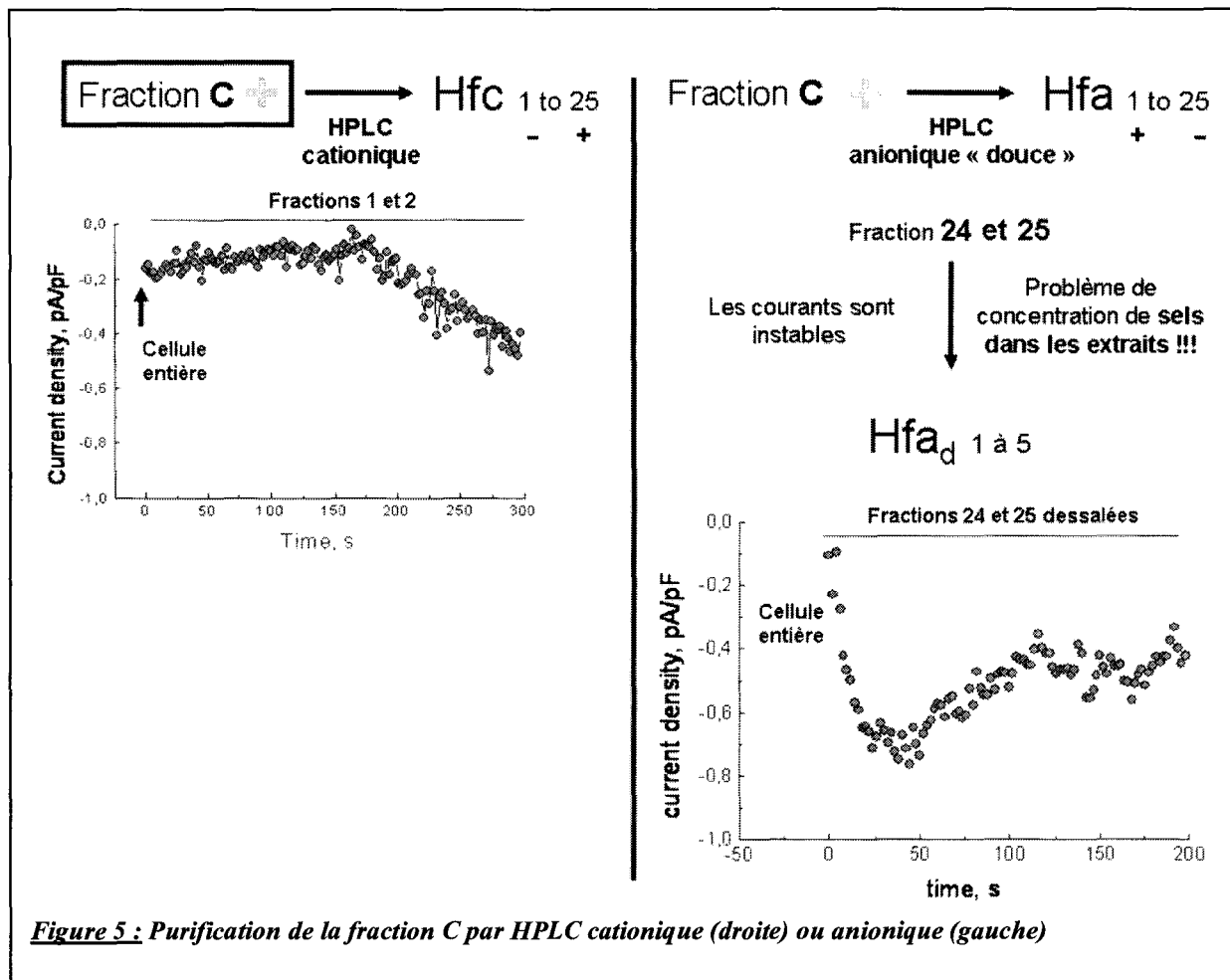
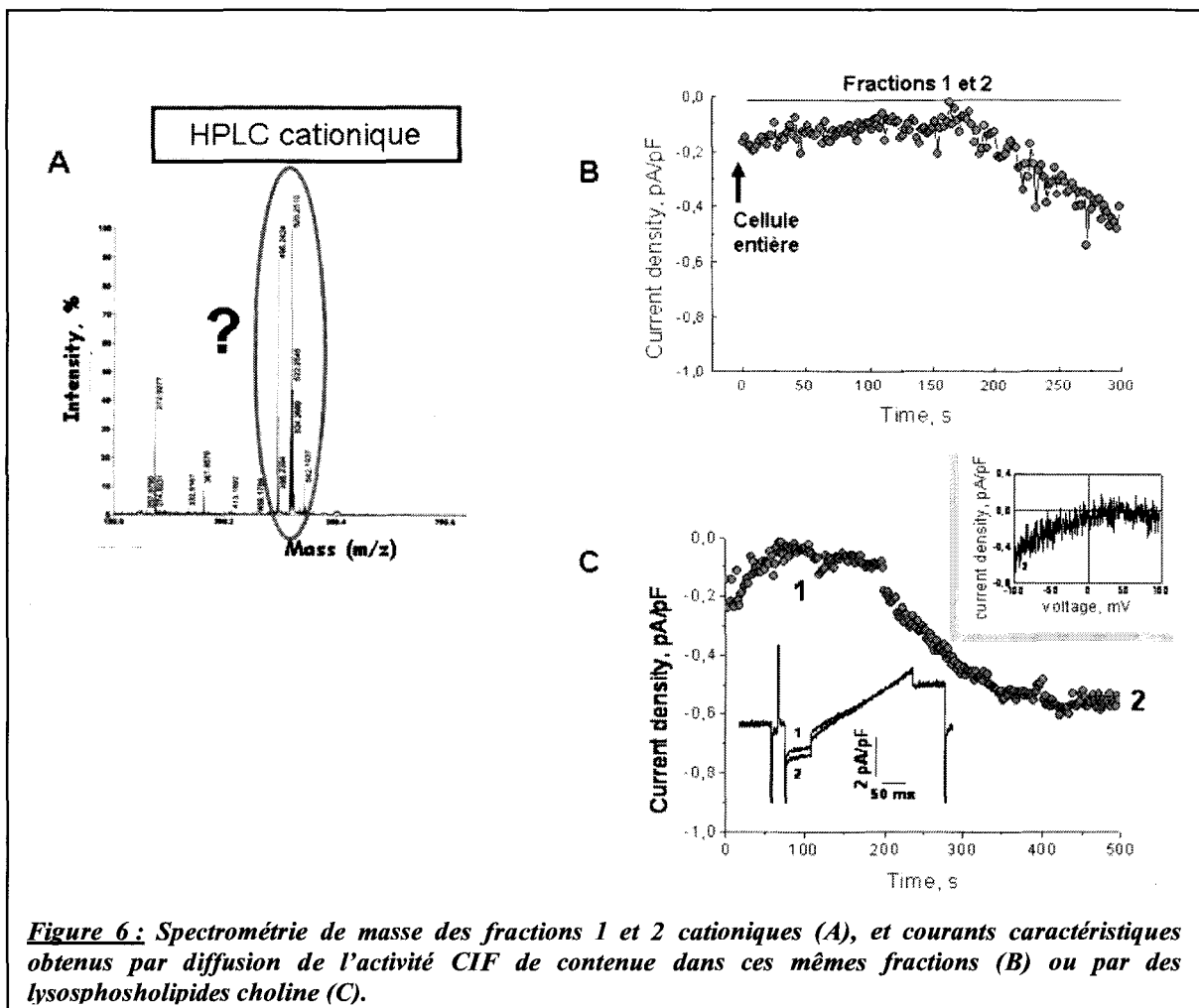


Figure 5 : Purification de la fraction C par HPLC cationique (droite) ou anionique (gauche)

Ces deux types de fractions semblent donc être différentes. En effet, la différence de cinétique tend à montrer que ces deux types de fractions sont composés de molécules différentes capables d'activer les canaux SOC.

L'étape suivante est donc d'identifier les molécules présentes dans ces fractions. Pour cela nous avons réalisé des expériences de spectrométrie de masse sur les fractions 1 / 2 cationiques et 24 / 25 anioniques.

Voyons tout d'abord les composés présents dans les fractions cationiques. Comme le montre la figure 6, nous avons identifié de nombreux pics dont la masse moléculaire est proche de 500Da. Les études précédentes ont caractérisé le CIF comme étant une petite molécule d'environ 500Da, hydrophobe et anionique. Les pics identifiés ici possèdent les mêmes caractéristiques. Nous avons donc dans les fractions 1 et 2 obtenus par l'HPLC cationique la ou les molécules précédemment identifiées comme CIF.

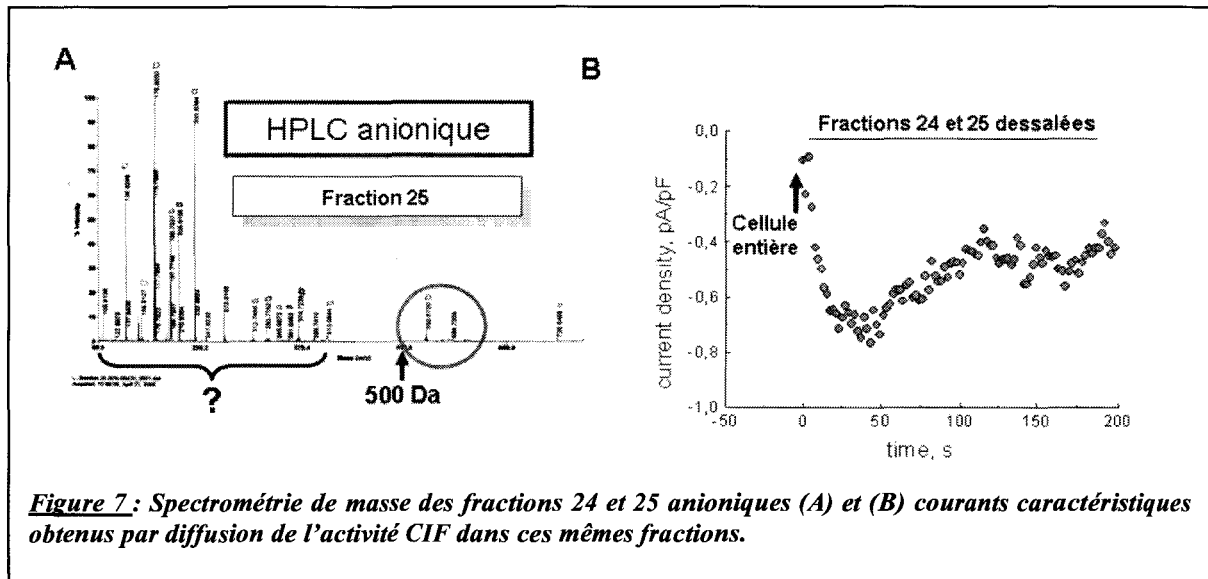


**Figure 6:** Spectrométrie de masse des fractions 1 et 2 cationiques (A), et courants caractéristiques obtenus par diffusion de l'activité CIF de contenue dans ces mêmes fractions (B) ou par des lysophospholipides choline (C).

Cependant, récemment il a été démontré que les lysophospholipides peuvent activer directement les canaux SOCs (figure 6C). Les lysophospholipides ont une masse moléculaire de 500 Da en moyenne, sont hydrophobes et anioniques. Ainsi, nous mettons ici en évidence que les molécules purifiées dans ces fractions et par de nombreuses équipes travaillant sur le CIF ne seraient en fait que des lysophospholipides.



Nous nous sommes donc intéressé ensuite aux molécules présentes dans les fractions anioniques 24 et 25. Dans ces fractions, nous ne voyons pas de molécules possédant une masse moléculaire proche de 500Da. Cependant, il y a de nombreux pics pour une masse inférieure à 400Da (figure 7).



**Figure 7 :** Spectrométrie de masse des fractions 24 et 25 anioniques (A) et (B) courants caractéristiques obtenus par diffusion de l'activité CIF dans ces mêmes fractions.

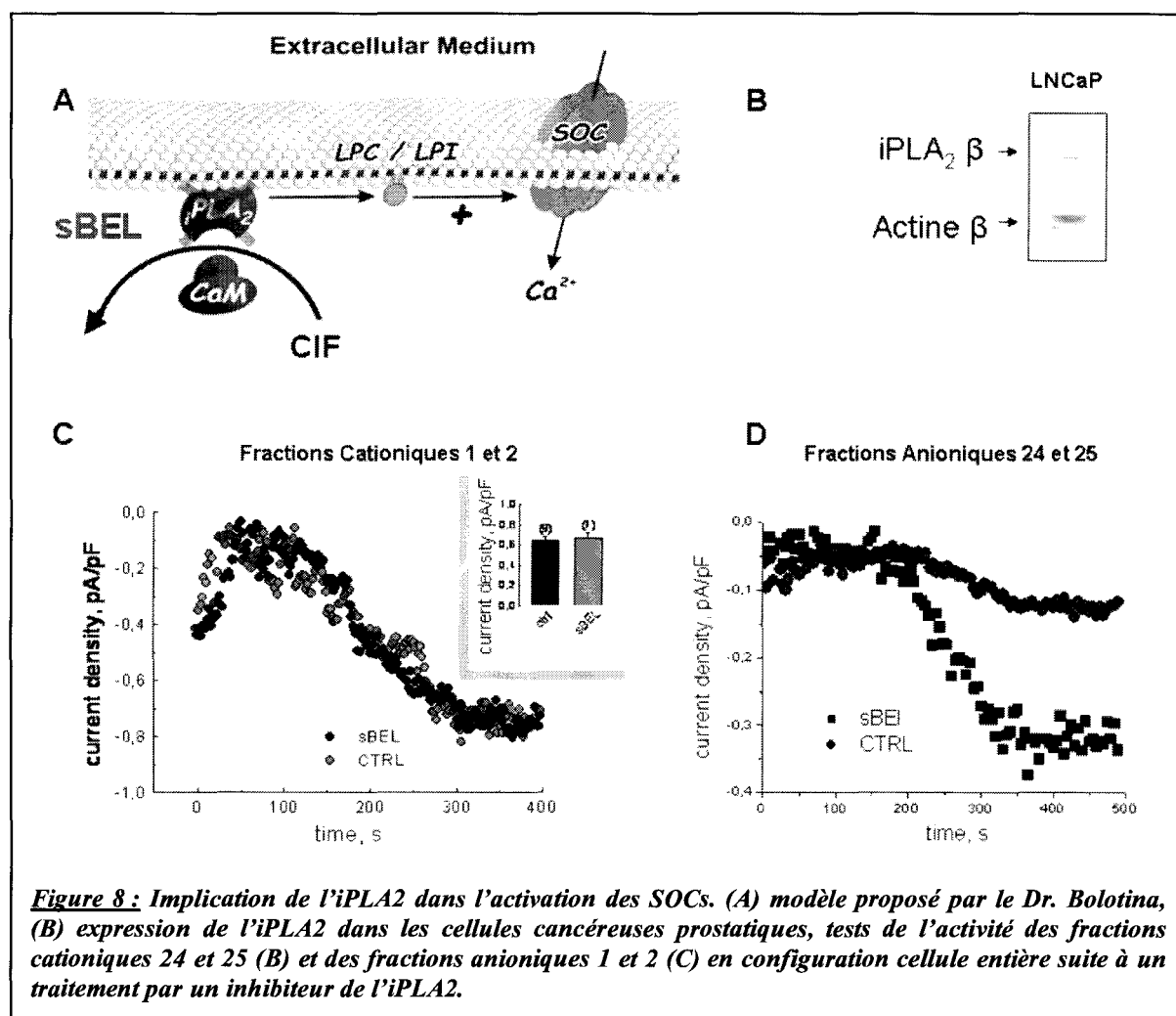
Ces résultats nous permettent donc de donner de nouvelles caractéristiques au CIF. Celui-ci serait une petite molécule (la masse moléculaire serait inférieure à 400Da), hydrophobe et cationique.

Enfin, l'une des dernières caractéristiques décrites par l'équipe de Bolotina, identifie le CIF comme étant une molécule permettant de détacher la calmoduline de l'iPLA2 (figure 8A). Cette dernière produit des lysophospholipides qui activent les canaux SOCs. Dans cette dernière partie, nous avons testé nos fractions sur l'activité de l'iPLA2. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de cette protéine : le sBel.

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression de l'iPLA2 dans les cellules cancéreuses prostatiques (figure 8B). Nous avons ensuite testé nos fractions dans ce modèle.

L'activité contenue dans les fractions cationiques 1 et 2 n'est pas inhibée par le sBEL. Ceci démontre que les molécules présentes dans ces fractions activent les canaux SOCS en amont de l'iPLA2. Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse postulant que les molécules présentes dans ces fractions sont des lysophospholipides (figure 8C).

Au contraire, l'activité contenue dans les fractions anioniques 24 et 25 est bien inhibée par le sBEL (figure 8D). Ceci confirme que les molécules présentes dans ces fractions agissent en aval de l'iPLA2. Ces molécules auraient la capacité de détacher la calmoduline de l'iPLA2 afin d'activer les SOCs. Cette hypothèse nécessite des expériences complémentaires afin d'être validée.



## **Conclusion**

Cette étude est donc primordiale pour la caractérisation du CIF. En effet, nous avons démontré, la présence de lysophospholipides dans les fractions étudiées par les équipes précédentes. Ces petites molécules hydrophobes et anioniques peuvent activer directement les canaux SOCs. Ici, nous démontrons que le CIF serait bien la molécule qui détache la calmoduline de l'iPLA2. Le CIF serait de plus petite masse moléculaire que ce qui a été décrit (inférieure à 400Da) et serait hydrophobe et cationique. Des études plus poussées en protéomique sont cependant nécessaires afin d'identifier le CIF.

# Bibliographie

*Au fond, est-ce que ranger ça ne revient pas un peu à mettre le souk dans son désordre ?*

*Philippe Geluck*

*Extrait de L'Excellent du chat*

- Abe, J., et al. (2005). "TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae." Brain Res Mol Brain Res **136**(1-2): 91-8.
- Abrahamsson, P. A. (1999). "Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate." Endocr Relat Cancer **6**(4): 503-19.
- Abrahamsson, P. A. (1999). "Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma." Prostate **39**(2): 135-48.
- Altzner, F., et al. (2004). "Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis." J Biol Chem **279**(7): 5947-57.
- Amedee, T. and W. A. Large (1989). "Microelectrode study on the ionic mechanisms which contribute to the noradrenaline-induced depolarization in isolated cells of the rabbit portal vein." Br J Pharmacol **97**(4): 1331-7.
- Amirghofran, Z., et al. (2004). "Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer." Pathol Oncol Res **10**(1): 37-41.
- Amiri, H., et al. (2003). "FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry." Cell Calcium **33**(5-6): 463-70.
- Arnaudeau, S., et al. (2002). "Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria." J Biol Chem **277**(48): 46696-705.
- Arniges, M., et al. (2006). "Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking." J Biol Chem **281**(3): 1580-6.
- Ashley, R. H. (1989). "Brain microsomes bind ryanodine and contain ryanodine-sensitive calcium channels." Biochem Soc Trans **17**(6): 1102-3.
- Baba, Y., et al. (2006). "Coupling of STIM1 to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(45): 16704-9.
- Balsinde, J., et al. (1997). "Antisense inhibition of group VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages." J Biol Chem **272**(46): 29317-21.
- Balsinde, J., et al. (1995). "Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8527-31.
- Bastianutto, C., et al. (1995). "Overexpression of calreticulin increases the Ca<sup>2+</sup> capacity of rapidly exchanging Ca<sup>2+</sup> stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function." J Cell Biol **130**(4): 847-55.

- Beecroft, M. D. and C. W. Taylor (1998). "Luminal Ca<sup>2+</sup> regulates passive Ca<sup>2+</sup> efflux from the intracellular stores of hepatocytes." Biochem J **334** ( Pt 2): 431-5.
- Bennett, D. L., et al. (1996). "Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells." J Biol Chem **271**(11): 6356-62.
- Berridge, M. J. (1995). "Calcium signalling and cell proliferation." Bioessays **17**(6): 491-500.
- Berridge, M. J. (1995). "Capacitative calcium entry." Biochem J **312** ( Pt 1): 1-11.
- Berridge, M. J. (1996). "Microdomains and elemental events in calcium signalling." Cell Calcium **20**(2): 95-6.
- Berridge, M. J., et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.
- Bezzerrides, V. J., et al. (2004). "Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels." Nat Cell Biol **6**(8): 709-20.
- Birnbaumer, L., et al. (2003). "A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives." Cell Calcium **33**(5-6): 419-32.
- Blomme, E. A., et al. (1998). "Stromal and epithelial cells of the canine prostate express parathyroid hormone-related protein, but not the PTH/PTHrP receptor." Prostate **36**(2): 110-20.
- Blondel, O., et al. (1994). "Creation of an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store in secretory granules of insulin-producing cells." J Biol Chem **269**(44): 27167-70.
- Bolotina, V. M. and P. Csutora (2005). "CIF and other mysteries of the store-operated Ca<sup>2+</sup>-entry pathway." Trends Biochem Sci **30**(7): 378-87.
- Breckenridge, D. G., et al. (2003). "Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways." Oncogene **22**(53): 8608-18.
- Breckenridge, D. G., et al. (2003). "Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol." J Cell Biol **160**(7): 1115-27.
- Brostrom, M. A. and C. O. Brostrom (2003). "Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability." Cell Calcium **34**(4-5): 345-63.
- Burk, S. E., et al. (1989). "cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca<sup>2+</sup> pump." J Biol Chem **264**(31): 18561-8.
- Camello, C., et al. (2002). "Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling." Cell Calcium **32**(5-6): 355-61.

- Cancela, J. M., et al. (2002). "Transformation of local Ca<sup>2+</sup> spikes to global Ca<sup>2+</sup> transients: the combinatorial roles of multiple Ca<sup>2+</sup> releasing messengers." *Embo J* **21**(5): 909-19.
- Carpentier, M., et al. (2004). "Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1." *Mol Cell Biol* **24**(10): 4428-37.
- Caterina, M. J., et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-24.
- Chaudhary, K. S., et al. (1999). "Role of the Bcl-2 gene family in prostate cancer progression and its implications for therapeutic intervention." *Environ Health Perspect* **107 Suppl 1**: 49-57.
- Chia, S. E., et al. (2000). "Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men." *J Androl* **21**(1): 53-7.
- Chu, X., et al. (2005). "Identification of an N-terminal TRPC2 splice variant which inhibits calcium influx." *Cell Calcium* **37**(2): 173-82.
- Chubanov, V., et al. (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**(9): 2894-9.
- Clapham, D. E., et al. (1993). "Intracellular waves observed by confocal microscopy from *Xenopus* oocytes." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **28**: 161-5.
- Cohen, R. A., et al. (1999). "Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx." *Circ Res* **84**(2): 210-9.
- Colombel, M., et al. (1996). "Apoptosis in prostate cancer. Molecular basis to study hormone refractory mechanisms." *Ann N Y Acad Sci* **784**: 63-9.
- Costello, L. C. and R. B. Franklin (1998). "Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer." *Prostate* **35**(4): 285-96.
- Cox, M. E., et al. (1999). "Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression." *Cancer Res* **59**(15): 3821-30.
- Culig, Z., et al. (1996). "Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors." *Prostate* **28**(6): 392-405.
- Culig, Z., et al. (1996). "Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone." *Cancer Detect Prev* **20**(1): 68-75.

- de la Pena, E., et al. (2005). "The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones." *J Physiol* **567**(Pt 2): 415-26.
- Demaurex, N. and M. Frieden (2003). "Measurements of the free luminal ER Ca<sup>2+</sup> concentration with targeted "cameleon" fluorescent proteins." *Cell Calcium* **34**(2): 109-19.
- Dolmetsch, R. E., et al. (1998). "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression." *Nature* **392**(6679): 933-6.
- Dulhunty, A. F., et al. (1996). "Ion channels in the sarcoplasmic reticulum of striated muscle." *Acta Physiol Scand* **156**(3): 375-85.
- Elzanaty, S., et al. (2002). "The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility." *Hum Reprod* **17**(11): 2904-11.
- Evenson, D. P., et al. (1993). "Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry." *J Anim Sci* **71**(4): 955-62.
- Feske, S., et al. (2001). "Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes." *Nat Immunol* **2**(4): 316-24.
- Feske, S., et al. (2006). "A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." *Nature* **441**(7090): 179-85.
- Feske, S., et al. (2005). "A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients." *J Exp Med* **202**(5): 651-62.
- Fixemer, T., et al. (2003). "Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression." *Oncogene* **22**(49): 7858-61.
- Fleischer, S., et al. (1985). "Localization of Ca<sup>2+</sup> release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(21): 7256-9.
- Flemming, P. K., et al. (2006). "Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel." *J Biol Chem* **281**(8): 4977-82.
- Fong, C. J., et al. (1992). "Regulation of prostatic carcinoma cell proliferation and secretory activity by extracellular matrix and stromal secretions." *Prostate* **21**(2): 121-31.
- Foyouzi-Youssefi, R., et al. (2000). "Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5723-8.
- Franzini-Armstrong, C., et al. (2005). "The assembly of calcium release units in cardiac muscle." *Ann N Y Acad Sci* **1047**: 76-85.



- Freschi, M., et al. (2004). "Primary and pure neuroendocrine tumor of the prostate." Eur Urol **45**(2): 166-69; discussion 169-70.
- Fuentes, O., et al. (1994). "Calcium-dependent block of ryanodine receptor channel of swine skeletal muscle by direct binding of calmodulin." Cell Calcium **15**(4): 305-16.
- Fuessel, S., et al. (2003). "Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR." Int J Oncol **23**(1): 221-8.
- Fujimoto, T., et al. (1992). "Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae." J Cell Biol **119**(6): 1507-13.
- Furuya, Y., et al. (1994). "The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin." Cancer Res **54**(23): 6167-75.
- Gaddipati, J. P., et al. (1994). "Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers." Cancer Res **54**(11): 2861-4.
- Genazzani, A. A. and A. Galione (1997). "A Ca<sup>2+</sup> release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP." Trends Pharmacol Sci **18**(4): 108-10.
- Giannini, G., et al. (1995). "The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues." J Cell Biol **128**(5): 893-904.
- Gunteski-Hamblin, A. M., et al. (1992). "Molecular cloning and tissue distribution of alternatively spliced mRNAs encoding possible mammalian homologues of the yeast secretory pathway calcium pump." Biochemistry **31**(33): 7600-8.
- Hajnoczky, G., et al. (2000). "Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals." Cell Calcium **28**(5-6): 349-63.
- Hamman, B. D., et al. (1997). "The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane." Cell **89**(4): 535-44.
- Hamman, B. D., et al. (1998). "BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation." Cell **92**(6): 747-58.
- Hanaoka, K., et al. (2000). "Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents." Nature **408**(6815): 990-4.
- Hara, Y., et al. (2002). "LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death." Mol Cell **9**(1): 163-73.
- Hardie, R. C. (2006). "TRP channels and lipids: from Drosophila to mammalian physiology." J Physiol.

- He, H., et al. (1997). "Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2." J Cell Biol **138**(6): 1219-28.
- Hedlund, H. and P. Hedlund (1999). "Treatment of benign prostatic enlargement with alpha-blockers: an updated review." Scand J Urol Nephrol Suppl **203**: 9-13.
- Henshall, S. 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**(14): 4196-203.
- Heritage, D. and W. F. Wonderlin (2001). "Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule." J Biol Chem **276**(25): 22655-62.
- Heritage, D. and W. F. Wonderlin (2001). "Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule." J Biol Chem **276**(25): 22655-62.
- Hoenderop, J. G., et al. (2003). "Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6." Embo J **22**(4): 776-85.
- Hofer, A. M., et al. (1996). "ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores." Faseb J **10**(2): 302-8.
- Hoth, M., et al. (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**(19): 10607-12.
- Hoth, M. and R. Penner (1992). "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells." Nature **355**(6358): 353-6.
- Huang, S., et al. (1999). "Involvement of intermediary metabolites in the pathway of extracellular Ca<sup>2+</sup>-induced mitogen-activated protein kinase activation in human fibroblasts." Cell Signal **11**(4): 263-74.
- Huggins, C., et al. (1941). "Studies on prostatic cancer: the effects of castration, on advanced carcinoma of the prostate gland." Arch Surg **49**(209).
- Ihara, Y., et al. (1999). "Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro." Mol Cell **4**(3): 331-41.
- Inesi, G., et al. (1990). "Relationships of molecular structure and function in Ca<sup>2+</sup>(+)-transport ATPase." Physiol Rev **70**(3): 749-60.
- Isaacs, J. T. (1999). "The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?" Urol Clin North Am **26**(2): 263-73.
- Isaacs, J. T. and D. S. Coffey (1989). "Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia." Prostate Suppl **2**: 33-50.
- Kaneko, M. and Y. Nomura (2003). "ER signaling in unfolded protein response." Life Sci **74**(2-3): 199-205.

- Karayi, M. K. and A. F. Markham (2004). "Molecular biology of prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis **7**(1): 6-20.
- Karli, U. O., et al. (1990). "Fusion of neurotransmitter vesicles with target membrane is calcium independent in a cell-free system." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5912-5.
- Karlsson, E. (2001). "The role of pancreatic chromogranins in islet physiology." Curr Mol Med **1**(6): 727-32.
- Kedei, N., et al. (2001). "Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1." J Biol Chem **276**(30): 28613-9.
- Kiessling, A., et al. (2003). "Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8." Prostate **56**(4): 270-9.
- Kinsey, G. R., et al. (2005). "Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2." Biochem Biophys Res Commun **327**(1): 287-93.
- Kobayashi, K., et al. (2005). "Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors." J Comp Neurol **493**(4): 596-606.
- Kolisek, M., et al. (2005). "Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels." Mol Cell **18**(1): 61-9.
- Koopman, W. J., et al. (2003). "R-Ras alters Ca<sup>2+</sup> homeostasis by increasing the Ca<sup>2+</sup> leak across the endoplasmic reticular membrane." J Biol Chem **278**(16): 13672-9.
- Korge, P. and J. N. Weiss (1999). "Thapsigargin directly induces the mitochondrial permeability transition." Eur J Biochem **265**(1): 273-80.
- Koulen, P., et al. (2002). "Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel." Nat Cell Biol **4**(3): 191-7.
- Kudo, I. and M. Murakami (2002). "Phospholipase A2 enzymes." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 3-58.
- Kyprianou, N., et al. (1998). "Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia." J Urol **159**(6): 1810-5.
- Lambers, T. T., et al. (2006). "Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca<sup>2+</sup> transport." Embo J **25**(13): 2978-88.
- Lee, H. C. (2000). "NAADP: An emerging calcium signaling molecule." J Membr Biol **173**(1): 1-8.
- Lee, H. C. and R. Aarhus (2000). "Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose." J Cell Sci **113 Pt 24**: 4413-20.

- Lee, J., et al. (2005). "PIP2 activates TRPV5 and releases its inhibition by intracellular Mg<sup>2+</sup>." J Gen Physiol **126**(5): 439-51.
- Lee, S. O., et al. (2004). "RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells." Prostate **60**(4): 303-9.
- Legrand, G., et al. (2001). "Ca<sup>2+</sup> pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control." J Biol Chem **276**(50): 47608-14.
- Lewis, R. S. (2001). "Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes." Annu Rev Immunol **19**: 497-521.
- Lewis, R. S. and M. D. Cahalan (1989). "Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and transmembrane Ca<sup>2+</sup> current in human leukemic T cells." Cell Regul **1**(1): 99-112.
- Liou, J., et al. (2005). "STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx." Curr Biol **15**(13): 1235-41.
- Lomax, R. B., et al. (2002). "Basal and physiological Ca(2+) leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons." J Biol Chem **277**(29): 26479-85.
- Luik, R. M., et al. (2006). "The elementary unit of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions." J Cell Biol **174**(6): 815-25.
- Lytton, J. and D. H. MacLennan (1988). "Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene." J Biol Chem **263**(29): 15024-31.
- Lytton, J., et al. (1989). "Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase." J Biol Chem **264**(12): 7059-65.
- Ma, Z., et al. (2001). "Studies of insulin secretory responses and of arachidonic acid incorporation into phospholipids of stably transfected insulinoma cells that overexpress group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta ) indicate a signaling rather than a housekeeping role for iPLA2beta." J Biol Chem **276**(16): 13198-208.
- MacLennan, D. H., et al. (1985). "Amino-acid sequence of a Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence." Nature **316**(6030): 696-700.
- MacLennan, D. H., et al. (1997). "The mechanism of Ca<sup>2+</sup> transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases." J Biol Chem **272**(46): 28815-8.
- Macpherson, L. J., et al. (2005). "The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin." Curr Biol **15**(10): 929-34.

- Magnier, C., et al. (1992). "Regulation of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases during platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell proliferation." J Biol Chem **267**(22): 15808-15.
- Mak, D. O. and J. K. Foskett (1997). "Single-channel kinetics, inactivation, and spatial distribution of inositol trisphosphate (IP3) receptors in *Xenopus* oocyte nucleus." J Gen Physiol **109**(5): 571-87.
- Malm, J., et al. (2000). "Enzymatic action of prostate-specific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn(2+), a tight-binding inhibitor." Prostate **45**(2): 132-9.
- Mancuso, D. J., et al. (2000). "The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2)." J Biol Chem **275**(14): 9937-45.
- Manji, S. S., et al. (2000). "STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface." Biochim Biophys Acta **1481**(1): 147-55.
- Marengo, S. R. and L. W. Chung (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**(4): 277-86.
- Mariot, P., et al. (2000). "Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells." Prostate **43**(3): 205-14.
- McConkey, D. J. and S. Orrenius (1997). "The role of calcium in the regulation of apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **239**(2): 357-66.
- McHugh, D., et al. (2003). "Critical intracellular Ca<sup>2+</sup> dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation." J Biol Chem **278**(13): 11002-6.
- McKemy, D. D., et al. (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." Nature **416**(6876): 52-8.
- McNamara, F. N., et al. (2005). "Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1)." Br J Pharmacol **144**(6): 781-90.
- Meissner, G., et al. (1997). "Regulation of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) by Ca<sup>2+</sup> and monovalent cations and anions." J Biol Chem **272**(3): 1628-38.
- Mercer, J. C., et al. (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." J Biol Chem **281**(34): 24979-90.

- Michalak, M., et al. (1998). "Calreticulin, a multifunctional Ca<sup>2+</sup> binding chaperone of the endoplasmic reticulum." Biochem Cell Biol **76**(5): 779-85.
- Minke, B. (1977). "Drosophila mutant with a transducer defect." Biophys Struct Mech **3**(1): 59-64.
- Minn, A. J., et al. (1997). "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes." Nature **385**(6614): 353-7.
- Missiaen, L., et al. (1992). "Luminal Ca<sup>2+</sup> controls the activation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cytosolic Ca<sup>2+</sup>." J Biol Chem **267**(32): 22961-6.
- Missiaen, L., et al. (1992). "Calcium ion homeostasis in smooth muscle." Pharmacol Ther **56**(2): 191-231.
- Missiaen, L., et al. (1993). "Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> and glutathione increase the passive Ca<sup>2+</sup> leak in permeabilized A7r5 cells." Biochem Biophys Res Commun **193**(1): 6-12.
- Missiaen, L., et al. (1997). "Effect of adenine nucleotides on myo-inositol-1,4,5-trisphosphate-induced calcium release." Biochem J **325** ( Pt 3): 661-6.
- Montano, X. and M. B. Djamgoz (2004). "Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer." FEBS Lett **571**(1-3): 1-8.
- Montell, C. (1998). "TRP trapped in fly signaling web." Curr Opin Neurobiol **8**(3): 389-97.
- Montell, C. (2003). "Thermosensation: hot findings make TRPNs very cool." Curr Biol **13**(12): R476-8.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005**(272): re3.
- Montell, C., et al. (2002). "The TRP channels, a remarkably functional family." Cell **108**(5): 595-8.
- Moreno-Sanchez, R. (1985). "Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca<sup>2+</sup> concentrations." J Biol Chem **260**(7): 4028-34.
- Muchmore, S. W., et al. (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." Nature **381**(6580): 335-41.
- Murphy, B. C., et al. (1992). "Effects of extracellular matrix components and dihydrotestosterone on the structure and function of human prostate cancer cells." Prostate **20**(1): 29-41.
- Nakada, S. Y., et al. (1993). "The androgen receptor status of neuroendocrine cells in human benign and malignant prostatic tissue." Cancer Res **53**(9): 1967-70.
- Nash, P. D., et al. (1994). "Calreticulin: not just another calcium-binding protein." Mol Cell Biochem **135**(1): 71-8.
- Nicotera, P. and A. D. Rossi (1994). "Nuclear Ca<sup>2+</sup>: physiological regulation and role in apoptosis." Mol Cell Biochem **135**(1): 89-98.

- Nilius, B., et al. (2006). "The Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." *Embo J* **25**(3): 467-78.
- Ozawa, T. (2001). "Ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release mechanism in non-excitabile cells (Review)." *Int J Mol Med* **7**(1): 21-5.
- Parekh, A. B. and R. Penner (1997). "Store depletion and calcium influx." *Physiol Rev* **77**(4): 901-30.
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." *Physiol Rev* **85**(2): 757-810.
- Patel, S., et al. (1999). "Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." *Cell Calcium* **25**(3): 247-64.
- Pedersen, S. F., et al. (2005). "TRP channels: an overview." *Cell Calcium* **38**(3-4): 233-52.
- Peier, A. M., et al. (2002). "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol." *Cell* **108**(5): 705-15.
- Peinelt, C., et al. (2006). "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)." *Nat Cell Biol* **8**(7): 771-3.
- Perraud, A. L., et al. (2001). "ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology." *Nature* **411**(6837): 595-9.
- Perraud, A. L., et al. (2003). "NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase." *J Biol Chem* **278**(3): 1794-801.
- Pessah, I. N., et al. (1985). "The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **128**(1): 449-56.
- Pietri, F., et al. (1990). "Calcium mediates the interconversion between two states of the liver inositol 1,4,5-trisphosphate receptor." *J Biol Chem* **265**(29): 17478-85.
- Pinton, P., et al. (2000). "Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells." *J Cell Biol* **148**(5): 857-62.
- Pinton, P., et al. (2001). "The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action." *Embo J* **20**(11): 2690-701.
- Pinton, P., et al. (1998). "The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum." *Embo J* **17**(18): 5298-308.

- Potter, M. D. and C. V. Nicchitta (2002). "Endoplasmic Reticulum-bound Ribosomes Reside in Stable Association with the Translocon following Termination of Protein Synthesis." J Biol Chem **277**(26): 23314-20.
- Potter, M. D. and C. V. Nicchitta (2002). "Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis." J Biol Chem **277**(26): 23314-20.
- Pozzan, T., et al. (1994). "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores." Physiol Rev **74**(3): 595-636.
- Prakriya, M., et al. (2006). "Orail is an essential pore subunit of the CRAC channel." Nature **443**(7108): 230-3.
- Prewett, M., et al. (1996). "The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma." J Immunother Emphasis Tumor Immunol **19**(6): 419-27.
- Prinsloo, S. E. and C. H. Van Aswegen (2000). "The role of receptors in prostate cancer." Adv Clin Chem **35**: 101-60.
- Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." Cell Calcium **7**(1): 1-12.
- Putney, J. W., Jr. and G. S. Bird (1993). "The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells." Endocr Rev **14**(5): 610-31.
- Qian, F., et al. (1997). "PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain." Nat Genet **16**(2): 179-83.
- Raffo, A. J., et al. (1995). "Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo." Cancer Res **55**(19): 4438-45.
- Reddy, G. P., et al. (2006). "Regulatory processes affecting androgen receptor expression, stability, and function: potential targets to treat hormone-refractory prostate cancer." J Cell Biochem **98**(6): 1408-23.
- Rohrer, D. K., et al. (1991). "Influence of thyroid hormone and retinoic acid on slow sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and myosin heavy chain alpha gene expression in cardiac myocytes. Delineation of cis-active DNA elements that confer responsiveness to thyroid hormone but not to retinoic acid." J Biol Chem **266**(13): 8638-46.
- Roldan, E. R. and C. Fragio (1993). "Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca<sup>2+</sup>/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa." J Biol Chem **268**(19): 13962-70.



- Roos, J., et al. (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function." *J Cell Biol* **169**(3): 435-45.
- Roy, A. and W. F. Wonderlin (2003). "The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis." *J Biol Chem* **278**(7): 4397-403.
- Saito, Y., et al. (1999). "Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins." *Embo J* **18**(23): 6718-29.
- Sano, Y., et al. (2001). "Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2." *Science* **293**(5533): 1327-30.
- Schaefer, M. (2005). "Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits." *Pflugers Arch* **451**(1): 35-42.
- Schendel, S. L., et al. (1998). "Bcl-2 family proteins as ion-channels." *Cell Death Differ* **5**(5): 372-80.
- Schmechel, D., et al. (1978). "Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells." *Nature* **276**(5690): 834-6.
- Schmidt, U., et al. (2006). "Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer." *Prostate* **66**(14): 1521-34.
- Schwinn, D. A. and R. R. Price (1999). "Molecular pharmacology of human alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptors: unique features of the alpha 1a-subtype." *Eur Urol* **36**(Suppl 1): 7-10.
- Shannon, T. R., et al. (2000). "Reverse mode of the sarcoplasmic reticulum calcium pump and load-dependent cytosolic calcium decline in voltage-clamped cardiac ventricular myocytes." *Biophys J* **78**(1): 322-33.
- Shou, Y., et al. (2004). "Calcineurin-mediated Bad translocation regulates cyanide-induced neuronal apoptosis." *Biochem J* **379**(Pt 3): 805-13.
- Simmons, N. L. (1990). "A cultured human renal epithelioid cell line responsive to vasoactive intestinal peptide." *Exp Physiol* **75**(3): 309-19.
- Simon, S. M. and G. Blobel (1991). "A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum." *Cell* **65**(3): 371-80.
- Simon, S. M. and G. Blobel (1991). "A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum." *Cell* **65**(3): 371-80.
- Simon, S. M., et al. (1989). "Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(16): 6176-80.

- Simon, S. M., et al. (1989). "Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(16): 6176-80.
- Sionov, R. V. and Y. Haupt (1999). "The cellular response to p53: the decision between life and death." Oncogene **18**(45): 6145-57.
- Skryma, R., et al. (2000). "Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis." J Physiol **527 Pt 1**: 71-83.
- Skryma, R., et al. (2000). "Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis." J Physiol **527 Pt 1**: 71-83.
- Smani, T., et al. (2004). "A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway." Nat Cell Biol **6**(2): 113-20.
- Smith, P., et al. (2000). "Modulating effect of estrogen and testosterone on prostatic stromal cell phenotype differentiation induced by noradrenaline and doxazosin." Prostate **44**(2): 111-7.
- Soboloff, J., et al. (2006). "STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca<sup>2+</sup> Entry." Curr Biol **16**(14): 1465-70.
- Soboloff, J., et al. (2006). "Orail and STIM reconstitute store-operated calcium channel function." J Biol Chem **281**(30): 20661-5.
- Socci, R., et al. (1993). "In situ Ca(2+)-induced Ca<sup>2+</sup> release from a ryanodine-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> store in corneal epithelial cells." Comp Biochem Physiol B **106**(4): 793-7.
- Sorrentino, V. and P. Volpe (1993). "Ryanodine receptors: how many, where and why?" Trends Pharmacol Sci **14**(3): 98-103.
- Spassova, M. A., et al. (2006). "STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4040-5.
- Stathopoulos, P. B., et al. (2006). "Stored Ca<sup>2+</sup> depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca<sup>2+</sup> entry." J Biol Chem **281**(47): 35855-62.
- Stattin, P., et al. (2004). "High levels of circulating insulin-like growth factor-I increase prostate cancer risk: a prospective study in a population-based nonscreened cohort." J Clin Oncol **22**(15): 3104-12.
- Stefanovic, B., et al. (2004). "TRAM2 protein interacts with endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump Serca2b and is necessary for collagen type I synthesis." Mol Cell Biol **24**(4): 1758-68.

- Stewart, L. V. and N. L. Weigel (2004). "Vitamin D and prostate cancer." Exp Biol Med (Maywood) **229**(4): 277-84.
- Story, G. M., et al. (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." Cell **112**(6): 819-29.
- Streb, H., et al. (1983). "Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate." Nature **306**(5938): 67-9.
- Suh, J. and A. B. Rabson (2004). "NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon?" J Cell Biochem **91**(1): 100-17.
- Sutko, J. L. and J. A. Airey (1996). "Ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels: does diversity in form equal diversity in function?" Physiol Rev **76**(4): 1027-71.
- Sutko, J. L., et al. (1997). "The pharmacology of ryanodine and related compounds." Pharmacol Rev **49**(1): 53-98.
- Thebault, S., 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**(47): 39423-35.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Toyoshima, C. and H. Nomura (2002). "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium." Nature **418**(6898): 605-11.
- Tsavalier, L., et al. (2001). "Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins." Cancer Res **61**(9): 3760-9.
- Tsiokas, L., et al. (1999). "Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3934-9.
- Turner, H., et al. (2003). "Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity." Biochem J **371**(Pt 2): 341-50.
- Untergasser, G., et al. (2001). "Seminal plasma factors induce in vitro PRL secretion in smooth muscle cells of the human prostate." J Clin Endocrinol Metab **86**(11): 5577-84.
- Van Coppenolle, F., et al. (2004). "Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores." J Cell Sci **117**(Pt 18): 4135-42.
- Vanden Abeele, F., et al. (2004). "Two types of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells." J Biol Chem **279**(29): 30326-37.

- Vanden Abeele, F., et al. (2006). "Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids." J Biol Chem **281**(52): 40174-82.
- Vanoverberghe, K., et al. (2003). "Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells." Cell Calcium **34**(1): 75-85.
- Vanoverberghe, K., et al. (2004). "Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells." Cell Death Differ **11**(3): 321-30.
- Vazquez, E. and M. A. Valverde (2006). "A review of TRP channels splicing." Semin Cell Dev Biol **17**(6): 607-17.
- Vig, M., et al. (2006). "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." Curr Biol **16**(20): 2073-9.
- Vig, M., et al. (2006). "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry." Science **312**(5777): 1220-3.
- Visakorpi, T., et al. (1995). "In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer." Nat Genet **9**(4): 401-6.
- Williams, R. J. (2002). "Calcium." Methods Mol Biol **172**: 21-49.
- Wisnoskey, B. J., et al. (2003). "Activation of vanilloid receptor type I in the endoplasmic reticulum fails to activate store-operated Ca<sup>2+</sup> entry." Biochem J **372**(Pt 2): 517-28.
- Wissing, F., et al. (2002). "A novel Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release mechanism mediated by neither inositol trisphosphate nor ryanodine receptors." Biochem J **361**(Pt 3): 605-11.
- Wu, K. D., et al. (1995). "Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts." Am J Physiol **269**(3 Pt 1): C775-84.
- Wu, M. M., et al. (2006). "Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." J Cell Biol **174**(6): 803-13.
- Xu, H., et al. (2005). "Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism." J Neurosci **25**(39): 8924-37.
- Xu, P., et al. (2006). "Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1." Biochem Biophys Res Commun **350**(4): 969-76.
- Yang, X. R., et al. (2006). "Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(6): L1267-76.
- Yeromin, A. V., et al. (2006). "Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai." Nature **443**(7108): 226-9.
- Yuan, J. P., et al. (2003). "Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors." Cell **114**(6): 777-89.

- Zhang, L. and G. J. Barritt (2004). "Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca<sup>2+</sup> channel required for the survival of prostate cancer cells." Cancer Res **64**(22): 8365-73.
- Zhang, S. L., et al. (2006). "Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9357-62.
- Zhang, S. L., et al. (2005). "STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane." Nature **437**(7060): 902-5.
- Zhang, W., et al. (2003). "A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death." J Biol Chem **278**(18): 16222-9.
- Zhou, J. R., et al. (2004). "Progression to androgen-independent LNCaP human prostate tumors: cellular and molecular alterations." Int J Cancer **110**(6): 800-6.
- Zhu, N. and Z. Wang (1999). "Calreticulin expression is associated with androgen regulation of the sensitivity to calcium ionophore-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells." Cancer Res **59**(8): 1896-902.
- Zweifach, A. and R. S. Lewis (1993). "Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6295-9.
- Zygmunt, P. M., et al. (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." Nature **400**(6743): 452-7.