



HAL
open science

Implication du canal calcique TRPV6 dans l'acquisition du phénotype métastatique du cancer de la prostate : ciblage de TRPV6 par un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope extracellulaire

Aurélien Haustrate

► To cite this version:

Aurélien Haustrate. Implication du canal calcique TRPV6 dans l'acquisition du phénotype métastatique du cancer de la prostate : ciblage de TRPV6 par un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope extracellulaire. Cancer. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS101 . tel-04416602

HAL Id: tel-04416602

<https://theses.hal.science/tel-04416602>

Submitted on 25 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Année 2022

THESE

Présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Faculté des sciences et technologies

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Implication du canal calcique TRPV6 dans l'acquisition du phénotype métastatique du cancer de la prostate : ciblage de TRPV6 par un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope extracellulaire

Thèse dirigée par le Dr. V'yacheslav Lehen'kyi

Présentée et soutenue publiquement par

Aurélien Haustrate

Le 18 janvier 2022

Composition du jury :

Pr. Philippe Delannoy, CNRS 8576, Université de Lille	Président du jury
Dr. HDR Laurence Bresson-Bepoldin, CR1 CNRS, U916, Bordeaux	Rapporteur
Dr. HDR Michel De Waard, DR INSERM 1087, Nantes	Rapporteur
Dr. Yoann Sottejeau, SATT Nord, Lille	Examineur
Pr. Natacha Prevarskaya, INSERM U1003, Université de Lille	Examineur
Dr. HDR V'yacheslav Lehen'kyi, INSERM U1003, Université de Lille	Examineur

RESUME

Un vaste ensemble de preuves suggère que la (sur)expression du canal calcique TRPV6 est un fait commun dans les cancers d'origine épithéliale dont le cancer de la prostate (PCa), sixième cause de mortalité due au cancer dans le monde. Il a été montré que TRPV6 est totalement absent dans les tissus de prostate saine alors qu'il devient de plus en plus exprimé en fonction du stade du cancer. Il a également été démontré que TRPV6 est directement impliqué dans le contrôle de la croissance des cellules PCa, augmentant la prolifération mais aussi la résistance à l'apoptose. TRPV6 constitue donc une cible intéressante. Cependant, aucun outil fiable ciblant le canal TRPV6 n'a été reporté à ce jour pour être utilisé comme thérapie ciblée contre le cancer.

Dans ce but, nous avons tout d'abord ciblé la première boucle extracellulaire ainsi que la région du pore du canal avec la génération d'anticorps polyclonaux de lapin, respectivement rb79 et rb82. Nous avons montré que ces deux anticorps activent spécifiquement le canal TRPV6 *in vitro*, permettant l'entrée massive de calcium à l'intérieur de la cellule, induisant un excès de calcium dans la mitochondrie et entraînant ainsi la mort cellulaire par apoptose des cellules PCa qui (sur)exprime ce canal à la membrane plasmique.

A la suite de ces résultats, nous avons tenté de générer des anticorps monoclonaux de souris. Seul un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le pore du canal a réussi à être généré, MAB82. Cet anticorps, au contraire de rb79 et rb82, a pour effet de diminuer l'activité de TRPV6, induisant une diminution de l'entrée de calcium et conduisant à une diminution de la viabilité cellulaire et de la résistance à l'apoptose. Ces résultats suggèrent que différents mécanismes médiés par TRPV6 peuvent être impliqués pour induire une répression de la croissance des cellules PCa. De même, l'utilisation de MAB82 *in vivo* sur des souris swiss nude immunodéficientes ayant reçu une xéno greffe de cellules PCa a montré une diminution significative de la croissance tumorale et de l'apparition de métastases comparé au contrôle MABAU1 de même isotype.

Nous avons également démontré la potentielle utilisation de TRPV6 comme marqueur diagnostique de PCa en utilisant des coupes de tumeurs issues de patients. En effet, rb79 et MAB82 marquent spécifiquement les coupes de PCa alors qu'aucun marquage n'est observé dans des coupes de prostate saine.

En conclusion, nous avons généré des anticorps efficaces ciblant le canal calcique TRPV6 qui, via la modification de son activité (activation ou inhibition), peuvent diminuer la croissance tumorale à travers différents mécanismes, ce qui représente une alternative intéressante pour traiter les tumeurs de la prostate à la fois à des stades précoces mais aussi à des stades plus avancés. L'humanisation de ces anticorps est une des prochaines étapes dans l'avancée des études précliniques, qui sont nécessaires pour proposer l'utilisation d'anticorps ciblant TRPV6 chez des patients atteints de PCa.

ABSTRACT

A large body of evidence suggests that the (over)expression of the calcium channel TRPV6 is a common finding in cancers of epithelial origin including prostate cancer (PCa) - the sixth leading cause of cancer death worldwide. TRPV6 was shown to be completely absent in healthy prostate tissue with its expression correlating to the PCa tumor grade. It has also been shown to be directly involved in the control of PCa cell proliferation, increasing proliferation and survival rates, as well as in the apoptosis resistance of PCa cells. TRPV6 is, therefore, a prospective target, however, no reliable tool targeting the TRPV6 channel has been reported to date for use as a targeted cancer therapy.

To achieve this aim, we firstly have targeted both large extracellular loop and the pore region with the custom-made rabbit polyclonal antibodies, rb79 and rb82, respectively. These two antibodies specifically activated TRPV6 channel *in vitro*, allowing massive calcium entry into the cell, inducing mitochondria calcium overload and thus leading to the cell death via the apoptosis in PCa cells which (over)express this channel at the plasma membrane. Further attempt has been undertaken to generate mouse monoclonal antibodies whereas only one monoclonal antibody directed against the channel pore was generated, i.e. MAB82. This antibody, on the contrary to rb79 and rb82, has decreased the TRPV6 activity and thus calcium entry, resulting in the decrease of cell viability and resistance to apoptosis. These results suggest that different mechanisms mediated by TRPV6 may be involved to induce PCa cells repression. Similarly, the use of MAB82 *in vivo* in the immunodeficient swiss nude mice grafted with PCa cells, showed a significant decrease in tumor growth and metastasis as compared to the control MABAU1 of the same isotype. Moreover, we have also demonstrated the potential use of the TRPV6 as a diagnostic marker for PCa using patient tumor sections, since both rb79 and MAB82 have no staining of the healthy prostate, but the clear staining of the PCa cells.

In conclusion, we have generated the efficient antibodies against TRPV6 calcium channel, which, via the modification of its activity (either activation or inhibition), may repress PCa tumor growth, though by the different mechanisms, and thus represent a prospective treatment

against PCa at both early and advanced stages. The humanization of these antibodies is a further step into the more advanced preclinical studies, which are necessary in order to propose the use of these antibodies against TRPV6 in human patients suffering from PCa.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais, dans un premier temps, remercier les membres de mon jury de thèse :

Pr Delannoy, vous m'avez accompagné et guidé durant toute la durée de ma thèse en ayant participé à mes CSI. Vos conseils m'ont véritablement aidé et c'est pour moi un immense plaisir que vous ayez accepté de présider ce jury de thèse.

Dr Michel De Waard et Dr Laurence Bresson-Bepoldin, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et suis reconnaissant du temps consacré à lire et évaluer l'ensemble de mes travaux.

Dr Yoann Sottejeau, merci d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse dont vous connaissez la quasi totalité des travaux. Il était naturel pour moi de vous inviter pour conclure ma thèse sachant que vous m'avez accompagné tout au long de celle-ci. C'était très instructif de travailler avec la SATT Nord qui a un regard différent de celui dans lequel nous travaillons en tant que chercheur.

Pr Natalia Prevarskaya, je vous suis très reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de m'avoir accordé votre confiance tout au long de cette thèse.

Je tiens également à remercier **l'Université de Lille et la région Hauts-de-France** pour le financement qui m'a été accordé.

Slava, merci pour l'opportunité que tu m'as donné de travailler avec toi. Tu m'as formé de A à Z depuis la L3. Je pense sincèrement que j'avais besoin de tomber sur quelqu'un comme toi pour que je réussisse cette thèse. Je ne pense pas me tromper en affirmant qu'on est plutôt « opposés » tous les deux et, pour cela, je pense que l'on se complète bien. Ton sens critique et ton sens du détail m'ont fait prendre conscience du niveau que je devais atteindre. On a partagé de très bons moments ensemble comme des plus mauvais mais finalement, malgré ton caractère unique, nous avons toujours su trouver un terrain d'entente (d'un point de vue scientifique). Tu es passionné de recherche, ça se voit et c'est communicatif. Mis à part la recherche scientifique, j'ai apprécié la personne que tu es, toujours honnête et franc. Même si certaines personnes n'apprécient pas forcément ce trait de caractère, reste comme tu es (en gardant mes modifications).

Je tiens également à remercier les collaborateurs avec qui j'ai travaillé. Tout d'abord, je remercie le **Dr Adriana Mihalache** (Hôpital St Vincent de Paul, Lille) pour son expertise sur les lames de patients et pour les marquages IHC réalisés. Je remercie également le **Dr Corentin Spriet** pour ses compétences en vidéomicroscopie. Je remercie également le **Dr Alexandre Barras** pour avoir couplé notre anticorps avec un marqueur fluorescent permettant de visualiser celui-ci en imagerie petit animal.

Bien sûr, je remercie tous les membres du laboratoire pour leur bonne humeur, leurs conseils et leur soutien, trop nombreux pour tous les citer ici.

Eric, je ne sais pas si tu liras ceci un jour mais sache que ce fût un réel plaisir de discuter avec toi. Merci pour le soutien que tu m'as apporté depuis le Master 1, tu m'as mis à l'aise directement et je ne l'oublierai pas.

Charlotte, seule et unique collègue de bureau (95% du temps), merci d'avoir supporté avec moi le phénomène à ma droite. C'était un plaisir de discuter avec toi, de recherche mais aussi de tout et de rien. On aura bien rigolé durant ces quelques années et je ne pense pas retrouver quelqu'un au travail avec qui je pourrais discuter si facilement (par exemple Koh-Lanta). Mis à part le côté social, tu es clairement la chercheuse la plus accomplie que j'ai pu rencontrer au laboratoire. Malgré les échecs que tu as rencontrés, tu n'as jamais lâché et pour cela tu as largement mérité ton poste de CR au laboratoire, encore félicitations.

Valério, alias le dieu du clonage, il va falloir trouver quelqu'un d'autre dorénavant pour mettre tes bactéries au frigo le week-end ou pour prélever tes colonies. Sinon, merci pour ta bonne humeur au laboratoire, reste comme tu es. Tu peux me laisser en copie des mails du vendredi soir pour les « oublis », j'apprécie toujours (quand ce n'est pas ma faute). Et bien sûr, bon courage à Lina pour te supporter encore quelques mois (je lui traduirais cette partie car je ne suis pas sûr que tu lui transmettras).

Pauline, Brigitte et Sandy, merci d'avoir été là pour m'aider avec toute la paperasse administrative que j'affectionne particulièrement (ou pas).

Je n'oublie pas les stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer durant cette thèse : **Benjamin, Aline, Clément, Etienne, Louis, Jules et Louise**. J'espère vous avoir transmis cette passion pour la recherche et vous souhaite de réussir dans votre parcours.

Pour finir, j'aimerais remercier ceux qui ont toujours été là pour moi et qui le seront toujours : ma famille. Merci à **mes parents** d'avoir cru en moi du début jusqu'à la fin et de m'avoir soutenu dans mon parcours.

Je n'oublie pas mon oncle **Didier**, parti trop tôt, qui, j'en suis certain, aurait été fier de pouvoir voir où j'en suis arrivé actuellement.

Enfin, un énorme merci à **Ludivine**, avec qui je partage ma vie depuis maintenant 12 ans qui a su être patiente jusqu'à la fin de ces longues études et pour son soutien sans faille.

SOUTIENS FINANCIERS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été possibles grâce au financement de thèse accordé par la région Hauts-de-France et l'université de Lille.



SOUTIENS FINANCIERS.....	9
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	14
1) PUBLICATIONS	14
2) DEPOT DE BREVET.....	14
3) COMMUNICATIONS.....	15
GLOSSAIRE.....	18
INTRODUCTION.....	24
I. LA PROSTATE ET LE CANCER.....	25
1) <i>Physiologie de la prostate</i>	25
a) Rôle physiologique	25
b) Structure de la prostate	26
c) Histologie	27
d) Régulation hormonale	28
2) <i>Cancer de la prostate</i>	30
a) Généralités sur le cancer	31
b) Symptômes	32
c) Diagnostic	32
d) Classification	34
i. Le score de Gleason	34
ii. Classification TNM	35
iii. Vers un nouveau type de classification	37
e) Traitements	37
II. LES CANAUX CALCIQUES ET LE CANCER	40
1) <i>Le calcium dans la physiologie cellulaire</i>	40
2) <i>Homéostasie calcique</i>	40
3) <i>Canaux ioniques et calcium</i>	41
4) <i>La superfamille des canaux TRP</i>	43
5) <i>Entrée capacitive de calcium</i>	44
6) <i>Dérégulations de l'homéostasie calcique dans le cancer</i>	45
a) Effets sur la prolifération	46
b) Effets sur l'apoptose	46
c) Effets sur d'autres caractéristiques spécifiques du cancer	46
III. ROLE DE TRPV6 DANS LE CANCER LA PROSTATE.....	47
1) <i>Structure</i>	47
2) <i>Régulation du canal TRPV6</i>	48
3) <i>Fonctions physiologiques de TRPV6</i>	49

4) <i>Implication de TRPV6 dans la croissance tumorale</i>	50
a) Modifications d'expression de TRPV6 dans le cancer	50
b) Rôle de TRPV6 dans le cancer de la prostate	51
5) <i>Régulation hormonale de TRPV6</i>	53
a) Régulation par la vitamine D3	53
b) Régulation par d'autres facteurs	54
IV. TRPV6 COMME CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE PCA	54
1) <i>Pharmacologie</i>	54
2) <i>Utilisation des anticorps thérapeutiques</i>	55
PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS	60
MATERIEL ET METHODES	65
I. MODELES ANIMAUX ET ECHANTILLONS DE PATIENTS	66
1) <i>Xénogreffes dans un modèle de souris Swiss-nude</i>	66
2) <i>Echantillons de patients</i>	67
II. MODELES CELLULAIRES ET CULTURE	68
1) <i>Modèles cellulaires</i>	68
2) <i>Culture cellulaire</i>	69
3) <i>Clones stables</i>	69
4) <i>Transfections</i>	69
a) <i>Lipofection des siARN</i>	69
b) <i>Lipofection de vecteurs d'expression</i>	70
c) <i>Nucléofection</i>	71
III. BIOLOGIE MOLECULAIRE	71
1) <i>Extraction d'ARN et RT</i>	71
2) <i>PCR semi-quantitative</i>	71
.....	72
3) <i>PCR quantitative en temps réel</i>	72
4) <i>ARN profiling de TRPV6</i>	74
5) <i>Génération des anticorps</i>	74
IV. ANALYSE PROTEOMIQUE	75
1) <i>Extraction de protéines totales</i>	75
2) <i>Western-blot</i>	76
3) <i>Biotinylation</i>	76
4) <i>Immunohistochimie</i>	77
V. ETUDES FONCTIONNELLES	77
1) <i>Viabilité cellulaire</i>	77
a) <i>Coloration au bleu de trypan</i>	77

b) Test de MTS	77
c) Cytométrie en flux.....	78
i. Cycle cellulaire.....	78
ii. Etude du marquage des cellules avec les anticorps	78
2) <i>Mort cellulaire</i>	79
a) Coloration de Hoechst.....	79
b) Technique de TUNEL	79
3) <i>Migration cellulaire</i>	80
VI. IMAGERIE CALCIQUE ET ELECTROPHYSIOLOGIE	81
1) <i>Imagerie calcique</i>	81
2) <i>Patch clamp</i>	81
RESULTATS	84
I. GENERATION ET VALIDATION D'ANTICORPS ANTI-TRPV6 ET LEURS UTILISATIONS DANS LE DIAGNOSTIC DU CANCER DE LA PROSTATE ET DANS DES APPLICATIONS <i>IN VITRO</i>	85
1) <i>Génération de 4 anticorps polyclonaux de lapin</i>	86
2) <i>Révélation de l'expression protéique de TRPV6 avec les anticorps polyclonaux de lapin</i>	88
3) <i>Existe-t-il des variants d'épissage de la protéine TRPV6 dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP ?</i>	92
4) <i>Utilisation de l'anticorps polyclonal de lapin rb79 dans des expériences d'immunofluorescence et FACS</i>	93
5) <i>Utilisation de l'anticorps rb79 dans le diagnostic et le pronostic en clinique</i>	96
II. LE CIBLAGE DU CANAL CALCIQUE TRPV6 PAR DES ANTICORPS POLYCLONAUX DIRIGES CONTRE L'ÉPITOPE EXTRACELLULAIRE INDUISENT L'APOPTOSE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES	102
1) <i>Design et validation des anticorps dirigés contre les épitopes extracellulaires du canal TRPV6</i>	103
2) <i>Des traitements avec les anticorps augmentent l'entrée capacitive de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques</i>	107
3) <i>Les anticorps rb79 et rb82 affectent directement les courants du canal TRPV6</i>	109

4) <i>Diminution de la survie cellulaire via la modulation de l'activité de TRPV6</i>	111
5) <i>Hypothèses des mécanismes d'action des anticorps rb79 et rb82</i>	115
III. LE CIBLAGE DE TRPV6 PAR UN ANTICORPS MONOCLONAL DE SOURIS MAB82 DIRIGE CONTRE LE PORE DU CANAL INHIBE L'ENTREE DE CALCIUM, INDUIT LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE ET DIMINUE LA CROISSANCE TUMORALE <i>IN VIVO</i>	118
a) <i>MAB82 inhibe l'activité de TRPV6, diminuant ainsi l'entrée calcique médiée par TRPV6 et entraînant la mort cellulaire par apoptose</i>	119
b) <i>In vivo, MAB82 induit une diminution de la croissance tumorale et une diminution de l'apparition de métastases</i>	123
IV. ETUDE DU ROLE DE TRPV6 DANS LA MISE EN PLACE DU PHENOTYPE AGRESSIF/METASTATIQUE DU CANCER DE LA PROSTATE	129
DISCUSSION	132
PERSPECTIVES	142
ANNEXES	145
BIBLIOGRAPHIE	166

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1) Publications

1. **Aurélien Haustrate**, Natalia Prevarskaya and V'yacheslav Lehen'kyi. Role of the TRPV Channels in the Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. *Cells* 2020, 9(2), 317; <https://doi.org/10.3390/cells9020317> (registering DOI) - 28 Jan 2020.
2. **Aurélien Haustrate**, Aline Hantute-Ghesquier, Natalia Prevarskaya and V'yacheslav Lehen'kyi. Monoclonal Antibodies Targeting Ion Channels and Their Therapeutic Potential. **Frontiers in Pharmacology**, 2019 published: 05 June 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00606.
3. Mohammadi, Fakhrossadat; Sahraei, Amin; Li, Chengnan; **Haustrate, Aurélien**; Lehen'kyi, V'yacheslav ; Barras, Alexandre; Boukherroub, Rabah; Szunerits, Sabine. Interaction of Human α -1-Acid Glycoprotein (AGP) with Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles: Formation of Unexpectedly Strong Binding Events. **The Journal of Physical Chemistry**. 2019. 12, 38, 5073-5083.
4. Aline Hantute-Ghesquier, **Aurélien Haustrate**, Natalia Prevarskaya, and V'yacheslav Lehen'kyi. TRPM Family Channels in Cancer. **Pharmaceuticals** 2018, 11, 58; doi:10.3390/ph11020058.
5. Alexandre Barras, Nadia Skandrani, Mariano Gonzalez Pisfil, Solomiya Paryzhak, Tetiana Dumych, **Aurelien Haustrate**, Laurent Heliot, Tijani Gharbi, Hatem Boulahdour, V'yacheslav Lehen'kyi, Rostyslav Bilyy, Sabine Szunerits, Gabriel Bidaux, and Rabah Boukherroub. Improved Photodynamic Effect through Encapsulation of Two Photosensitizers in Lipid Nanocapsules. **J. Mater. Chem. B**, 2018, 6, 5949-5963

2) Dépôt de brevet

Dépôt du brevet avec la SATT Nord intitulé “ Antibodies against extracellular epitopes of human TRPV6 channel and their diagnostic and therapeutic uses”, 2021

Submission number : 1000504057

Application number : EP21306438.9

File No. to be used for priority declarations : EP21306438

Date of receipt : 14 October 2021

3) Communications

1. **Aurélien Haustrate**; Aline Ghesquier; Corentin Spriet; Natalia Prevarskaya, V'yacheslav Lehen'kyi. ROLE OF TRPV6 CALCIUM CHANNEL IN CANCER CELL LINES MIGRATION AND INVASION. Poster pour le congrès du LabEx « Ion channels science and therapeutics » **2021**, Nantes.
2. Aline Ghesquier; **Aurélien Haustrate**; Corentin Spriet; Natalia Prevarskaya, V'yacheslav Lehen'kyi. INVOLVEMENT OF TRPV6 CHANNEL IN INVASIVE PHENOTYPE OF CANCER CELL LINES. Poster pour la journée de l'ARTP du 20 novembre **2019**, Paris.
3. Aline Ghesquier; **Aurélien Haustrate**; Corentin Spriet; Natalia Prevarskaya, V'yacheslav Lehen'kyi. Poster: ROLE OF TRPV6 CHANNEL IN MIGRATION AND INVASION OF CANCER CELL LINES. 30th Ion Channel Meeting, September 8th to 11th, **2019**, Sète, France, p.38.
4. **Haustrate A.** TRPV6 channel participates in cancer cell line migration irrespective of the compensation effect via TRPV5. **Oral presentation** at the 3rd LabEx ICST Young Researchers Meeting, 17th and 18th January **2019**, Genopolys, Montpellier, France.
5. Hantute-Ghesquier A, **Haustrate A.** Spriet C, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPV6 CHANNEL CONTRIBUTES TO THE CANCER CELL LINES MIGRATION POTENTIAL. Poster pour la « 1^{ère} journée de recherche : Signalisations Oncogéniques et canaux ioniques du Cancéropôle Nord-Oest » du 27 novembre **2018**, Logis du Roy, Amiens, poster 2.

6. **Haustrate A**, Hantute-Ghesquier A, Couturier C, Prouvost L, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPV6^{-/-} CELL LINES SHOW THE PHENOMENON OF COMPENSATION WHILE OVEREXPRESSING THE TRPV5. Poster pour la « 1^{ère} journée de recherche : Signalisations Oncogéniques et canaux ioniques du Cancéropôle Nord-Oest » du 27 novembre **2018**, Logis du Roy, Amiens, poster 5.
7. **Haustrate A**, Hantute-Ghesquier A, Prouvost L, Couturier C, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPV6^{-/-} CELL LINES SHOW THE OVEREXPRESSION OF THE TRPV6'S CLOSE ANALOGUE TRPV5. Poster pour la journée de l'ARTP de 15 novembre **2018**, Paris, p. 16.
8. Aline Hantute-Ghesquier, **Aurélien Haustrate**, Corentin Spriet, Natalia Prevarskaya, V'yacheslav Lehen'kyi. ROLE OF TRPV6 CHANNEL IN CANCER CELL LINES MIGRATION. Poster pour la journée de l'ARTP de 15 novembre **2018**, Paris, p. 15.
9. **Haustrate A**, Hantute-Ghesquier A, Prouvost L, Couturier C, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. GENERATION AND VALIDATION OF TRPV6^{-/-} CELL LINES. 29th Ion Channel Meeting, 7th SFICT Workshop, September 9th to 12th, **2018**, Sète, France, p.62.
10. **Haustrate A**, Raphaël M, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchyk S, Vanden Abeele F, Farsetti L, Germain E, Bokhobza A, Mihalache A, Gosset P, Romanin C, Clézardin P, Skryma R, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPV6 CALCIUM CHANNEL TRANSLOCATION REGULATES PROSTATE CANCER CELL SURVIVAL. Poster at LabEx ICST Meeting, LILLIAD Learning Center Innovation, November 29th – December 1st, **2017**, Lille
11. **Haustrate A**, Raphaël M, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchyk S, VandenAbeele F, Farsetti L, Germain E, Bokhobza A, Mihalache A, Gosset P, Romanin C, Clézardin P, Skryma R, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPV6 CALCIUM CHANNEL TRANSLOCATION REGULATES PROSTATE CANCER CELL SURVIVAL. Poster pour la journée de l'ARTP de 15 novembre **2017**, Paris.

12. Lehen'kyi V, **Haustrate A**, Raphaël M, Kondratskyi A, Oulidi A, Flourakis M, Khalimonchyk S, Gordienko D, Prevarskaya N. TRPV6 DETERMINES THE EFFECT OF VITAMIN D3 ON PROSTATE CANCER CELL GROWTH. 42nd Symposium on Hormones and Cell Regulation: "Ion Channels in Hormonal Homeostasis: Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signalling", Mont Sainte Odile, October 4-7, **2017**, p. 62.
13. **Haustrate A**, Raphaël M, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchyk S, Vanden Abeele F, Farsetti L, Germain E, Bokhobza A, Mihalache A, Gosset P, Romanin C, Clézardin P, Skryma R, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPV6 calcium channel trafficking to the plasma membrane is crucial for prostate cancer cell survival. 42nd Symposium on Hormones and Cell Regulation: "Ion Channels in Hormonal Homeostasis: Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signalling", Mont Sainte Odile, October 4-7, **2017**, p. 58.

GLOSSAIRE

2-APB : 2-AminoethoxydiPhenyl Borate

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AM : AcetoxyMethyl ester

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AR : Androgen Receptor

ARD : Ankyrin Repeat Domain

ARE : Androgen Response Element

ARN : Acide RiboNucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine TriPhosphate

BSA : Bovine Serum Albumin

Cas9 : CRISPR-associated protein 9

CHO : Chinese Hamster Ovary

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DAG : diacylglycerol

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DHT : 5 α -DiHydroTestostérone

DMEM : Dulbecco Modified Eagle's Medium

dNTP : deoxyribose nucleoside triphosphate

DT : Domaine Transmembranaire

DTT : dithiothreitol

ECL : Enhanced ChemiLuminescence

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EGF : Epithelial Growth Factor

EGTA : Ethylene Glycol tetraacetic Acid

FACS : Fluorescence-activated cell sorting

FGF : Fibroblast Growth Factor

FSH : Follicle Stimulating Hormone

G418 : Geneticin

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFP : Green Fluorescent Protein

HAP-1 :

HBP : Hyperplasie Bénigne

HEK : Human Embrionic Kidney

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase

HRP : Horse Radish Peroxidase

IF : ImmunoFluorescence

IgG : immunoglobuline G

IHC : immunohistochimie

IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate

KO : Knock-out

LH : Luteinizing Hormone

LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone

LNCaP : Lymph Node Carcinoma of the Prostate

MAB : Monoclonal AntiBody

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEM : Minimum Essential Media

MMP : Matrix Metallo-Proteinase

MP : Membrane plasmique

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

MULV : Murine Leukemia Virus

NFAT : Nuclear Factor of Activated T cell

PAF : Paraformaldéhyde

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : Phosphate Buffered Saline

PC-3 : Prostate Cancer 3

PCa : Prostate Cancer

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI : Propidium Iodide

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIN : prostatic intraepithelial neoplasia

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PMCA : Plasma Membrane Calcium ATPase

PMS : Phenazine MethoSulfate

PNT1a : Prostate Non Tumor 1a

PSA : Prostate Specific Antigen

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PVDF : PolyVinyliDene Fluoride

RE : Réticulum Endoplasmique

RISC : RNA-induced Silencing Complex

RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay

ROC : Receptor-Operated Channel

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

RT : Reverse Transcription

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEM : Standard Error of the Mean

SERCA : Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase

SFMA : Stroma FibroMusculaire Antérieur

siARN : small interferent ARN

SMOC : Second Messenger-Operated Channel

SOC : Store-Operated Channel

SOCE : Store-Operated Calcium Entry

SOR-C13 : Soricidin C-13

STIM : Stromal Interaction Molecule

SVF : Sérum de veau foetal

TG : thapsigargin

TNM : Tumor, Node, Metastasis

TNT : Tris-NaCl-Tween buffer

TRP : Transient receptor potential

TRPC : TRP Canonical

TRPM : TRP Melastatin

TRPV : TRP Vanilloid

TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl transferase DUTP nick end labeling

UV : UltraViolet

VDR : Vitamin D Receptor

VOC : Voltage-Operated Channel

YFP : Yellow Fluorescent Protein

ZC : Zone centrale

ZP : Zone périphérique

ZT : Zone de Transition

INTRODUCTION

I. LA PROSTATE ET LE CANCER

1) Physiologie de la prostate

a) Rôle physiologique

La prostate est une petite glande appartenant à l'appareil reproducteur masculin. Elle est localisée sous la vessie, dans la cavité pelvienne, en avant du rectum et en arrière de la symphyse pubienne (Figure 1). Elle entoure le canal de l'urètre, qui évacue l'urine stockée dans la vessie. Chez l'adulte, la prostate mesure environ 3 cm de haut, 4 cm de large et 2 cm de profondeur avec une masse d'approximativement 20 g. La prostate est facilement palpable par un toucher rectal grâce à sa consistance plutôt ferme par sa face postérieure, ce qui permet de détecter une potentielle hyperplasie bénigne (HBP). Cette glande est petite chez l'enfant puis se développe au fur et à mesure lors de la puberté sous l'effet des hormones sexuelles produites par les testicules et les glandes surrénales. Elle devient donc, dès la puberté, fonctionnelle. Après l'âge de 50 ans, elle devient la plupart du temps hypertrophiée pouvant conduire à une hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) avec des complications urinaires.



Figure 1. Schéma montrant la localisation de la glande prostatique au sein des voies génito-urinaires masculines (<https://www.arcagy.org/>).

La glande prostatique est une glande exocrine. Elle synthétise le liquide prostatique. Ce liquide prostatique est contenu dans les vésicules séminales qui, avec les glandes de Cowper, participent à la production du liquide séminal, fluide composant la majorité du sperme ayant pour but de véhiculer les spermatozoïdes jusqu'à l'ovule afin de le féconder. Le liquide prostatique compose 10 à 30% du liquide séminal. Le liquide séminal aide notamment les spermatozoïdes à survivre à l'intérieur du vagin (pH acide) jusqu'au col de l'utérus.

b) Structure de la prostate

La partie supérieure de la prostate est appelée la base alors que la partie inférieure est appelée l'apex. Cette glande est composée d'éléments nommés lobules composés eux-mêmes de fibres musculaires lisses, de terminaisons nerveuses, de vaisseaux sanguins formant un tissu de soutien ainsi que de formations glandulaires permettant la sécrétion du liquide prostatique.

L'anatomie de la prostate a été établie par John McNeal (McNeal 1968; 1972; 1981) qui divise cette glande en quatre régions différentes anatomiquement et fonctionnellement (Figure 2). Il définit une zone périphérique, une zone centrale, une zone de transition et une zone antérieure de stroma fibromusculaire :

- **La zone de transition (ZT)** est constituée de 2 lobes, situés dans la partie antérieure de la prostate qui entourent l'urètre prostatique. Elle représente moins de 5% de la prostate. Cette zone est le siège de l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) (Villers, Steg, et Boccon-Gibod 1991).
- **La zone centrale (ZC)** représente, quant à elle, 25% de la prostate glandulaire. De forme conique, elle vient entourer les canaux éjaculateurs en dessous de la zone de transition en s'étendant de la base au veru-montanum.
- **La zone périphérique (ZP)** constitue 70% de la masse glandulaire. Elle recouvre les faces latérales et postérieures de la prostate. Cette zone est le site préférentiel de développement des cancers de la prostate (Greene, Fitzpatrick, et Scardino 1995).
- **La zone de stroma fibromusculaire antérieur (SFMA)** décrit la zone non glandulaire de la prostate. Elle est constituée principalement de tissu stromal et de fibres musculaires lisses.

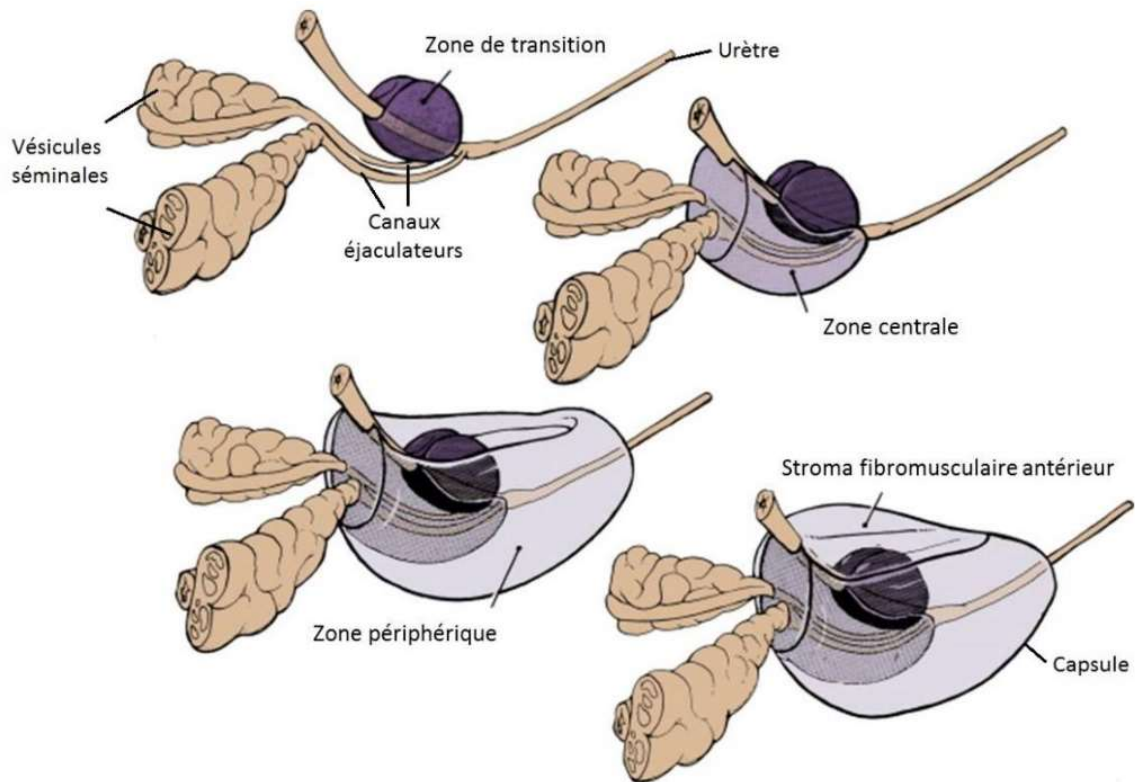


Figure 2. Schéma de l'anatomie zonale de la prostate (Adapté de McNeal, 1988 par Kaminski, 2018).

c) Histologie

La prostate est composée de tissu glandulaire et non glandulaire. Le tissu glandulaire se compose d'acini (entre 30 et 50), sécrétant le liquide prostatique à travers la lumière, et de canaux. Les acini sont composés de cellules basales en périphérie, pouvant être associées rarement à des cellules neuroendocrines, mais aussi de cellules luminales au centre. Ces cellules luminales sont des cellules androgéno-dépendantes caractérisées par la présence de récepteurs aux androgènes (J. T. Isaacs et Coffey 1989) qui vont produire et sécréter différents composants du liquide prostatique, comme la kallistéine-3, aussi appelée antigène spécifique de la prostate (PSA). Le tissu non glandulaire de la prostate se compose notamment de fibres musculaires lisses, de fibres conjonctives et élastiques formant le stroma.

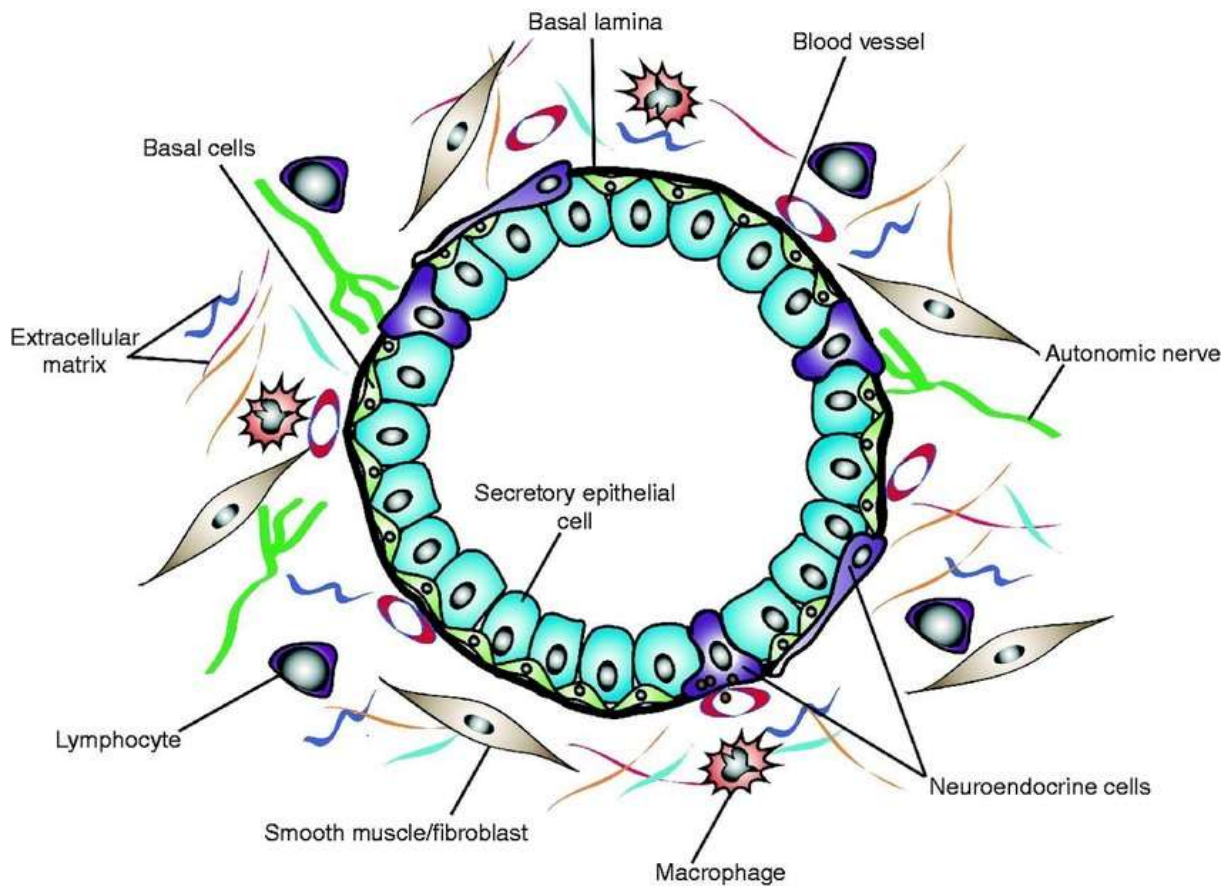


Figure 3. Composants cellulaires de la prostate (Barron et Rowley 2012).

d) Régulation hormonale

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes jouant un rôle clé dans les processus physiologiques de la prostate. Elles interviennent ainsi au niveau de la prolifération, la différenciation et la survie des cellules prostatiques (Dehm et Tindall 2006). Ainsi, la suppression des androgènes chez l'homme entraîne l'atrophie de la prostate (Schalken et van Leenders 2003) qui s'explique par une diminution de la prolifération des cellules de la prostate et une augmentation de la mortalité cellulaire (English, Kyprianou, et Isaacs 1989; C. Lee 1981). Les androgènes jouent donc un rôle de régulateurs dans les processus physiologiques de la prostate et un déséquilibre peut engendrer des pathologies comme le cancer de la prostate. Il existe chez l'homme plusieurs facteurs jouant un rôle dans l'organogénèse prostatique : des facteurs endocrines (sécrétions d'hormones produites dans d'autres parties que la prostate et étant dans la circulation sanguine) mais aussi des facteurs paracrines (sécrétions d'hormones

proches de la prostate) et des facteurs intracrines (produits par les cellules prostatiques) (Gerald R. Cunha, Hayward, et Wang 2002; G. R. Cunha et al. 1987).

L'androgène principal circulant chez l'homme est la testostérone. Le développement de la prostate et son volume sont directement liés à la production de testostérone. Cette hormone est produite au niveau des testicules par les cellules de Leydig (Jarow et Zirkin 2005). La production de celle-ci est initialement régulée au niveau de l'hypothalamus. En effet, l'hypothalamus sécrète une hormone, la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) qui stimule la production d'hormones hypophysaires comme la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteizing Hormone) qui vont, à leur tour, stimuler la sécrétion de testostérone au niveau des testicules et des glandes surrénales (Figure 4). Les androgènes jouent également un rôle important dans la différenciation des canaux de Wolff, de la prostate et des organes génitaux masculins.

Dans la prostate, l'androgène majoritaire est la 5 α -dihydrotestostérone (DHT). La DHT est métabolisée dans les cellules à partir de la testostérone par une enzyme appelée 5 α -réductase (Steers 2001). Le récepteur aux androgènes est un récepteur nucléaire pouvant se lier à la fois à la testostérone et à la DHT mais avec une affinité 10 fois plus forte pour la DHT. La fixation de la DHT au niveau des récepteurs aux androgènes entraîne la translocation dans le noyau de celui-ci, lui permettant d'agir comme facteur de transcription en se liant à un ARE (Androgen Response Element) et en régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la survie cellulaire (J. Kim et Coetzee 2004), la différenciation des cellules prostatiques mais aussi dans la production de PSA (Prostate Specific Antigen) (Zhao et Feldman 2001). Ainsi, dans la prostate adulte, les androgènes maintiennent les cellules épithéliales dans un état différencié et les cellules du stroma en quiescence.

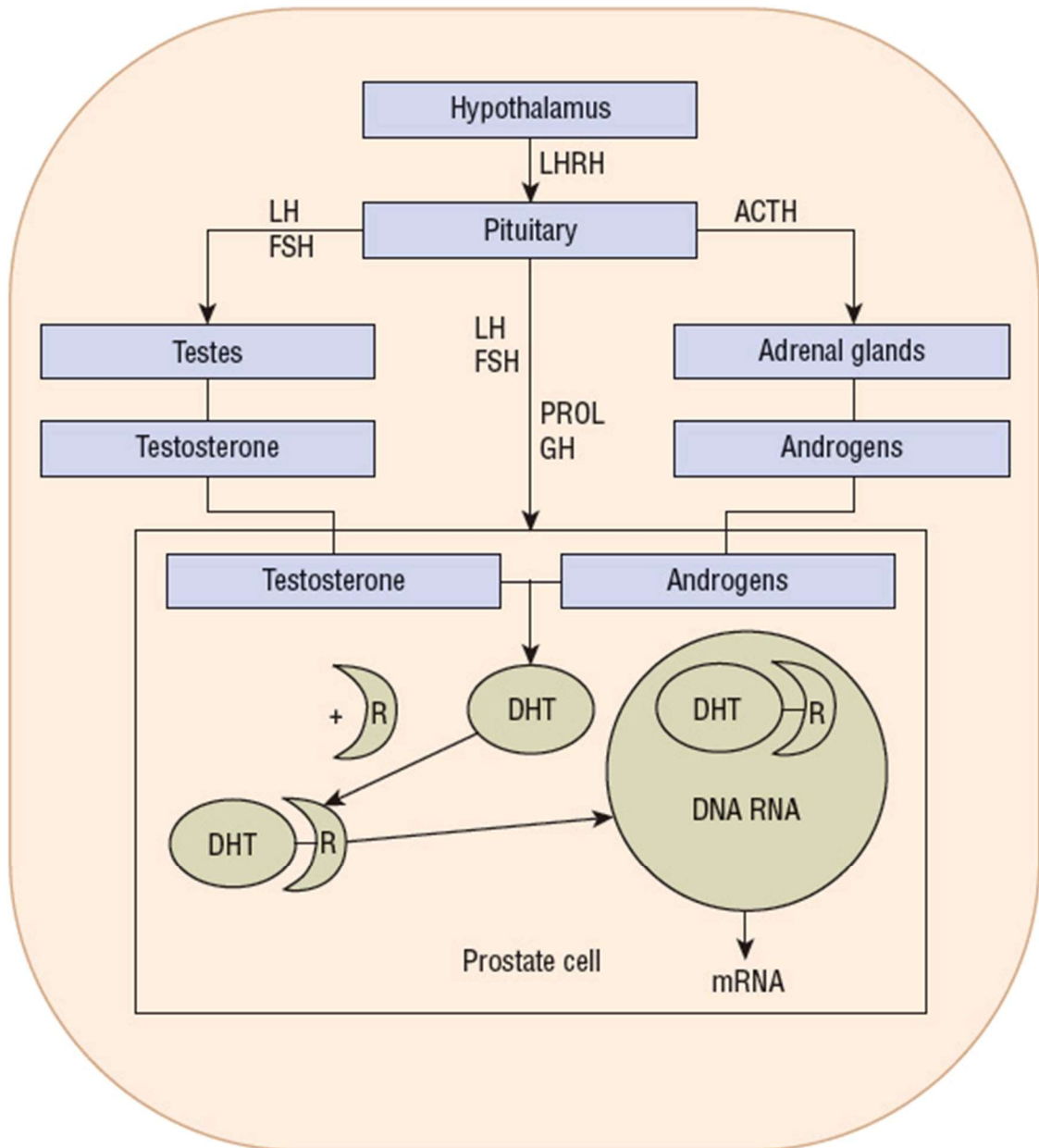


Figure 4. Régulation hormonale de la prostate (<https://basicmedicalkey.com/>).

2) Cancer de la prostate

La prostate est un organe pouvant être soumis à diverses modifications entraînant des pathologies comme :

- L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) qui apparaît souvent en corrélation avec le vieillissement après 50 ans. L'HBP correspond à une augmentation du volume de la prostate non cancéreuse. Cette augmentation de volume de la prostate peut venir faire

pression sur l'urètre causant des problèmes urinaires chez les personnes concernées. L'HBP est la plupart du temps asymptomatique.

- La prostatite qui est une inflammation de la prostate souvent due à une infection bactérienne touchant principalement les hommes jeunes. Elle peut être décrite de 2 façons : la prostatite aiguë qui peut causer des troubles urinaires et la prostatite chronique.
- Le cancer de la prostate (PCa) qui se développe principalement au niveau de la zone périphérique de la prostate.

a) **Généralités sur le cancer**

Le cancer naît de la transformation de cellules normales en cellules tumorales, un processus en plusieurs étapes qui a généralement pour point de départ une lésion précancéreuse, laquelle devient ensuite une tumeur maligne qui croît plus ou moins rapidement selon le type de cancer et l'individu. Ces lésions, qui ont pour point de départ des mutations génétiques, sont la conséquence d'interactions entre des facteurs génétiques propres à chacun et des facteurs extérieurs plus ou moins cancérigènes. Les risques de formation de cancer augmentent considérablement avec l'âge, souvent dus à l'accumulation ou à l'exposition longue de facteurs cancérigènes ainsi qu'à des mécanismes de recombinaison génétique qui perdent en efficacité et peuvent induire des mutations conduisant à un cancer. Il existe de nombreux cancérigènes connus à l'heure actuelle qui peuvent se diviser en plusieurs catégories :

- Physiques : rayons UV, radiations etc...
- Chimiques : produits CMR, tabac etc...
- Biologiques : par des infections bactériologiques et virologiques par exemple

Le cancer constitue l'une des principales causes de mortalité au monde. Un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. Selon l'OMS, en 2020, les cancers avec la plus forte incidence étaient : le cancer du sein (2,26 millions de cas), le cancer du poumon (2,21 millions de cas), le cancer colorectal (1,93 millions de cas) ainsi que le cancer de la prostate (1,41 millions de cas) et les cancers les plus mortels étaient : le cancer du poumon (1,80 millions de cas), le cancer colorectal (935 000 cas) et le cancer du foie (830 000 cas).

La prostate est le siège de développement d'un des 6 cancers les plus fréquents chez l'homme (4ème en termes d'incidence dans le monde). En France, le cancer de la prostate se situe au 1er

rang, en termes d'incidence, des cancers chez l'homme avec 50 400 nouveaux cas diagnostiqués en 2018 avec un âge médian du diagnostic à 68 ans (GLOBOCAN 2018). Mis à part l'âge, d'autres facteurs de risques entrent en compte. En effet, il y a une incidence plus forte chez les populations africaines et sud-américaines alors que le PCa est peu présent chez les populations asiatiques (Figure 5).

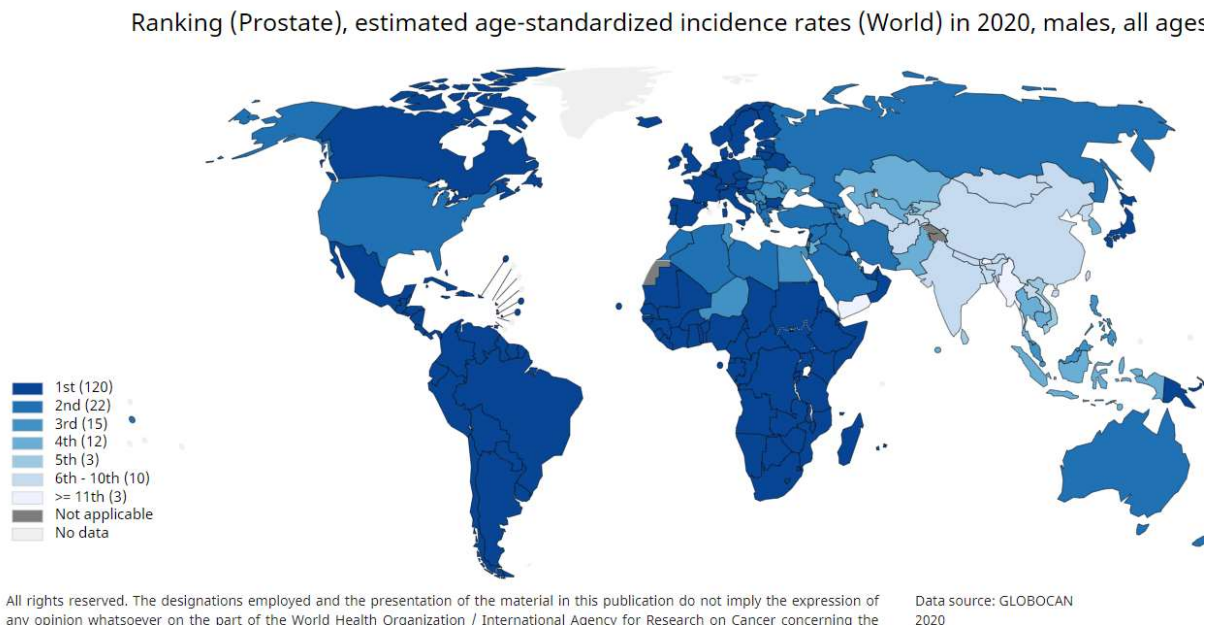


Figure 5. Taux d'incidence du cancer de la prostate dans le monde en 2020 (GLOBOCAN 2020).

b) Symptômes

La plupart des cas de cancers de la prostate sont asymptomatiques, les troubles urinaires étant, le plus souvent, dus à une HBP, très fréquente chez les patients, et pouvant coexister avec le cancer. Quand la tumeur se développe, les symptômes les plus communs sont une hématurie (sang présent dans les urines) ou un blocage des voies urinaires (Litwin et Tan 2017). Les métastases préférentielles du cancer de la prostate étant les métastases osseuses, avec dans la plupart des cas des lésions ostéoblastiques, des douleurs osseuses peuvent également être observées (Yin, Pollock, et Kelly 2005).

c) Diagnostic

Le diagnostic de la maladie est une étape cruciale dans le suivi de la croissance tumorale. Plus le cancer est détecté à un stade précoce, plus les traitements seront efficaces. Le cancer de

la prostate se développant lentement sans apparition de symptômes, il est nécessaire de le détecter au plus vite.

Le dépistage se fait en 3 étapes :

- Le dosage du PSA (Prostate Specific Antigen) : le PSA peut être dosé sur simple prise de sang. Le PSA est sécrété presque exclusivement par les cellules prostatiques passant en majorité dans le sperme mais une faible quantité passe également dans la circulation sanguine. Ainsi, la majorité des hommes présentent des taux normaux de PSA sanguin inférieurs à 4 ng/ml (Lakes et Arsov 2019). Cependant, les cellules cancéreuses prostatiques sécrètent plus de PSA que les cellules saines. Pour cela, dans la plupart des cas, l'apparition d'un cancer de la prostate est accompagnée d'un niveau de PSA sanguin élevé (Moore et al. 1992). En outre, sa mesure est régulièrement effectuée dans les suspicions de cancer de la prostate. Néanmoins, des patients atteints de cancer de la prostate peuvent présenter des taux de PSA normaux (10 à 15% des patients) et de ce fait, ce test ne constitue pas à lui seul, une méthode efficace de dépistage du cancer de la prostate. De plus, des taux de PSA élevés sont également retrouvés chez des hommes atteints de HBP ou d'une prostatite (Terrone et al. 2005). Actuellement, le dosage de PSA n'est pas préconisé dans le dépistage du cancer de la prostate car des études ont montré que cela ne permet pas d'améliorer le dépistage du cancer de la prostate (Delporte, Villers, et Penel 2018).
- Le toucher rectal : le dosage par PSA est souvent suivi par la réalisation d'un toucher rectal (celui-ci ne pouvant être effectué juste avant le dosage de PSA car il peut augmenter les taux de PSA) par le médecin permettant d'évaluer le volume de la prostate, sa texture et sa consistance. Ainsi, une augmentation du volume ou une anomalie lors de l'examen peut signifier l'existence d'un PCa ou d'une HBP (Halpern et al. 2018). Cependant, cet examen manque de sensibilité par le fait qu'il est nécessaire que la tumeur soit relativement bien développée pour qu'elle soit détectée lors de l'examen et donc celui-ci n'exclut pas la présence d'un PCa.
- La biopsie : elle constitue le seul examen fiable permettant de confirmer le diagnostic du patient mais aussi de classifier le stade d'avancement de la tumeur. A l'aide d'une aiguille, une douzaine de fragments prostatiques sont prélevés via le rectum. Ces échantillons sont ensuite analysés par des anatomopathologistes qui vont confirmer la présence ou non de cellules cancéreuses dans les fragments prélevés. La biopsie peut

être utilisée si l'on a une suspicion de cancer (à la suite d'un taux de PSA élevé ou un toucher rectal anormal).

Ces dernières années, ces techniques ont montré de nombreuses limites à la suite de leur manque de sensibilité, leurs faux positifs et leurs faux négatifs et, pour cela, le dépistage du cancer de la prostate n'est actuellement pas recommandé par les grandes instances.

d) Classification

Si la présence d'un cancer est confirmée par la biopsie, il est important de déterminer le stade d'avancement de la tumeur ainsi que son grade. Aujourd'hui, les médecins se basent sur 2 modèles pour classer les tumeurs de la prostate :

-le score de Gleason

-la classification TNM

i. Le score de Gleason

Le grade est déterminé par les anatomopathologistes sur des biopsies grâce au score de Gleason (Gleason 1992). Celui-ci est évalué sur une échelle allant de 1 à 5 qui est caractéristique de la morphologie et de l'architecture des cellules prostatiques. Plus le grade est élevé, plus le cancer est agressif. Le grade 1 correspond ainsi à des cellules différenciées, ressemblant aux cellules saines alors que le grade 5 correspond à des cellules indifférenciées très agressives avec une architecture anarchique (Figure 6).

Souvent, les biopsies de tumeurs de la prostate ne sont pas homogènes. Pour cela la classification a évolué en notant les deux grades majoritaires et en faisant la somme des 2. L'échelle du score de Gleason actuelle se situe donc entre 2 (grade 1 + grade 1) et 10 (grade 5 + grade 5).

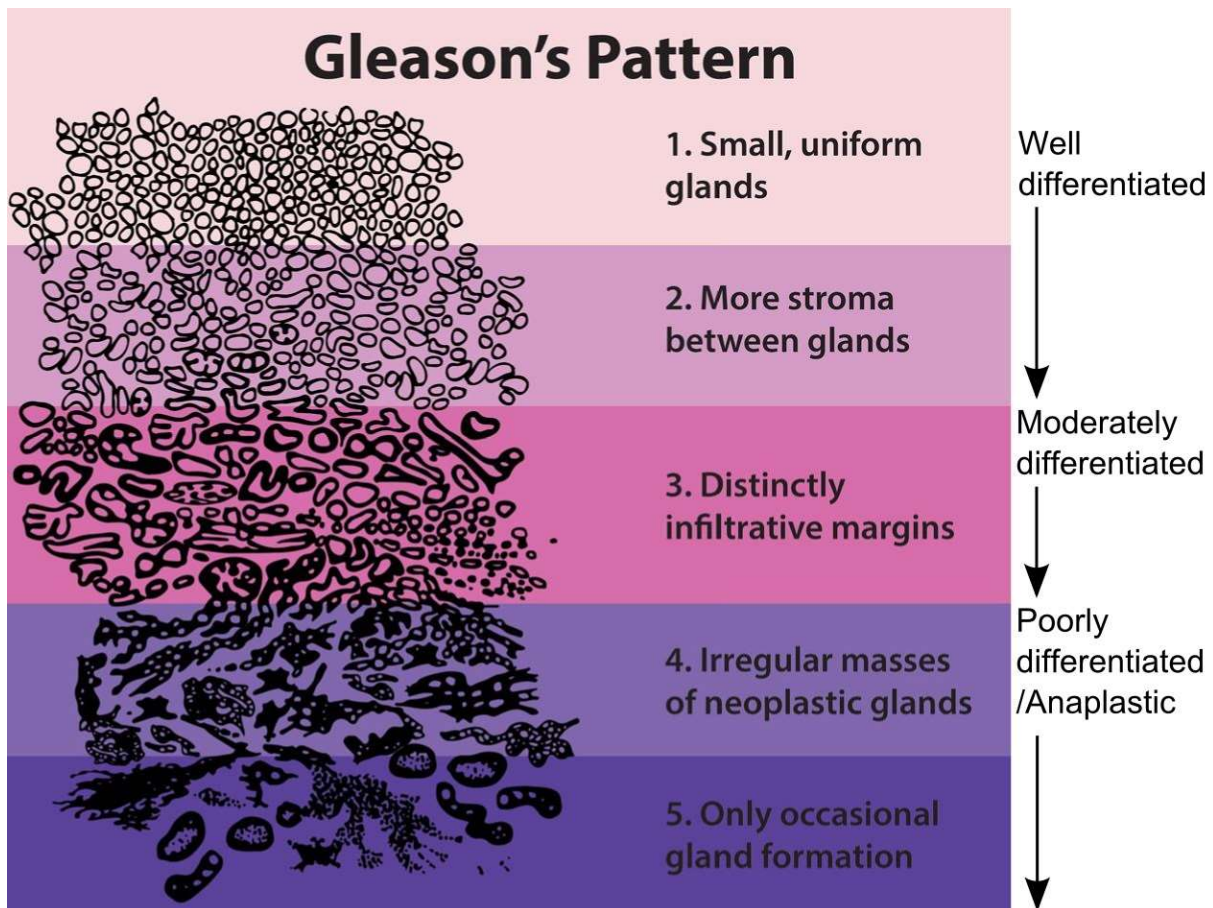


Figure 6. Grades histologiques du cancer de la prostate selon le score de Gleason (issue de Morphology & Grade – National Cancer Institute).

Une des limites de ce score est que l'on sait qu'au sein d'un même grade, il peut y avoir des pronostics différents (J. R. Stark et al. 2009). Pour cela, la classification a été revue en 2014 pour noter en premier le grade représenté majoritairement dans la biopsie (exemple score de Gleason 7 : 4+3 (majoritairement 4) ou 3+4 (majoritairement 3)).

ii. Classification TNM

Ce modèle a été mis au point par Ammon en 1977 (Ammon, Karstens, et Rathert 1977) et permet d'évaluer les caractéristiques d'un cancer selon l'étendue de la tumeur et sa dissémination.

La classification TNM (Tumor, Node and Metastasis) prend en compte :

- L'étendue et la taille de la tumeur primaire (T)
- L'infiltration de ganglions lymphatiques à proximité (N)
- Le degré de propagation des métastases (M)

Le stade T se divise en 4 catégories :

- T1 : tumeur indétectable au toucher rectal et à l'imagerie
- T2 : la tumeur est localisée dans la prostate et devient palpable
- T3 : la tumeur se développe au-delà de la capsule de Gleason et envahit les vésicules séminales et/ou le col vésical
- T4 : la tumeur se développe en dehors de la prostate et des vésicules séminales

Enfin, le score de Gleason, associé au stade clinique et au dosage du taux de PSA permet de définir une classification dite de D'Amico (D'Amico et al. 1998) (Figure 7) permettant de distinguer :

- Des tumeurs à faible risque (Stade clinique T1c ou T2a et taux de PSA < 10 ngr/mL et score de Gleason des biopsies égal à 6) ;
- Des tumeurs de risque intermédiaire (Stade clinique T2b ou T2c, taux de PSA entre 10 et 20 ngr/mL et score de Gleason 7) ;
- Des tumeurs à risque élevé (Stade clinique T3, taux de PSA > 20 ngr/mL et score de Gleason > 7).

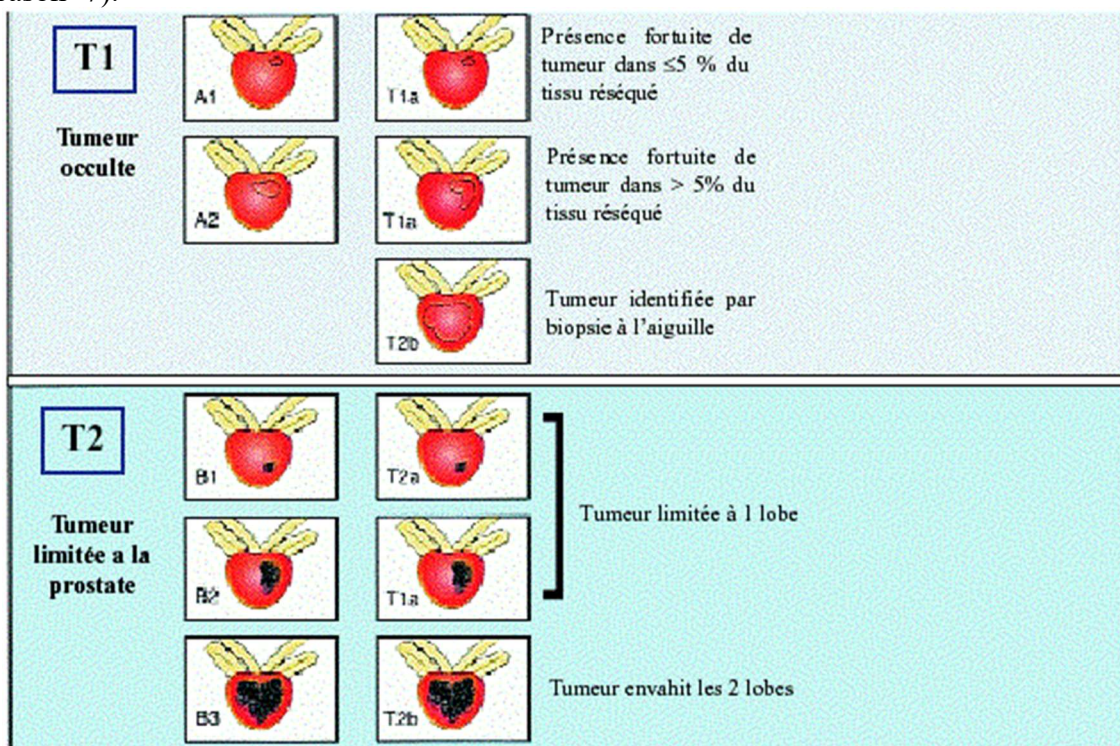


Figure 7. Classification TNM des cancers de la prostate (<https://urologie-davody.fr/>)

iii. Vers un nouveau type de classification

Devant les limitations importantes des classifications existantes, un nouveau type de classification pourrait progressivement voir le jour : la classification moléculaire du cancer de la prostate. Ce nouveau type de classification permettrait de diviser le PCa en plusieurs sous-types, permettant des pronostics plus précis et pouvant aboutir à l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées. Le cancer de la prostate est en effet très hétérogène dans les types d'anomalies génétiques rencontrés. Cependant, certaines sont retrouvées très fréquemment et peuvent être communes à d'autres cancers comme l'altération des voies MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) (Shorning et al. 2020), des voies PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Lin et al. 1999) mais aussi des modifications au niveau du gène suppresseur de tumeur p53 ou PTEN (Cooke et al. 1988; W. B. Isaacs et Carter 1991; Wise, Hermida, et Leslie 2017). Les analyses génomiques et transcriptomiques semblent être l'avenir de la thérapie des PCa afin de permettre une meilleure prise en charge des patients et leur proposer des thérapies correspondantes aux modifications génétiques retrouvées.

e) Traitements

Divers traitements sont actuellement disponibles afin de traiter les patients atteints de PCa (Figure 8). Actuellement, le choix du traitement se fait par rapport au stade et grade du cancer et à l'état de santé du patient. On y retrouve : la surveillance active, la chirurgie par prostatectomie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie, les ultrasons ou encore la cryothérapie.

Chez les personnes âgées, lorsque la tumeur est encore localisée dans la prostate, une surveillance active suffit. En effet, le PCa se développe très lentement (plusieurs années) et l'impact du PCa sur la qualité de vie des personnes âgées est souvent moindre car, la plupart du temps, asymptomatique (Romero-Otero et al. 2016).

La prostatectomie est principalement utilisée chez des patients de moins de 70 ans, lorsque la tumeur est encore localisée dans la prostate et permet d'obtenir des taux de survie allant jusqu'à 85% à 15 ans (Bill-Axelsson et al. 2014; Krongrad, Lai, et Lai 1997). C'est l'un des modes de traitement les plus efficaces mais qui entraîne de nombreux effets secondaires chez les patients (problèmes urinaires, stérilité, impuissance etc... (Haglund et al. 2015).

Lorsque le cancer est encore androgéno-dépendant, des traitements d'hormonothérapie ciblant les androgènes peuvent être utilisés. Le but de ce traitement est de diminuer les taux d'androgènes circulants pour bloquer leurs effets sur les cellules cancéreuses (Denmeade et Isaacs 2002; Huggins 1941). Ce mode de traitement est souvent utilisé dans les cas de cancers avancés ou présentant des métastases. Elle peut être utilisée en association avec d'autres traitements comme la radiothérapie pour améliorer son efficacité (Quero et al. 2012). Peuvent être utilisés comme hormonothérapie :

-La castration physique (aussi appelée orchidectomie) qui est l'ablation des testicules, principale source de production des androgènes. La castration physique est de moins en moins utilisée dû aux nombreux effets secondaires (perte de libido, prise de poids etc...).

-La castration chimique par des agonistes ou antagonistes de la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) permettant d'inhiber la sécrétion de testostérone par les testicules et les glandes surrénales directement au niveau hypothalamique. Les agonistes de la LHRH sont les plus utilisés en thérapie dont les plus connus sont : Leuproréline (Eligard®, Enantone®), Buséréline (Bigonist®, Suprefact®), Goséréline (Zotadex®) et Triptoréline (Decapeptyl®, Salvacyl®). Ces agonistes de la LHRH vont venir activer les récepteurs hypophysaires. Dans un premier temps, on observera une augmentation des taux d'androgènes circulants puis après 3-4 semaines, l'hypophyse arrêtera sa libération de LH, permettant de diminuer les taux de testostérone. Les antagonistes de la LHRH (Dégarélix : Firmagon®) vont eux directement bloquer les récepteurs hypophysaires, entraînant une diminution de la production de LH et, par conséquent, de testostérone.

Cependant, les traitements par hormonothérapie peuvent conduire à des mécanismes de résistance permettant aux tumeurs de devenir androgéno-résistantes pour lesquelles aucun traitement efficace n'est disponible aujourd'hui (Shafi, Yen, et Weigel 2013).

Les traitements par chimiothérapie sont souvent utilisés en 2^{ème} option après les traitements par hormonothérapie. Ils utilisent principalement des taxanes, agents cytotoxiques comme le docétaxel et le cabazitaxel. Ces agents vont empêcher la dépolymérisation des microtubules en stabilisant les interactions avec les sous-unités de la β -tubuline, bloquant les cellules cancéreuses en anaphase et entraînant l'apoptose (Martin, Kamelgarn, et Kyprianou 2014). Souvent, le docétaxel (taxane de 1^{ère} génération) est utilisé en combinaison avec la prednisone en premier lieu (Tannock et al. 2004).

De nouvelles thérapies efficaces plus ciblées comme l'immunothérapie (Bilusic, Madan, et Gulley 2017) voient le jour et permettent de proposer des traitements personnalisés aux patients atteints de PCa.

De plus, des études montrent l'intérêt d'utiliser des thérapies à base d'anticorps monoclonaux (Jakobovits 2008; Ross et al. 2005; Vlachostergios, Puca, et Beltran 2017). En effet, le PCa se prête bien à l'utilisation d'anticorps monoclonaux (MAB) étant donné la localisation des tumeurs et métastases. A ce jour, le développement de MAB contre l'antigène spécifique de la prostate a ouvert la possibilité d'améliorer la précision du diagnostic et le ciblage des métastases (Oto et al. 2020). De plus, la combinaison de MAB avec d'autres thérapies devrait améliorer les réponses aux traitements et ainsi augmenter les taux de survie. Cependant, l'identification de nouvelles cibles est nécessaire afin de traiter des patients par ce mode de thérapie.

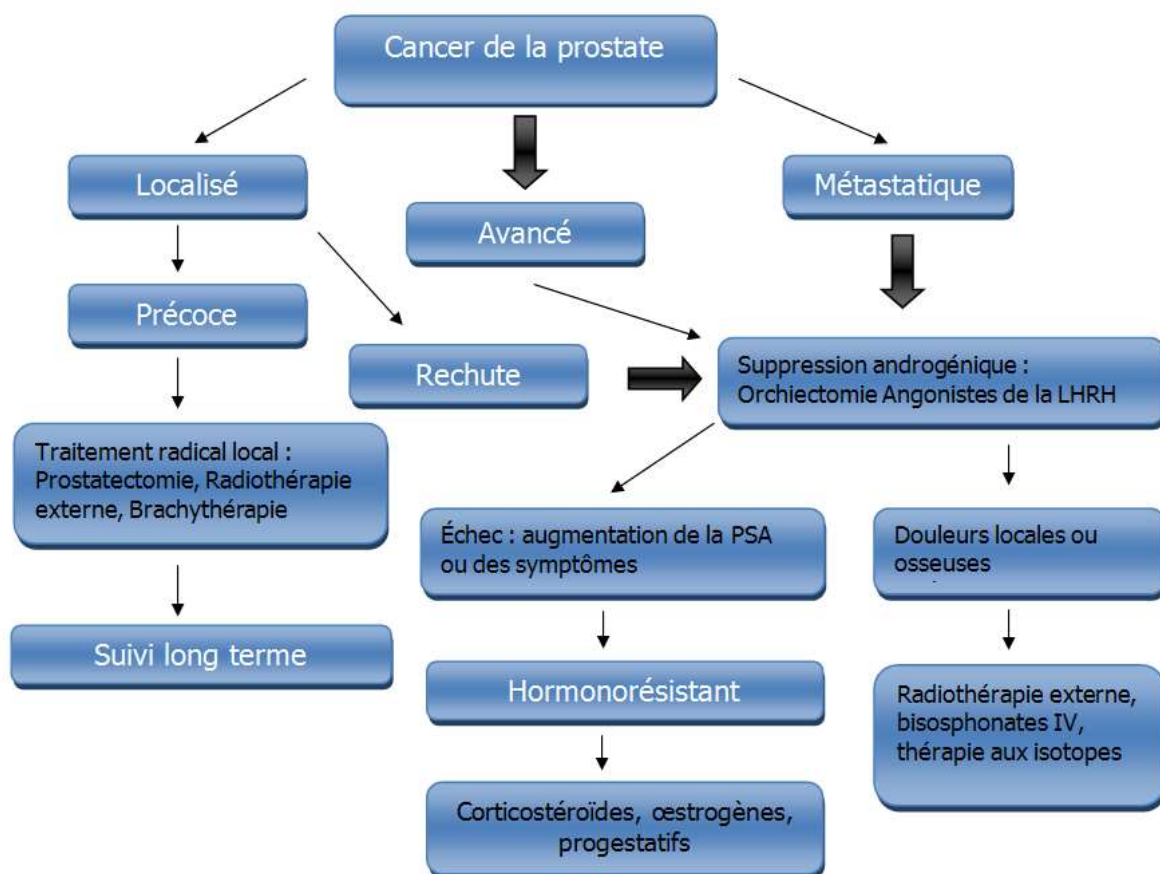


Figure 8. Schéma de la prise en charge thérapeutique du PCa (<https://palli-science.com/>)

II. Les canaux calciques et le cancer

1) Le calcium dans la physiologie cellulaire

Le calcium (Ca^{2+}) est le minéral le plus abondant du corps humain, représentant environ 1kg du poids total chez l'adulte. Il participe à la formation des os et des dents mais joue aussi un rôle de second messenger cellulaire qui participe à de nombreuses fonctions physiologiques cruciales dans l'organisme. Il intervient ainsi dans la fécondation, le développement musculaire, les contractions musculaires, la sécrétion d'hormones etc ... (M. J. Berridge 1998; Michael J. Berridge, Bootman, et Roderick 2003; Mikoshiba 2007). Dans l'organisme, le calcium extracellulaire se trouve sous différentes formes : 50% sous sa forme ionisée, 40 à 45% liés aux protéines et 5 à 10% sous forme de complexes inorganiques. Le calcium joue donc un rôle essentiel dans l'organisme et la régulation de celui-ci est rigoureusement contrôlée.

2) Homéostasie calcique

Dans le milieu extracellulaire, la concentration de Ca^{2+} est de l'ordre d'environ 2 mM, comme dans le réticulum endoplasmique où il est de l'ordre du mM (Bygrave et Benedetti 1996). Le réticulum endoplasmique constitue l'organite où le calcium est le plus stocké dans la cellule. La concentration de calcium cytoplasmique est beaucoup plus faible entre 0,1 et 10 μM (Srikanth, Kim, et Gwack 2014). La différence de concentrations calciques entre les différents organites est cruciale, permettant au Ca^{2+} de jouer son rôle dans toutes les fonctions physiologiques dans lesquelles il est impliqué.

Ainsi, le calcium joue un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la migration etc... (Munaron et al. 2004).

Chaque action physiologique du calcium est déterminée par une signature calcique spécifique qui se définit par l'amplitude d'entrée de Ca^{2+} , la durée, la fréquence ainsi que la localisation des signaux calciques (M. J. Berridge 1998) (Figure 9).

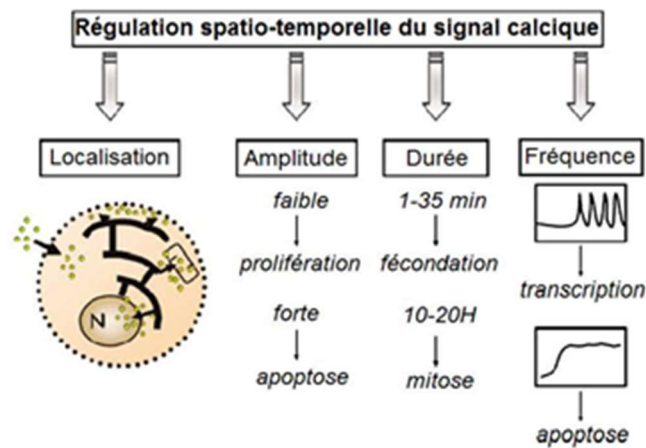


Figure 9. Régulation spatio-temporelle du signal calcique (Prevarskaya, Skryma, et Shuba 2010).

3) Canaux ioniques et calcium

Le calcium, bien qu'indispensable, peut être toxique pour les cellules à forte dose (David E. Clapham 2007; D. E. Clapham 1995). Pour garder des concentrations calciques stables dans les divers organites, la cellule utilise divers canaux et pompes. Ainsi, les pompes ATPasiques vont hydrolyser l'ATP permettant d'envoyer le calcium contre son gradient du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique (RE) via les pompes SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases) mais aussi vers le milieu extracellulaire via les PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase). D'autres échangeurs comme $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ présents à la membrane cellulaire permettent de stabiliser les concentrations calciques intra et extracellulaires. L'ensemble des canaux et pompes régulant les concentrations calciques est appelé calciosome (Roderick et Cook 2008) (Figure 11).

Il existe plusieurs types de canaux ioniques permettant de moduler la signalisation calcique (Figure 10). On y retrouve notamment :

- les canaux ROC (Receptor-Operated Channels) sont activés par des ligands spécifiques permettant leur ouverture et l'entrée de calcium (Cauvin, Saida, et van Breemen 1982).
- les canaux SMOC (Second Messenger-Operated Channels) sont activés par un second messenger formé à la suite de l'activation d'un récepteur membranaire (Meldolesi et Pozzan 1987).

4) La superfamille des canaux TRP

Le terme TRP (Transient Receptor Potential) est décrit pour la première fois en 1970 pour caractériser un mutant de drosophile montrant une réponse altérée de phototransduction (W. S. Stark et Wasserman 1972).

Aujourd'hui, la famille des TRP rassemble plus de 28 canaux cationiques classés en 6 familles distinctes (Figure 12). Chaque sous-unité est constituée de 6 domaines transmembranaires avec le pore situé entre les domaines S5 et S6. Ils peuvent s'associer en homo ou hétérotétramères afin de former une unité complète. Les canaux TRP sont perméables aux cations et notamment au Ca^{2+} . Les canaux TRP peuvent être activés par des messagers, des composés chimiques, un stress osmotique ou encore des stimulations mécaniques (Nilius, Voets, et Peters 2005; Pedersen, Owsianik, et Nilius 2005). Ces canaux sont regroupés en 6 familles :

- TRPA (TRP Ankyrine)
- TRPML (TRP Mucopolipine)
- TRPC (TRP canonique)
- TRPM (TRP mélastatine)
- TRPP (TRP Polycystine)
- TRPV (TRP Vanilloïde)

Les TRP jouent un rôle crucial dans la signalisation calcique en augmentant les concentrations calciques intracellulaires via les canaux présents à la membrane ou en libérant le calcium contenu dans les stocks intracellulaires lorsque ceux-ci sont présents à la membrane des différents organites comme le RE, les lysosomes et les endosomes (Cheng et al. 2010). Des perturbations de l'expression et/ou l'activité des canaux TRP peuvent être responsables du développement de pathologies telles que le cancer (Gkika et al. 2010; Raphaël et al. 2014b).

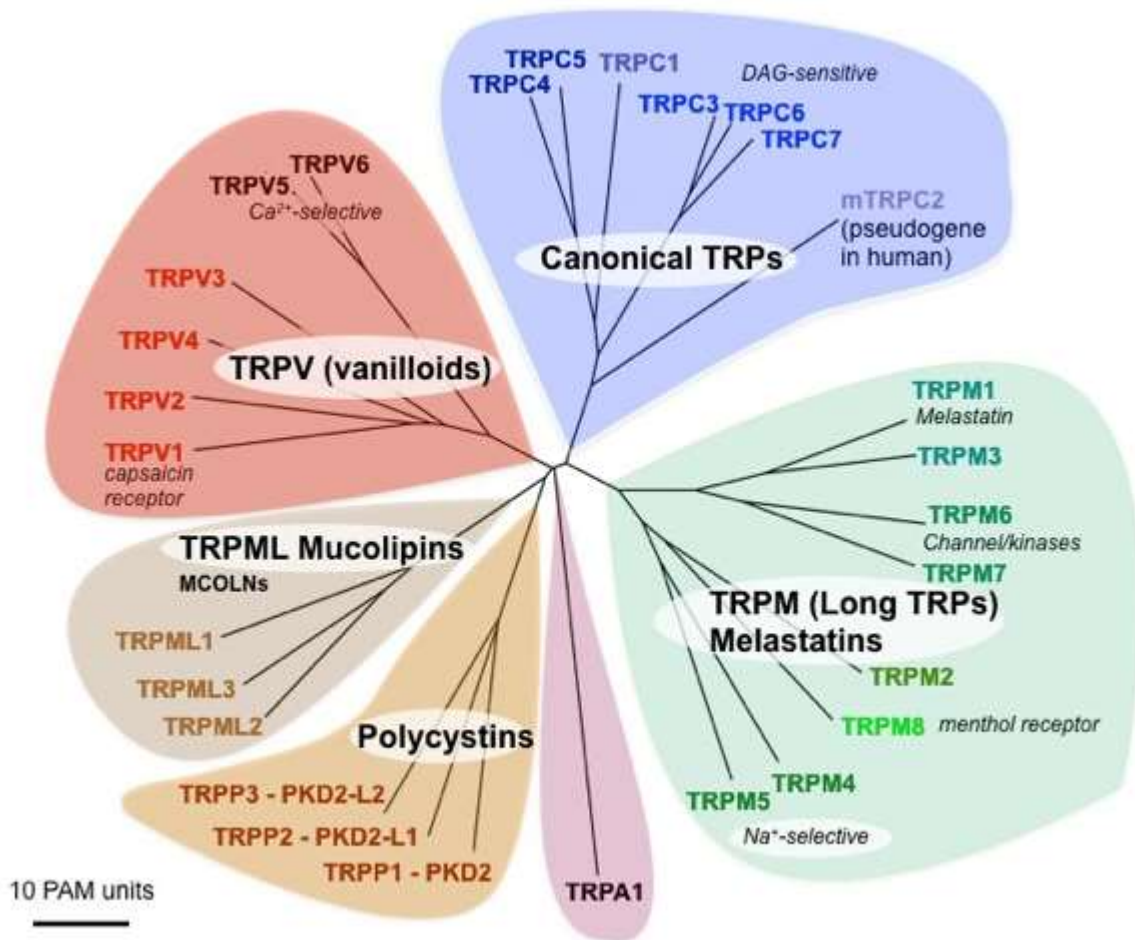


Figure 12. Schéma regroupant l'ensemble des canaux TRP (David E. Clapham 2003).

5) Entrée capacitive de calcium

Les canaux SOC sont responsables de l'entrée capacitive de calcium, appelée SOCE (Store Operated calcium entry) qui constitue la principale entrée de calcium des cellules non excitables (Bird et Putney 2018; Putney 2011).

En effet, la vidange de calcium du RE est ressentie par la protéine STIM1 (Stromal Interacting Molecule 1) présente à la membrane du RE grâce à ses domaines EF-hand au niveau du domaine N-terminal. STIM1 va ainsi venir interagir avec les canaux SOC présents à la membrane et les activer faisant entrer du calcium à l'intérieur de la cellule pour rétablir les stocks réticulaires (S. L. Zhang et al. 2005) (Figure 13). Le canal SOC le plus connu est Orai1 (Zhou et al. 2010) mais il existe d'autres isoformes des protéines Orai : Orai2 et Orai3 (X. Zhang et al. 2020). Orai1 est constitué de 4 domaines transmembranaires avec des extrémités N- et C- terminales

intracellulaires et son pore est situé entre les domaines transmembranaires 2 et 3 (Feske et al. 2006). D'autres canaux SOC comme TRPC1 jouent également un rôle dans l'entrée SOCE.

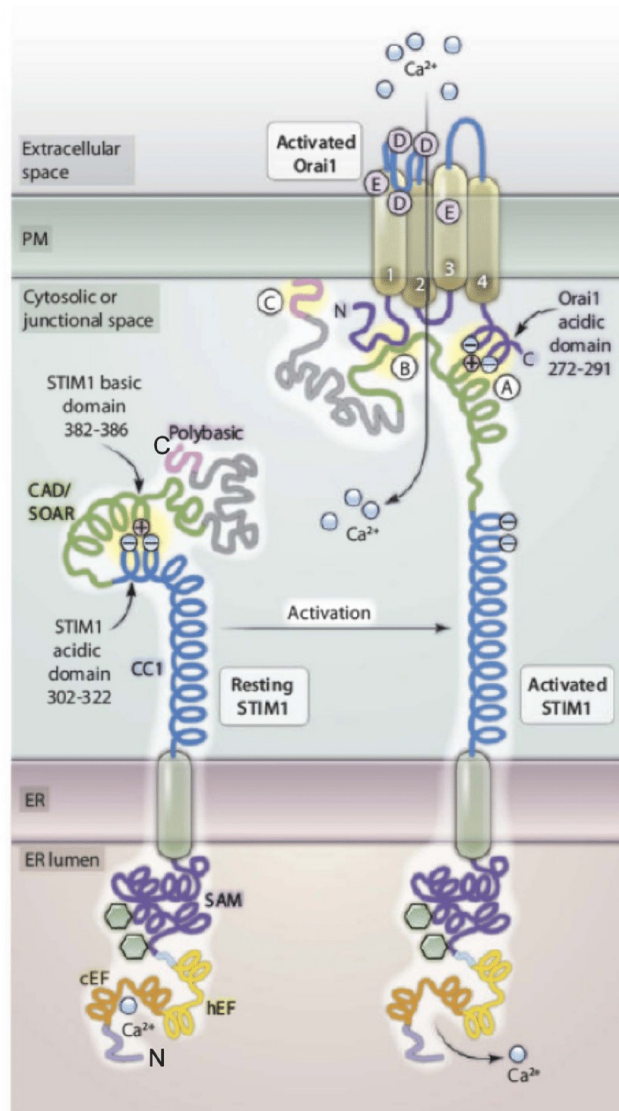


Figure 13. Mécanisme d'interaction entre STIM1 et Orai1 permettant l'entrée SOCE (Holowka et al. 2012).

6) Dérégulations de l'homéostasie calcique dans le cancer

Il a été clairement démontré que des altérations de l'homéostasie calcique régulée par les canaux ioniques étaient responsables de nombreuses pathologies comme le cancer. En effet, des modifications au niveau de l'expression et/ou de l'activité des canaux calciques vont induire

des changements au niveau de la prolifération, de l'apoptose, de la migration, l'angiogenèse ou encore l'autophagie (Kunzelmann 2005).

a) Effets sur la prolifération

Plusieurs canaux, dont l'expression était modifiée, ont été identifiés comme acteur dans la prolifération cellulaire. En effet, dans le PCa, il a été montré que la surexpression du canal TRPV6 à la membrane induisait une augmentation de la prolifération cellulaire (V. Lehen'kyi et al. 2007; Raphaël et al. 2014b). De même, on observe une surexpression du canal Orai3 dans les PCa qui en s'associant avec Orai1 favorise la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes et androgéno-résistantes via la voie NFAT (Dubois et al. 2014). D'autres canaux, comme TRPC6 ou CaV3.2, dont l'expression a été modifiée ont aussi montré leur rôle dans la prolifération cellulaire (Gackière et al. 2013; Ichikawa et Inoue 2014).

b) Effets sur l'apoptose

De même que pour la prolifération, de nombreux canaux sont impliqués dans la mise en place de la résistance à l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Ainsi, les canaux calciques comme TRPC1 dont l'activité est modifiée dans le cancer colorectal permettent aux cellules de mettre en place un mécanisme de résistance à l'apoptose (Sobradillo et al. 2014). Une augmentation de l'expression de IP3R a également montré une diminution de la mortalité cellulaire par apoptose augmentant ainsi la survie cellulaire (Boehning, Patterson, et Snyder 2004).

c) Effets sur d'autres caractéristiques spécifiques du cancer

Comme pour la prolifération et l'apoptose, il a été montré que divers canaux calciques sont impliqués dans les phénomènes de migration cellulaire, d'angiogenèse et d'autophagie. Tous ces processus sont connus comme étant modifiés dans le cancer.

En effet, des études ont montré l'implication de TRPV2 comme acteur majeur dans la migration cellulaire de même que pour TRPM8 (Genova et al. 2017; Gkika et al. 2010; Monet et al. 2009).

III. Rôle de TRPV6 dans le cancer la prostate

Le canal calcique TRPV6, auparavant appelé ECaC2 ou encore CaT1, a été identifié en 1999 comme étant une protéine impliquée dans l'absorption de calcium dans le duodénum de rat (J. B. Peng et al. 2000b; 1999; Weber et al. 2001) et le nom de TRV6 a été confirmé en 2005 (J. B. Peng et al. 2000b). C'est un canal hautement sélectif pour le calcium qui a été cloné pour la première fois en 2000 (J. B. Peng et al. 2000b). TRPV6 ne fait pas parti des canaux SOC (car il n'interagit pas directement avec STIM1) mais joue un rôle crucial dans l'entrée capacitive de calcium induite par les canaux SOC.

Le gène de TRPV6 est situé sur le 7^{ème} chromosome au niveau du locus 34 très proche de son homologue TRPV5 (Müller et al. 2000). Le gène de TRPV6 code pour un ARNm de 2906 bp et la protéine fait aux alentours de 84 kDa sans glycosylation. C'est un canal constitutivement actif perméable à des ions comme le calcium et le sodium. Etant très sélectif pour le calcium, celui-ci fait passer environ 100 ions Ca^{2+} pour 1 ion Na^+ (Gees, Colsoul, et Nilius 2010; Niemeyer et al. 2001b). D'autres ions divalents peuvent passer comme Ba^{2+} , Sr^{2+} et Mn^{2+} .

1) Structure

Le canal TRPV6 forme un homotétramère (4 sous-unités formant un pore au milieu) mais peut aussi former un hétérotétramère avec son homologue TRPV5 (Hoenderop, Nilius, et Bindels 2003). Chaque sous-unité est composée de 6 domaines transmembranaires (DT) et le pore se situe entre les domaines 5 et 6 (Figure 14). Il possède une longue boucle extracellulaire entre les DT 1 et 2 qui présente une N-glycosylation riche en mannose au niveau du site N357. Les domaines N et C-terminaux sont situés à l'intérieur de la cellule.

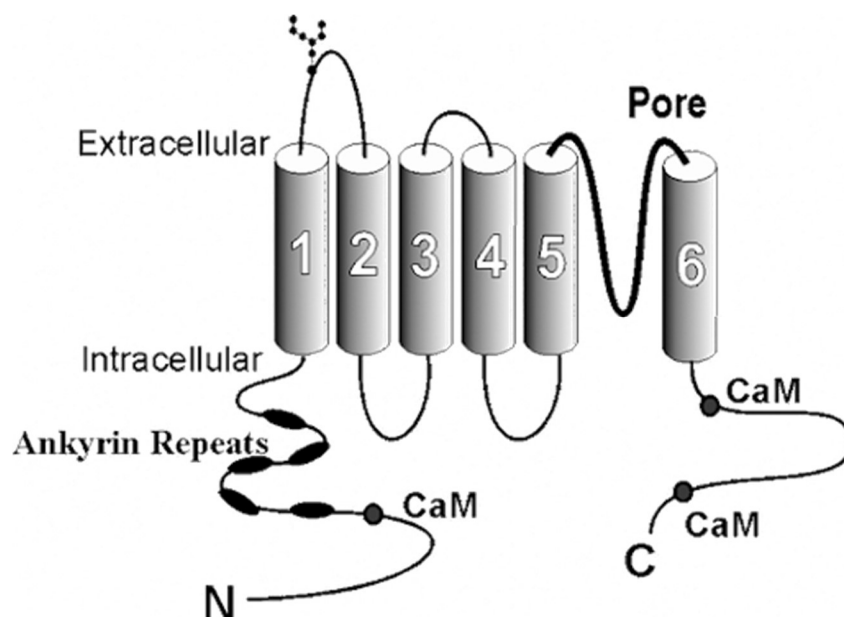


Figure 14. Structure d'une sous-unité du canal TRPV6 (<http://atlasgeneticsoncology.org/>).

Aussi, chaque sous-unité possède un ARD (ankyrin repeat domain) contenant 6 répétitions ankyrine ainsi que des sites de fixation de la calmoduline.

Le pore du canal situé entre les domaines 5 et 6 permet l'entrée d'ions du milieu extracellulaire vers le cytoplasme de la cellule. Au niveau du pore du canal, à faibles concentrations calciques, un seul ion calcium se lie au site de fixation de calcium D541, ce qui permet le passage de Na^+ . A fortes concentrations calciques, 3 ions Ca^{2+} se fixent sur le site D541 permettant l'entrée de calcium (Sakipov, Sobolevsky, et Kurnikova 2018).

2) Régulation du canal TRPV6

Le canal TRPV6 est constitutivement actif. L'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule déclenche des mécanismes de rétroaction négative permettant d'inhiber l'activité de TRPV6 et empêcher l'entrée massive de calcium pouvant entraîner la mort cellulaire (J.-B. Peng et al. 2018).

Ainsi, l'activité de TRPV6 est régulée par le PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) et par des interactions avec la calmoduline, sensible aux concentrations calciques grâce à ses domaines EF-hand. La réduction des taux de PIP2 ou la fixation de calcium au niveau des calmodulines permettent d'inhiber l'activité de TRPV6 (Bödding et Flockerzi 2004; Cao et al. 2013; Lambers et al. 2004).

3) Fonctions physiologiques de TRPV6

Physiologiquement, le canal TRPV6 est exprimé et joue un rôle crucial dans plusieurs organes :

- Les intestins : la plupart du calcium présent dans l'organisme provient de l'absorption de celui-ci via les intestins. Celui-ci est absorbé soit par transport paracellulaire soit par transport transcellulaire dépendant directement des concentrations de calcium dans le bol alimentaire. TRPV6 permet le passage du calcium du côté apical de la cellule intestinale, puis celui-ci se fixe à la calbindine D9K pour être transporté jusqu'à la PMCA1b (Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase b) du côté basal (Corbeels et al. 2018) (Figure 15).
- Les reins : de la même façon que dans les intestins, TRPV6 permet la réabsorption du calcium dans les reins.
- D'autres organes comme l'épiderme (V. Lehen'kyi et al. 2007), le placenta (Moreau et al. 2002), l'utérus (G.-S. Lee et Jeung 2007), les testicules, le pancréas, les seins, les glandes salivaires, le foie etc...

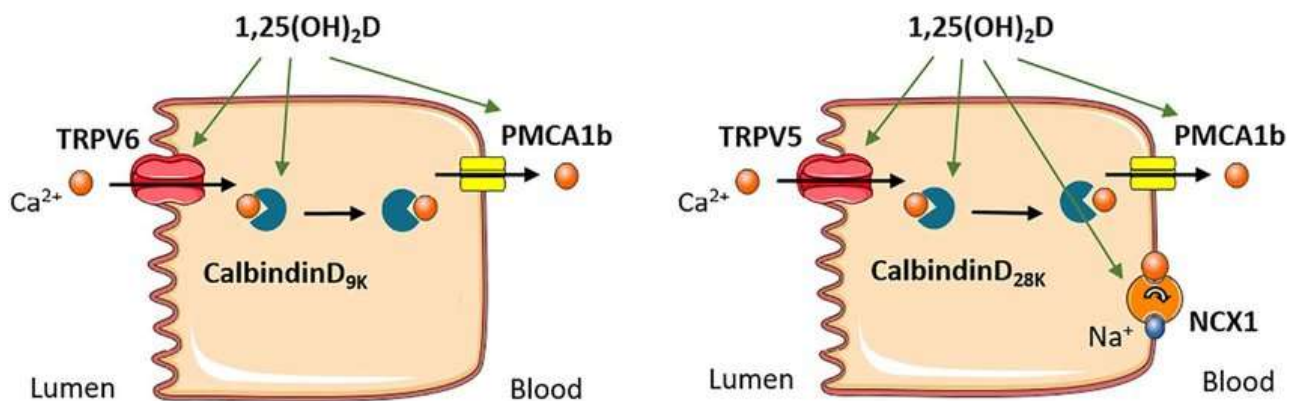


Figure 15. Mécanismes d'absorption de calcium dans les intestins (gauche) et de réabsorption dans les reins (droite) (Corbeels et al. 2018).

4) Implication de TRPV6 dans la croissance tumorale

a) Modifications d'expression de TRPV6 dans le cancer

L'expression de TRPV6 est modifiée dans de nombreuses pathologies comme les pancréatites chroniques (Masamune et al. 2020), le psoriasis (Cubillos et Norgauer 2016), l'hyperparathyroïdie néonatale (van Abel et al. 2006) mais aussi dans de nombreux cancers (Figure 16).

TRPV6 est surexprimé dans plusieurs types de cancers tels que le cancer du côlon, de la parathyroïde, du pancréas, de la thyroïde, du sein et des ovaires alors que son expression diminue dans d'autres tels que celui de l'œsophage, du poumon à petites cellules et du rein.

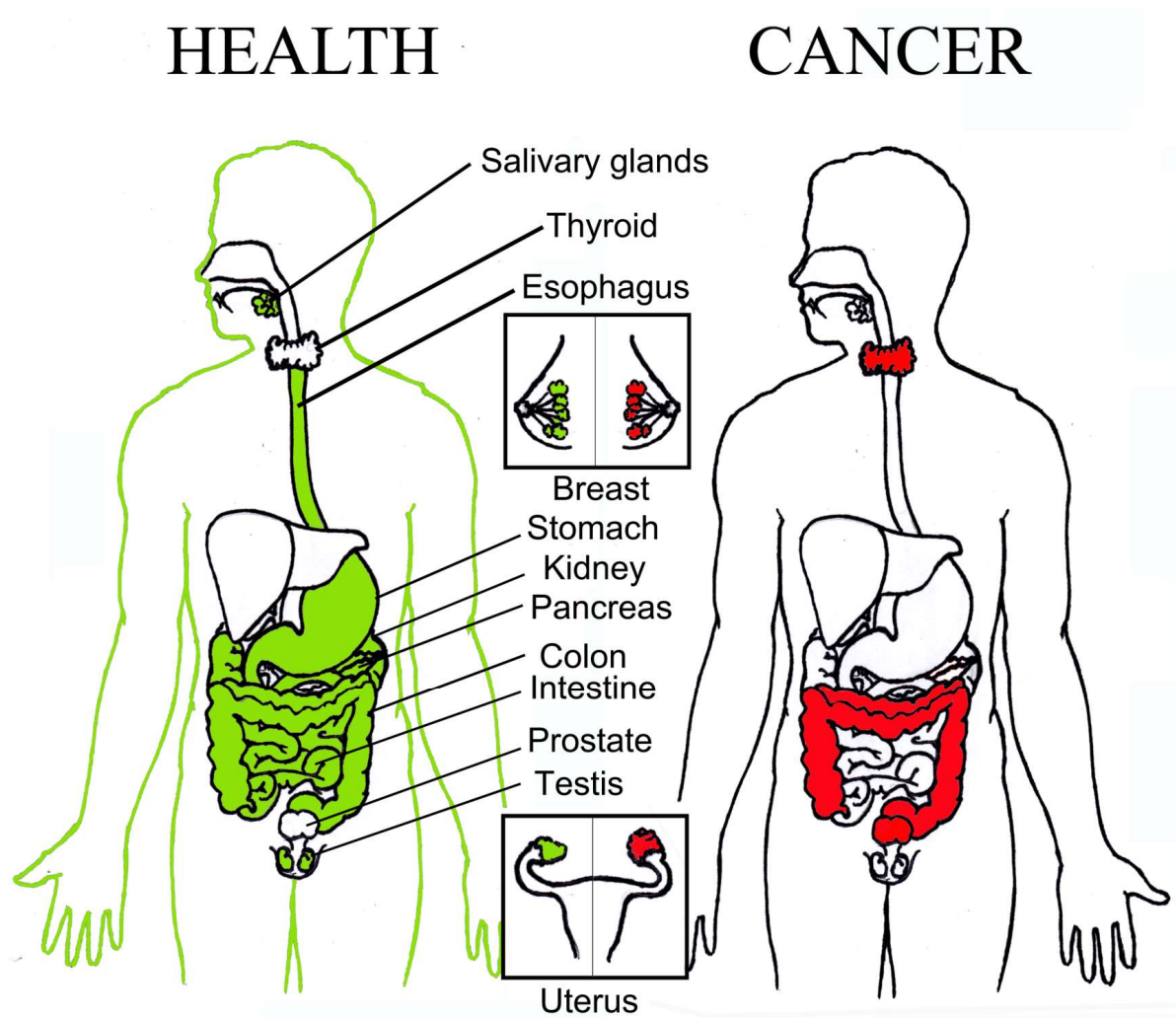


Figure 16. Schéma de l'expression physiologique de TRPV6 (gauche) et des modifications de son expression dans le cancer (droite) (V'yacheslav Lehen'kyi, Raphaël, et Prevarskaya 2012).

b) Rôle de TRPV6 dans le cancer de la prostate

De façon intéressante, TRPV6 est totalement absent dans la prostate saine ainsi que dans les PIN (Wissenbach et al. 2004b) et peut être présent en faible quantité dans des HBP (Raphaël et al. 2014b). Il devient de plus en plus exprimé lors du développement du cancer de la prostate jusqu'à être exprimé chez tous les patients atteints de PCa dans les stades métastatiques (Figure 17). Ces données suggèrent que TRPV6 peut être utilisé comme marqueur diagnostique du cancer de la prostate permettant de suivre sa progression au fil du temps.

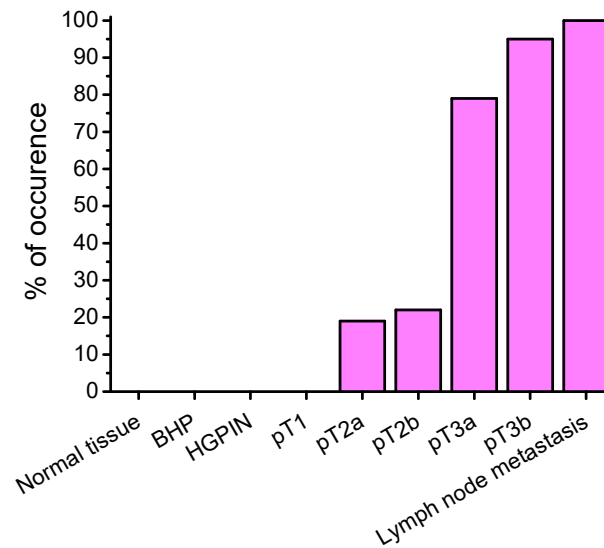


Figure 17. Expression des transcrits de TRPV6 dans le PCa (Wissenbach et al. 2004b).

De plus, il a été montré que le canal TRPV6 jouait un rôle crucial dans la prolifération, la résistance à l'apoptose et la progression métastatique (Raphaël et al. 2014b).

En effet, le calcium entrant via TRPV6 active la voie du facteur de transcription NFAT qui promeut la prolifération cellulaire des cellules androgéno-dépendantes.

Dans le PCa, il a été démontré comme vu précédemment que l'activation du canal SOC Orai1 par la protéine STIM1 présente au niveau du RE induit l'entrée capacitive de calcium (SOCE). L'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule permet le recrutement du complexe annexine I/S100A11 qui permet la translocation de TRPV6 (présents à la membrane de vésicules intracellulaires) à la membrane plasmique. Ce mécanisme entraîne la surexpression de TRPV6 membranaire qui permet l'entrée massive de calcium. Indirectement, TRPV6 joue donc un rôle dans l'entrée SOCE. Ces données suggèrent que Orai1 et STIM1 sont directement impliqués dans la régulation des niveaux de TRPV6 membranaire dans les cellules cancéreuses prostatiques.

L'augmentation de l'expression membranaire de TRPV6 dans les cellules de PCa induit l'entrée de calcium massive à l'intérieur de la cellule qui, avec sa signature calcique spécifique, favorise la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques. De plus, il participe à la croissance tumorale *in vivo* (Raphaël et al. 2014b) (Figure 18).

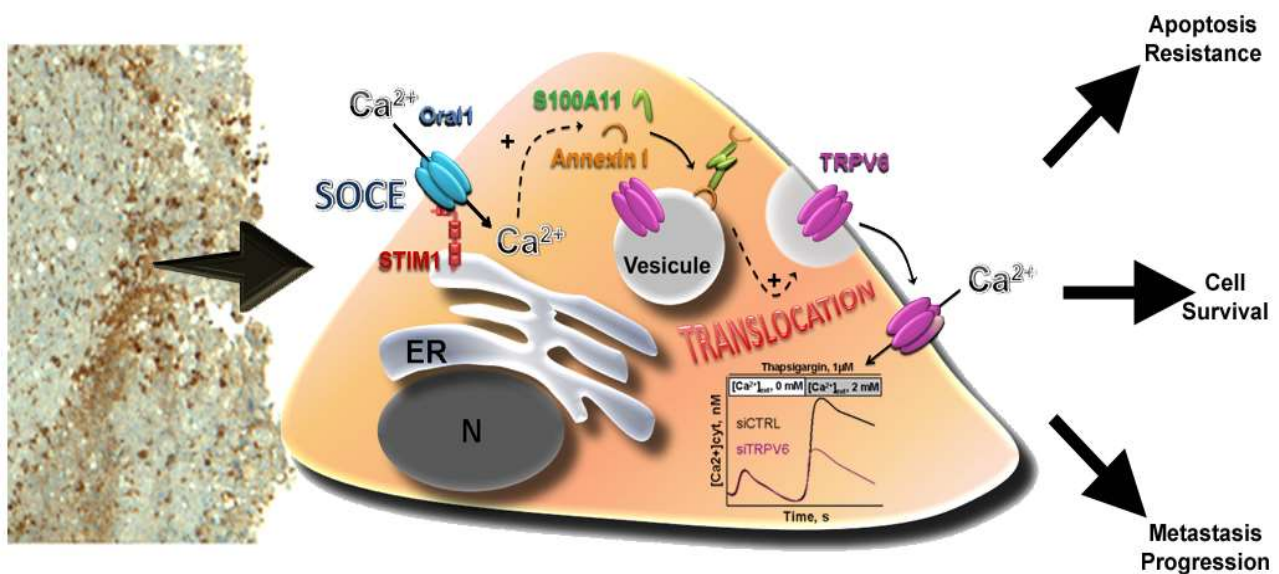


Figure 18. Schéma du mécanisme d'expression de TRPV6 à la membrane plasmique et effets cellulaires (Raphaël et al. 2014b).

5) Régulation hormonale de TRPV6

La régulation de TRPV6 a, de nos jours, largement été étudiée. De nombreux facteurs de régulation ont été caractérisés comme la vitamine D, la prolactine, le vieillissement, les hormones sexuelles et les glucocorticoïdes.

a) Régulation par la vitamine D3

La vitamine D3 est une hormone retrouvée dans l'alimentation pouvant être synthétisée par l'organisme à partir du 7-déshydrocholestérol (dérivé du cholestérol) sous l'action des UVB du soleil au niveau de la peau. Les UVB du soleil permettent de transformer le 7-déshydrocholestérol en cholécalférol. Celui-ci est métabolisé par le foie en 25-hydroxy-vitamine D qui est à son tour transformé par le rein en 1-25-dihydroxy-vitamine D qui constitue la forme active.

Son rôle dans les pathologies comme le cancer a largement été démontré. Il a été montré que le récepteur à la vitamine D (VDR) est exprimé dans les cellules prostatiques saines et cancéreuses et son activation induit l'inhibition de la croissance et l'arrêt du cycle cellulaire (Lou et al. 2004).

Dans des lignées de cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes, la vitamine D3 augmente l'expression de TRPV6 dans le PCa et donc augmente la prolifération cellulaire (pour des faibles concentrations en hormones stéroïdiennes). Cependant, la présence de récepteurs aux androgènes (AR) conditionne directement l'effet de la vitamine D3 sur l'expression de TRPV6 (V'yacheslav Lehen'kyi et al. 2011).

b) Régulation par d'autres facteurs

TRPV6 peut également être régulé par d'autres facteurs comme les hormones sexuelles ou les glucocorticoïdes. En effet, des traitements à la vitamine D montre que TRPV6 est 2 fois plus exprimé chez les souris femelles par rapport aux souris mâles, suggérant que les hormones sexuelles femelles jouent un rôle dans la régulation de l'expression de TRPV6. Des traitements par glucocorticoïdes ont montré que ceux-ci pouvaient réguler l'expression de TRPV6 dans l'intestin et le rein (M.-H. Kim et al. 2009).

IV. TRPV6 comme cible thérapeutique dans le PCa

Le canal TRPV6 est totalement absent dans la prostate saine mais devient largement surexprimé au fur et à mesure du développement du PCa et son rôle est crucial pour le développement des cellules cancéreuses prostatiques. Ensemble, ces données nous suggèrent que TRPV6 peut être une cible thérapeutique potentielle.

1) Pharmacologie

Plusieurs inhibiteurs de TRPV6 ont été décrits :

- 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate) : inhibiteur des récepteurs IP3 (Diver, Sage, et Rosado 2001) et de plusieurs canaux TRP dont TRPV6 (Kovacs et al. 2012).
- TH-1177 : inhibiteur de TRPV6 et TRPV5 inhibant la croissance des cellules prostatiques cancéreuses (Landowski et al. 2011).
- Econazole : inhibiteur du CYP3A4/2C9 mais aussi de TRPV6 (Neuberger, Nadezhdin, et Sobolevsky 2021).
- Miconazole : dérivé imidazolé anti-fongique inhibant TRPV6 (Landowski et al. 2011).
- Capsaïcine : composé chimique (composant actif du piment) notamment connu pour activer TRPV1 et TRPV6 (Chow et al. 2007).

- Ruthenium red : inhibiteur d'un grand nombre de canaux ioniques dont TRPV6 (Neuberger, Nadezhdin, et Sobolevsky 2021).
- Soricidin C-13 (SOR-C13) : peptide de 54 acides aminés qui inhibe à la fois TRPV6 et TRPV5. Ce peptide a été utilisé dans des études cliniques de phase I pour diminuer la croissance tumorale (Fu et al. 2017a).

Sur l'ensemble de ces inhibiteurs disponibles, aucun d'eux ne cible spécifiquement TRPV6. Même si l'ensemble de ces inhibiteurs montre des effets très prometteurs en diminuant la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro*, le fait qu'ils touchent également d'autres cibles résulte d'une impossibilité de leur utilisation *in vivo*. Seul SOR-C13, inhibiteur de TRPV6 et TRPV5 a montré des résultats encourageants en diminuant la croissance tumorale *in vivo*. Des études cliniques de phase I ont été réalisées en 2017 et plusieurs patients ont montré des diminutions de la croissance tumorale. Cependant, plusieurs effets secondaires ont été enregistrés. Dans des conditions physiologiques, TRPV5 peut potentiellement remplacer TRPV6 lorsque celui-ci est inhibé permettant d'éviter les défauts d'absorption de calcium au niveau des intestins ou des reins pouvant engendrer des hypocalcémies. SOR-C13 inhibant les 2 à la fois, il semblerait que le défaut d'absorption au niveau des intestins et des reins soit trop important, entraînant une diminution de la dose maximale tolérée par les patients et diminuant par la même occasion les effets sur la croissance tumorale.

En conclusion, les données obtenues semblent montrer que TRPV6 est une cible thérapeutique prometteuse mais il est nécessaire de développer des inhibiteurs plus spécifiques.

2) Utilisation des anticorps thérapeutiques

Les anticorps sont des protéines faisant partie du système immunitaire. Ils permettent de cibler et neutraliser spécifiquement des agents pathogènes. Ils font partie de la famille des immunoglobulines et sont constitués de 2 chaînes lourdes, 2 chaînes légères (composées d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL)). Les anticorps se séparent en plusieurs catégories selon leur isotype : IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE. L'anticorps le plus retrouvé est celui d'isotype IgG. A l'heure actuelle, des traitements anticancéreux à base d'anticorps ont montré leur efficacité de ciblage des cellules cancéreuses et sont présents sur le marché (Weiner 2015).

Depuis la première apparition d'anticorps monoclonaux (MAB) en 1986 (Orthoclone OKT3), cette classe d'agents pharmaceutiques n'a eu de cesse de se développer jusqu'à atteindre plus de 70 MAB approuvés par l'EMA (European Medicines Agency) et la FDA (Food and Drug Administration) utilisés actuellement dans le traitement de nombreuses pathologies (Ecker, Jones, et Levine 2015) (Figure 19).

Ces anticorps fonctionnent via des mécanismes divers comme le ciblage direct des cellules tumorales, la modification de la réponse immunitaire, la livraison de molécules cytotoxiques, etc... (Weiner 2015) et sont considérés comme l'avenir de la thérapie ciblée (Murali et Kieber-Emmons 2014). Si les mises sur le marché de nouveaux MAB continuent comme actuellement (de l'ordre de 5 par an), les ventes mondiales globales de MAB atteindraient plus de 130 milliards de dollars dans les années à venir.

International nonproprietary name (INN)	Target	Type	Year of first FDA approval	Therapeutic indication(s)
Avelumab	PD-L1	Human IgG1/κ	2017	Metastatic Merkel cell carcinoma
Dupilumab	IL-4Ra	Human IgG4	2017	Asthma; dermatitis
Durvalumab	PD-L1	Human IgG1/κ	2017	Metastatic urothelial carcinoma
Ocrelizumab	CD20	Humanized IgG1κ	2017	Multiple sclerosis
Brodalumab	IL-17RA	Human IgG2/κ	2017	Psoriasis
Bezlotoxumab	<i>C. difficile</i> toxin B	Human monoclonal antitoxin antibody	2016	Enterocolitis; pseudomembranous
Adalimumab	TNFα	Human IgG1	2016	Arthritis; juvenile rheumatoid arthritis; psoriatic arthritis; rheumatoid colitis; ulcerative Crohn's disease; psoriasis; spondylitis; ankylosing
Reslizumab	IL-5	Human IgG4/κ	2016	Asthma
Olaratumab	PDGFR-α	Human IgG1	2016	Sarcoma
Obiltoxaximab	PA component of <i>B. anthracis</i> toxin	Chimeric (mouse/human) IgG1/κ	2016	Anthrax infection
Infliximab	TNFα	Chimeric human-murine IgG1	2016	Spondylitis; ankylosing; arthritis; rheumatoid colitis; ulcerative arthritis; psoriatic Crohn's disease; psoriasis
Atezolizumab	PD-L1	Human IgG1	2016	Metastatic non-small cell lung cancer
Daratumumab	CD38	Human IgG1/κ	2015	Multiple myeloma
Eliotuzumab	SLAMF7	Human IgG1	2015	Multiple myeloma
Nectinumab	EGFR	Human IgG1	2015	Carcinoma, non-small-cell lung
Secukinumab	Interleukin-17A	Human IgG1/κ	2015	Arthritis; psoriatic psoriasis; spondylitis; ankylosing
Mepolizumab	IL-5	Human IgG1/κ	2015	Asthma
Nivolumab	PD-1	Human IgG4	2015	Carcinoma; non-small-cell lung carcinoma; renal cell Hodgkin disease melanoma
Alirocumab	PCSK9	Human IgG1	2015	Dyslipidemias
Idarucizumab	Dabigatran etexilate	Human Fab	2015	Hemorrhage
Evolocumab	LDL-C/PCSK9	Human IgG2	2015	Dyslipidemias; hypercholesterolemia
Dinutuximab (1)	GD2	Human IgG1/κ	2015	Neuroblastoma
Bevacizumab	CD19	BiTEs	2014	Precursor cell lymphoblastic leukemia-lymphoma
Pembrolizumab	PD-1	Human IgG4	2014	Melanoma
Ramucicromab	VEGF	Human IgG1	2014	Stomach neoplasms
Vedolizumab	Integrin-α4β7	Humanized IgG1	2014	Colitis; ulcerative Crohn's disease
Siltuximab	cCLB8	Chimeric IgG1κ	2014	Giant lymph node hyperplasia
Alemtuzumab	CD52	Humanized IgG1	2014	Multiple sclerosis
Trastuzumab emtansine	HER2	Humanized IgG1 as ADC	2013	Breast cancer
Obinutuzumab	CD20	Humanized IgG1	2013	CLL
Raxibacumab	<i>Bacillus anthracis</i> protective antigen	Human IgG1	2012	Prevention and treatment of inhalation anthrax
Pertuzumab	HER2	Humanized IgG1	2012	Breast cancer
Infliximab	TNF-α	Chimeric IgG1 Ab	Not approved (approved in 1997 by EU EMA)	Spondylitis; ankylosing arthritis; rheumatoid colitis; ulcerative Crohn's disease; arthritis; psoriatic psoriasis
Brentuximab	CD30 (conjugate of Mab and MMAE)	Chimeric IgG1 as ADC (antibody drug conjugate)	2011	Hodgkin lymphoma (HL), systemic anaplastic large cell lymphoma (ALCL)
Belimumab	BLyS	Human IgG1	2011	Systemic lupus erythematosus (SLE)
Ipilimumab	CTLA-4	Human IgG1	2011	Melanoma
Denosumab	RANKL	Human IgG2	2011	Prevention of SREs in patients with bone metastases from solid tumors
Tocilizumab	IL-6 receptor	Humanized IgG1	2010	Rheumatoid arthritis
Denosumab	RANKL	Human IgG2	2010	Osteoporosis
Ofatumumab	CD20	Human IgG1	2009	Chronic lymphocytic leukemia
Besilesomab	NCA-95	Murine IgG1	Not approved (approved in 1997 by EU EMA)	<i>In vivo</i> diagnosis of inflammation/infection sites via scintigraphic imaging → nontherapeutic
Canakinumab	IL-1β	Human IgG1	2009	Cryopyrin-associated periodic syndromes including familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome; tumor necrosis factor receptor associated periodic syndrome (TRAPS); hyperimmunoglobulin D Syndrome (HIDS)/mevalonate kinase deficiency (MKD) and familial Mediterranean fever (FMF)
Golimumab	TNFα	Human IgG1	2009	Rheumatoid arthritis; psoriatic arthritis; ankylosing spondylitis
Ustekinumab	IL-12/IL-23	Human IgG1	2009	Plaque psoriasis
Certolizumab pegol	TNFα	Humanized IgG Fab fragment	2008	Crohn's disease; rheumatoid arthritis
Catumaxomab	EpCAM and CD3	Trifunctional MAb IgG2a/IgG2b	Not approved	Malignant ascites in patients with EpCAM-positive carcinomas
Eculizumab	Complement C5	Humanized IgG2/4	2007	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Ranibizumab	VEGF-A	Humanized IgG1 Fab fragment	2006	Neovascular (wet) age-related macular degeneration; macular edema following retinal vein occlusion
Panitumumab	EGFR	Human IgG2	2006	Metastatic colorectal carcinoma
Catumaxomab	EpCAM	Humanized MAb	2005	Head and neck cancer
Natalizumab	VLA-4	Humanized IgG4	2004	Multiple sclerosis (relapsing); Crohn's disease
Cetuximab	EGFR	Chimeric IgG1	2004	Head and neck cancer; colorectal cancer
Fanolesomab	CD15	Murine MAb	2004	Imaging of equivocal appendicitis → nontherapeutic
Bevacizumab	VEGF	Humanized IgG1	2004	Metastatic colorectal cancer; non-small cell lung cancer; metastatic breast cancer; glioblastoma multiforme; metastatic renal cell carcinoma

Omaliuzumab	IgE	Humanized IgG1	2003	Asthma
Tositumomab and iodine 131 tositumomab	CD20	Murine IgG2a	2003	Non-Hodgkin's lymphoma
Efalizumab (2)	CD11a	Humanized IgG1	2003	Psoriasis
Ibritumomab tixetan	CD20	Murine IgG1	2002	Non-Hodgkin's lymphoma
Adalimumab	TNF α	Human IgG1	2002	Rheumatoid arthritis; juvenile idiopathic arthritis; psoriatic arthritis; ankylosing spondylitis; Crohn's disease, plaque psoriasis
Alemtuzumab	CD52	Humanized IgG1	2001	B-cell chronic lymphocytic leukemia
Gemtuzumab ozogamicin (3)	CD33	Humanized IgG4/toxin conjugate	2000	Acute myeloid leukemia (AML)
Trastuzumab	HER-2	Humanized IgG1	1998	Breast cancer; metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma
Infliximab	TNF α	Chimeric IgG1	1998	Crohn's disease; ulcerative colitis; rheumatoid arthritis; ankylosing spondylitis; psoriatic arthritis; plaque psoriasis
Basliximab	CD25 (a chain of IL2 receptor)	Chimeric IgG1	1998	Reversal of transplantation rejection
Palivizumab	F-protein of RS virus	Humanized IgG1	1998	Respiratory syncytial virus (RSV)
Necitumomab (4)	CD25 (a chain of IL2 receptor)	Humanized IgG1	1997	Reversal of transplantation rejection
Rituximab	CD20	Chimeric IgG1	1997	Non-Hodgkin's lymphoma; chronic lymphocytic leukemia; rheumatoid arthritis
Votumumab (5)	Cytokeratin tumor-associated antigen		Not approved	Detection of carcinoma of the colon or rectum \rightarrow nontherapeutic
Sulesomab	NCA90	Murine Fab fragment	Not approved	Diagnostic imaging for osteomyelitis \rightarrow nontherapeutic
Arcitumomab (6)	Human CEA (carcinoembryonic antigen)	Murine Fab fragment	1996	Detection of colorectal cancer \rightarrow nontherapeutic
Imicromab (7)	Human cardiac myosin	Murine Fab fragment	1996	Myocardial infarction imaging agent \rightarrow nontherapeutic
Capromab	Tumor surface antigen PSMA	Murine MAb	1996	Detection of prostate adenocarcinoma \rightarrow nontherapeutic
Nofetumomab	Carcinoma-associated antigen	Murine Fab fragment	1996	Diagnostic imaging of small-cell lung cancer \rightarrow nontherapeutic
Abciximab (8)	GP1Ib/IIIA	Chimeric IgG1 Fab	1994	High-risk angioplasty (prevention of blood clots)
Satumomab	TAG-72	Murine MAb	1992	Detection of colorectal and ovarian cancers \rightarrow nontherapeutic
Muromonab-CD3	CD3	Murine IgG2a	1986	Transplantation rejection

(1): Untuxin has been withdrawn from use in the European Union.

(2): Raptiva[®] was approved in 2003 by the FDA and in 2004 by the EMA. It was voluntarily withdrawn from the market in EU in 2009 and in US in 2009.

(3): Mylotarg[®] was approved in 2000 by the FDA. It was voluntarily withdrawn from the market in US in 2010.

(4): Zenapax[®] was approved in 1997 by the FDA and in 1999 by the EMA. It was withdrawn from the market for commercial reasons in EU in 2009 and in US in 2009.

(5): Humaspect[®] was approved in 1998 by the EMA. It was withdrawn from the market in EU in 2003.

(6): CEA-scan was approved in 1996 by the FDA and by the EMA. It was withdrawn from the market in EU in 2005.

(7): Myoscint[®] has been discontinued.

(8): Country-specific approval (prior to EMA Centralized Procedure).

PD-L1, Programmed death-ligand 1; IgG1, immunoglobulin G, subclass 1; IL-4R α , Interleukin 4 receptor alpha; IgG4, immunoglobulin G, subclass 4; CD20, B-lymphocyte antigen CD20; IL-17RA, interleukin 17 receptor A; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-5, interleukin 5; PDGFR- α , platelet-derived growth factor receptor α ; PA, protective antigen; CD38, cluster of differentiation 38; SLAMF7, SLAM family member 7; EGFR, epidermal growth factor receptor; PD-1, programmed cell death protein 1; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Fab, fragment antigen-binding; LDL-C, low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; GD2, disialoganglioside; BiTEs, bi-specific T-cell engagers; VEGF, vascular endothelial growth factor; CD2, cluster of differentiation 2; CD3, cluster of differentiation 3; IgG2a, immunoglobulin G, subclass 2, isotype a; TAG-72, tumor-associated glycoprotein 72; MAb, monoclonal antibody; GP1Ib/IIIA, glycoprotein IIb/IIIa; IgG1, immunoglobulin G, subclass 1; PSMA, prostate-specific membrane antigen; NCA90, membrane glycoprotein p95; CD25, interleukin-2 receptor alpha chain; RS, retinoschisin; IL2, interleukin 2; HER-2, human epidermal growth factor receptor 2; CD33, sialic acid binding Ig-like lectin 3; CD52, cluster of differentiation 52; EGFR, epidermal growth factor receptor; VILA-4, Very Late Antigen-4; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; IL-12, interleukin 12; IL-23, interleukin 23; IL-1 β , interleukin 1 β ; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; BlyS, B lymphocyte stimulator; MMAE, monomethyl auristatin E; LDL-C, low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; SLAMF7, SLAM family member 7; SLAMF7, SLAM family member 7; SRE, skeletal-related events; CLL, chronic lymphocytic leukemia; EMA, European Medicines Agency; FDA, Food and Drug Administration.

Figure 19. Liste des différents MAB approuvés par l'EMA et la FDA pour une utilisation thérapeutique (Haustrate et al. 2019).

Les anticorps monoclonaux représentent une classe pharmaceutique en croissance rapide qui devient une partie importante de la thérapie de précision. Les MAB sont caractérisés par leur spécificité et leur affinité élevées pour l'antigène cible, qui est principalement présent à la surface des cellules. Les canaux ioniques sont maintenant largement considérés comme des cibles potentielles. Pourtant aucun médicament à base d'anticorps ciblant les canaux ioniques n'a été développé jusqu'à présent pour être utilisé en clinique. Plusieurs MAB élaborés contre

les canaux ioniques semblent pourtant intéressant pour être utilisé en thérapie comme, par exemple, le MAB anti-Orai1 (Figure 20).

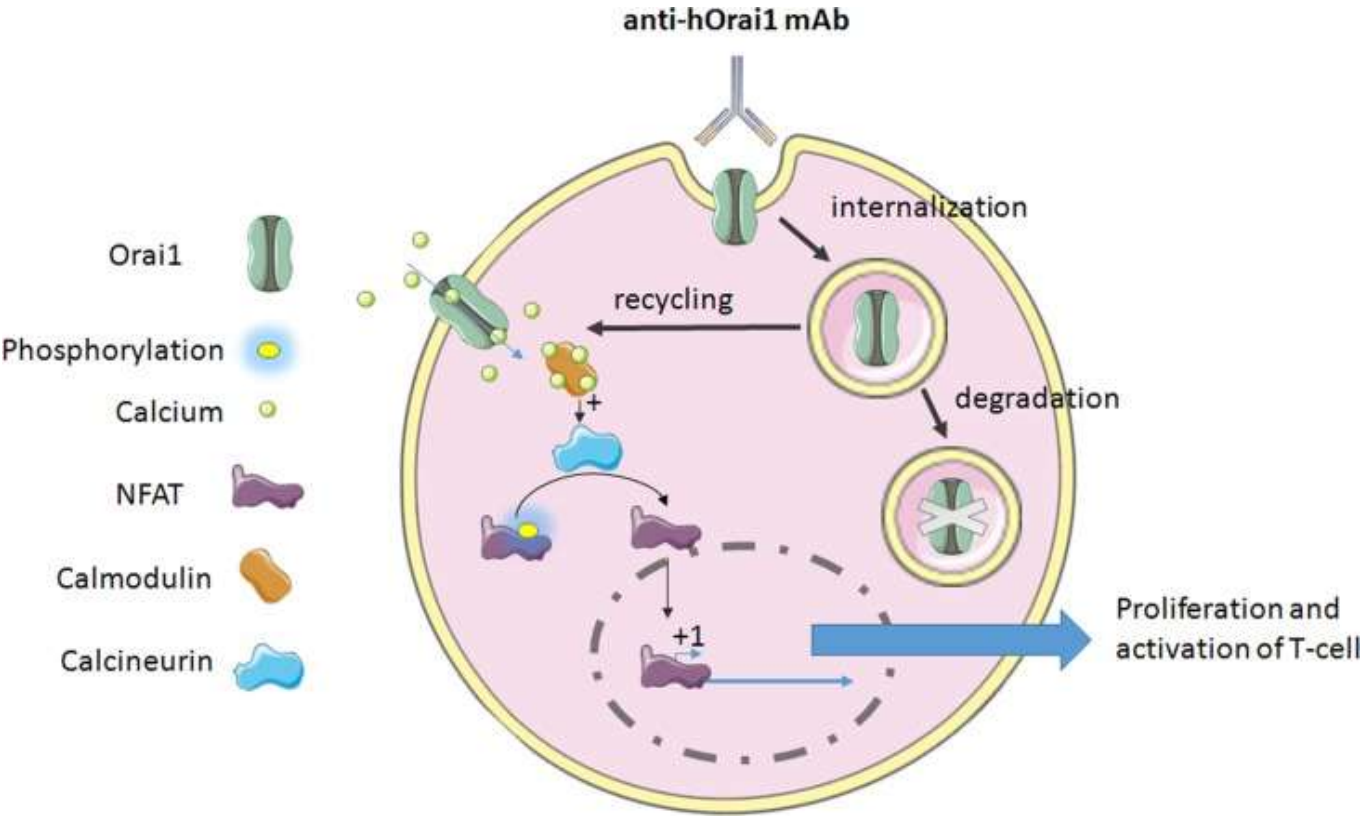


Figure 20. Mécanisme d'action de MAB anti-hOrai1 sur les lymphocytes T (Haustrate et al. 2019).

PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS

PROBLEMATIQUE

Il est maintenant clairement démontré que TRPV6 joue un rôle crucial dans le développement des tumeurs de la prostate. Chez les patients, il est de plus en plus exprimé en fonction de l'agressivité de la tumeur (Wissenbach et al. 2004b). *In vitro*, il a été montré que l'entrée de calcium médiée par TRPV6 jouait un rôle dans la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose ainsi que le développement de métastases (Raphaël et al. 2014b). Des études préliminaires ont notamment montré que TRPV6 était exprimé à la périphérie des tumeurs primaires, ce qui suggère également son implication dans l'apparition des métastases vers des zones préférentielles comme les os. En effet, dans le PCa, il est connu que les métastases préférentielles se situent au niveau des os et forment des lésions ostéoblastiques (Yin, Pollock, et Kelly 2005). De manière intéressante, des lignées cancéreuses prostatiques connues pour former des lésions ostéolytiques dans l'os *in vivo* se mettent à former des lésions ostéoblastiques lorsque TRPV6 est surexprimé. Etant un canal hautement sélectif pour le calcium, nous avons émis l'hypothèse que ce canal peut également participer dans le guidage/installation des cellules PCa dans l'os.

De plus, ce canal participant au maintien de l'homéostasie calcique dans les cellules, l'inhibition ou l'activation de celui-ci entraîne la mort des cellules l'exprimant à la membrane plasmique. Pour cela, l'utilisation de modulateurs de son activité et/ou de son expression est très intéressante d'un point de vue thérapeutique pour cibler les tumeurs surexprimant ce canal.

Dans nos études, une trop forte surexpression du canal TRPV6 dans les lignées cancéreuses utilisées induisait une forte mortalité qui s'explique par l'entrée massive de calcium dans la cellule, connue pour induire l'apoptose. Actuellement, et comme vu précédemment, il existe un certain nombre d'inhibiteurs de TRPV6. Chacun d'eux montre une diminution significative de la prolifération cellulaire et/ou de la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses (Landowski et al. 2011; Neuberger, Nadezhdin, et Sobolevsky 2021; Fu et al. 2017a). Cependant, aucun de ces inhibiteurs n'est spécifique au canal TRPV6, ce qui fait que leur utilisation en tant que traitement thérapeutique est impossible. A l'heure actuelle, il n'existe donc aucun outil fiable ciblant spécifiquement le canal TRPV6.

Les anticorps monoclonaux représentent une classe pharmaceutique en nette expansion. Ils possèdent l'avantage d'avoir une spécificité et une affinité sans équivalent pour leur antigène cible.

En conséquence, il serait donc intéressant de désigner et produire des anticorps capables de venir cibler TRPV6 afin de moduler son activité et ainsi altérer les voies de signalisation qui lui sont associées pour diminuer la survie des cellules cancéreuses *in vitro* et diminuer la croissance tumorale *in vivo*.

OBJECTIFS

Dans le but de venir cibler spécifiquement le canal TRPV6, nous avons créé plusieurs anticorps dirigés contre différentes parties du canal TRPV6. Le canal TRPV6 ayant une très forte homologie avec TRPV5, le choix des épitopes est crucial afin d'obtenir une spécificité envers TRPV6. Ainsi, un premier anticorps polyclonal (rb79) a été dirigé contre une partie de la première boucle extracellulaire située entre les domaines transmembranaires 1 et 2. En effet, cette boucle est intéressante par son accessibilité et l'antigène ciblé est également proche de la N-glycosylation du canal. Il a déjà été montré que la déglycosylation de TRPV6 par des endoglycosidases pouvait activer le canal TRPV6 (Lu et al, 2008). Un deuxième anticorps a été produit (rb82) dirigé contre le pore du canal entre les domaines transmembranaires 5 et 6. Le pore étant une région extrêmement conservée entre TRPV6 et TRPV5, les choix d'épitopes étaient restreints. La région du pore est une région souvent ciblée pour le développement d'inhibiteurs notamment afin d'empêcher l'entrée de calcium dans la cellule et l'activation des voies de signalisation associées. Enfin, deux autres anticorps (rb80 et rb81) ont été élaborés ciblant les régions N- et C-terminales situées à l'intérieur de la cellule et donc non accessibles via le milieu extracellulaire. Cependant, ces anticorps peuvent être utiles dans d'autres applications que leur utilisation dans la modulation de l'activité du canal TRPV6.

Ainsi, les travaux réalisés durant cette thèse ont eu 3 objectifs principaux :

- I) Détecter et cibler le canal TRPV6 dans nos modèles de lignées cellulaires cancéreuses *in vitro*. Pour cet objectif, nous avons :
 - Elaboré différents anticorps polyclonaux (rb79, rb80, rb81 et rb82) et confirmer leur spécificité vis-à-vis de TRPV6 dans les cellules cancéreuses prostatiques *in vitro*.
 - Testé l'utilisation des anticorps polyclonaux dirigés contre l'épitope extracellulaire dans des études fonctionnelles permettant de déterminer la prolifération cellulaire, la mortalité cellulaire ainsi que leur utilisation en tant que marqueur diagnostique du cancer de la prostate dans des coupes de patients en immunohistochimie.

- Créé de nouveaux outils d'étude du canal TRPV6 comme des lignées KO.
- II) Moduler l'activité du canal TRPV6 pour créer de nouveaux outils *in vivo*. Pour cela, une fois la preuve de concept des anticorps polyclonaux établie, nous avons :
- Généré des anticorps monoclonaux de souris ayant pour épitope ceux des anticorps polyclonaux les plus prometteurs et confirmer leur spécificité vis-à-vis de TRPV6.
 - Utilisé des anticorps monoclonaux *in vitro* sur différents tests fonctionnels mesurant l'impact sur la prolifération cellulaire.
 - Utilisé ces anticorps *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cellules cancéreuses dans des souris immunodéficientes et étudier les mécanismes d'action impliqués.
- III) Etudier l'implication de TRPV6 dans l'acquisition du phénotype agressif/métastatique en vérifiant le rôle du canal TRPV6 dans les processus de migration *in vitro* et sur le développement de métastases *in vivo*.

MATERIEL ET METHODES

Tous les modèles animaux et cellulaires ainsi que les techniques utilisées durant ma thèse sont décrits ci-dessous. Je me suis investi dans la totalité des expériences en les réalisant moi-même pour la majorité d'entre elles à l'exception des immunohistochimies réalisées avec le Dr Mihalache. Néanmoins, j'ai participé à l'élaboration du mode de marquage des coupes, à l'optimisation des concentrations et à l'analyse des résultats.

I. Modèles animaux et échantillons de patients

Toutes les expériences *in vivo* réalisées au cours de cette thèse ont été préalablement validées et autorisées par le comité éthique (CEEA75) et par le ministère (Ref : 201703021400830 sur APAFIS) à être effectuées dans l'animalerie de l'université de Lille PHEXMAR (Numéro d'agrément D 59-00913) sous la direction du Dr Lehen'kyi.

1) Xénogreffes dans un modèle de souris Swiss-nude

Pour ces expériences, nous avons choisi d'utiliser le modèle de souris swiss-nude immunodéficientes de la société Charles Rivers, âgées de 4 semaines. Les souris sont gardées dans une armoire ventilée afin de garantir la stérilité et toutes les manipulations des animaux se font sous hôte.

Les souris, après stabulation d'une semaine, sont greffées par injection sous-cutanée de 2 millions de cellules contenues dans du matrigel® comportant des facteurs de croissance permettant aux cellules d'adhérer plus facilement et d'éviter leur dispersion.

La croissance tumorale est suivie tous les 2 jours à l'aide d'un pied à coulisse permettant d'établir une courbe de croissance dans les différents groupes. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux est évalué quotidiennement. L'observation de signe de douleur ou de mal-être (prostration, état du pelage, perte de poids, comportement agressif avec morsures) entraînera la sortie du protocole de l'animal et sa mise à mort. La perte de poids tolérée est de 10% du poids corporel initial. Dans nos expériences, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale après l'utilisation d'isoflurane.

Lorsque la tumeur atteint la taille maximale autorisée de 2500mm³, on procède à une chirurgie afin d'exciser la tumeur primaire et de pouvoir suivre l'apparition ou non de potentielles métastases après suture de l'animal. Tous les échantillons biologiques sont gardés en les fixant au paraformaldéhyde afin de procéder à des études histologiques ou en les lysant pour des analyses protéomiques et/ou transcriptomiques.

Enfin, si la souris développe des métastases après chirurgie, celles-ci sont également récupérées après sacrifice de l'animal.

Dans nos études, dès que les tumeurs commencent à être visibles (ou dès qu'elles atteignent 500mm³ pour la seconde expérience *in vivo*), des injections intra-péritonéales d'anticorps sont réalisés 2 fois par semaines à une concentration de 100 µg/kg.

De plus, pour la croissance tumorale et le développement de métastases, les souris sont passées sous un système d'imagerie petit animal (Bruker, USA) en visualisant le fluorophore mCherry présent dans les lignées de cellules cancéreuses utilisées.

2) Echantillons de patients

Des coupes de tissus de prostate humaine paraffinées provenant de 21 prostatectomies ont été obtenues auprès du département de pathologie cellulaire à l'hôpital t Vincent de Paul à Lille. Les inclusions ainsi que le marquage avec les anticorps ont été réalisés à l'hôpital St Vincent de Paul, après mise au point des concentrations à utiliser ainsi que des méthodes de démasquage à utiliser (différentes selon les anticorps). L'immunohistochimie a été effectuée à l'aide d'un automate de coloration de lames Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) selon les protocoles établis et la détection a été effectuée à l'aide d'un système de détection IVIEW-DAB (N760-500, Ventana Medical Systems, Inc.).

II. Modèles cellulaires et culture

1) Modèles cellulaires

Pour ces travaux, nous avons utilisé plusieurs lignées cellulaires provenant de ATCC (American Type Culture Collection, USA) :

- Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) sont des cellules humaines non cancéreuses issues de la transformation dans les années 70 de cellules embryonnaires de rein par l'adénovirus 5.
- Les cellules LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) sont des cellules cancéreuses prostatiques hormono-sensibles, établies en 1977 à partir d'une métastase ganglionnaire lymphatique supra-claviculaire d'origine prostatique chez un patient caucasien âgé de 50 ans.
- Les cellules PC3 ont été établies en 1979 des métastases de l'os du grade IV de PCa du patient caucasien âgé de 62 ans.
- Les cellules DU145 sont originaires des métastases du système nerveux central issues de l'adénocarcinome primaire.
- Les cellules PC-3M est une lignée dérivée de métastases créées à partir des cellules PC-3 chez la souris.
- Les cellules PC3M-luc-C6 qui sont issues de cellules PC-3M exprimant la luciférase et formant notamment des lésions ostéoblastiques dans l'os.
- La lignée CHO est une lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine établie dans les années 1960.
- La lignée PNT1a est une lignée de cellules prostatiques humaines immortalisées par SV40 obtenues à partir d'un homme adulte de 35 ans post-mortem.
- La lignée HAP-1 est une lignée de cellules haploïdes dérivées de KBM-7 qui a été trouvée chez un patient avec une leucémie myéloïde chronique (LMC).

2) Culture cellulaire

Toutes les cellules ont été cultivées en flacon de culture de 75 cm² (Sarstedt®) dans un incubateur thermorégulé à 37°C sous une atmosphère enrichie en CO₂ à 5% et saturée en humidité. Les milieux utilisés sont :

- RPMI-1640 (Gibco) pour les lignées LNCaP, PC-3, PC-3M, DU145 et PNT1a.
- DMEM (Gibco) pour les lignées HEK et CHO.
- IMDM (Gibco) pour la lignée HAP-1.
- MEM (Gibco) pour la lignée PC3M-luc-C6.

Chacun de ces milieux est supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté en chauffant à 56°C pendant 30 min, 2 mM de L-Glutamine (Sigma) et 100 µg/ml d'antibiotique kanamycine (Sigma). Le milieu est changé tous les 2-3 jours et les cellules sont passées dès qu'elles atteignent 70% de confluence dans le flacon de culture. Le passage des cellules se fait par trypsinisation (Trypsine-EDTA 0,25%), elle-même neutralisée par l'ajout de milieu contenant du SVF.

3) Clones stables

Différents clones stables ont été générés et utilisés dans nos expériences à partir de la lignée cellulaire HAP-1 dont un Knock-out (KO) de TRPV6 a été réalisé par Crispr-Cas9. Les cellules HAP-1 *trpv6*^{-/-} ont été transfectées avec les plasmides suivants : pmCherry et pTRPV6. Ces cellules ont ensuite été sélectionnées à l'aide de Généticine (G418) à une concentration de 500µg/mL puis maintenues après 1 semaine de sélection avec 100 µg/mL.

Ainsi, plusieurs clones ont été créés : HAP-1^{*trpv6*^{-/-}} + pmCherry et HAP-1^{*trpv6*^{-/-}} + pWT.

4) Transfections

a) Lipofection des siARN

Afin de réprimer l'expression de TRPV6 dans les différentes lignées, nous avons utilisé des ARN interférents (siARN). Les siARN sont des petits ARN d'une vingtaine de nucléotides qui sont reconnus par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex).

L'endonuclease, Argo, du complexe RISC va ainsi pouvoir cliver les ARNm complémentaires des siARN inhibant la traduction de l'ARNm cible.

Dans nos expériences, nous utilisons la technique de lipofection pour intégrer les siARN à l'intérieur des cellules. Le but de cette technique est d'intégrer les siARN à l'intérieur de liposomes qui vont venir fusionner avec la membrane plasmique et ainsi libérer leur contenu à l'intérieur de la cellule. Pour cela, les cellules sont transfectées avec 40 nM de siARN-Luciférase (siCT/Luc), ou siARN(1-4) ou mix de quatre siRNAs de TRPV6 (siTRPV6) à l'aide du kit Lipofectamine 3000 (ThermoFisher®). Les séquences des siARN utilisés dans cette étude sont indiquées dans le Tableau 1.

siARN	Numéro d'accension	Séquence ciblée 5' – 3'
siLuc	AB_490793	CUUACGCCUGAGUACUUCGA
siTRPV6#1	NM_018646	CCUGCUGCAGCAGAAGAGG
siTRPV6#2	NM_018646	GACTCTCTATGACCTCACA
siTRPV6#3	NM_018646	CGUCAUGUACUUCGCCCGA
siTRPV6#4	NM_018646	CCUCCUCAUUGCCAUGAUG

Tableau 1 : Liste des siARNs utilisés (Eurogentec Co.).

b) Lipofection de vecteurs d'expression

De même qu'avec les siARN, il est également possible d'intégrer des vecteurs d'expression par lipofection avec de très bons taux de transfection. Dans nos expériences, nous utilisons notamment les plasmides pmCherry et pTRPV6 afin de surexprimer TRPV6 dans nos clones. Les transfections se font à l'aide du kit lipofectamine 3000 (Thermofisher®) sur des cellules adhérentes avec une confluence d'environ 70%. Un mix comportant du milieu Opti-MEM (Gibco®), le plasmide correspondant et le lipofectant est réalisé, vortexé et laissé 10 min à température ambiante le temps de la formation des liposomes puis ce mélange est ajouté sur les cellules adhérentes.

c) Nucléofection

La technique de nucléofection est utilisée pour les cellules HEK dans les expériences d'électrophysiologie/Patch Clamp. La méthode d'utilisation de cette technique repose sur l'électroporation. On applique un voltage spécifique avec des réactifs spécifiques à chaque lignée cellulaire afin d'augmenter la perméabilité de la membrane. Pour cela, on récupère un million de cellules HEK, on ajoute 2 µg de plasmide ainsi que le tampon adapté au type cellulaire selon le kit de nucléofection d'AmaxaGmbH®. Un programme spécifique est à utiliser pour chaque lignée cellulaire.

III. Biologie moléculaire

1) Extraction d'ARN et RT

Les extractions des ARN des différentes lignées ont été effectuées avec le kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel®). Après contrôle de la qualité et dosage au spectrophotomètre, 1 µg d'ARN est traité à la désoxyribonucléase I (DNase I) avec son tampon associé afin de dégrader toute trace d'ADN génomique. L'activité de la DNase I est inhibée par ajout d'EDTA (2,5mM) chélatant le magnésium nécessaire à son activité et par incubation à 65°C pendant 10min (inactivation de l'enzyme).

Les ARN traités sont soumis à la transcription inverse (RT) permettant la synthèse des ADN complémentaires (ADNc). Pour cela, les ARN sont incubés avec des hexamères (amorces aléatoires venant se fixer sur l'ARN) à 70°C. L'enzyme utilisée pour réaliser la transcription inverse est une ADN polymérase, MULV. En ajoutant du tampon, du MgCl₂ (2,5mM), des désoxynucléotides (dNTP à 2,5mM) et un inhibiteur de RNase, les conditions nécessaires à la RT sont réunies. Une première étape d'hybridation (10min à température ambiante) est suivie directement par une étape d'élongation (30min à 42°C) permettant à l'enzyme MULV de s'activer et de produire les ADNc. Les ADNc sont ensuite incubés 10min à 70°C pour désactiver MULV puis placés dans la glace et conservés à -20°C pour les études par PCR.

2) PCR semi-quantitative

50 à 100 ng d'ADNc obtenus sont amplifiés par PCR semi-quantitative grâce au kit AmpliTaq Gold (AppliedBiosystems) selon le protocole du thermocycleur (Tableau 2) et en utilisant les amorces sens et anti-sens correspondantes (Tableau 3). Les produits de PCR sont analysés après

migration sur le gel d'agarose 2% contenant du SyBrGreen, puis visualisés sous UV (Mini-Lumi®) et les images sont enregistrées en utilisant le logiciel Gelcapture® (Bio-Imaging System).

Etapes	activation	dénaturation	hybridation	extension	extension finale
Cycles	1	40			1
SQ	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
	5 min	5 min	30 s	15 s	7 min
Q	95°C	95°C	60°C		65-95°C
	30 s	30 s	30 s		Melting curve

Tableau 2 : Protocoles des thermocycleurs de PCR semi-quantitative (SQ) et quantitative en temps réel (Q).

3) PCR quantitative en temps réel

Pour cela 50 ng d'ADNc obtenus équivalents des ARN sont amplifiés et quantifiés selon le protocole du système de détection de q-PCR en temps réel CFX96 (Biorad) du Tableau 2 en utilisant le kit Mesa Green qPCR MasterMix Plus pour test SYBR (Eurogentec Co.) complété par les amorces F1 et B1 (Eurogentec) énumérées dans le Tableau 3. Les résultats sont quantifiés en utilisant la méthode comparative du seuil Delta-Delta CT décrite précédemment (Livak et Schmittgen 2001).

Protéine	Numéro accession	Technique utilisée	F1 (5'-3')	B1 (5'-3')	Taille attendue p.b.
TRPV6	NM_018646	Q	GCCTTCTATAT CATCTTCC	GGTGATGCTGTACA TGAAGG	155
HPRT	NM_000194	Q	GCGGTCGTGA TTAGTGATGAT	CGAGCAAGACGTTT AGTCCT	134
AKTB	NM_001101	SQ	CAGAGCAAGA GAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAA ACATGAT	220
TRPV6	NM_018646	SQ	GGCTGGTGCA ACGTCATGTA C	GGTTGAGCATGAGC AGTGTG	335

TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex1-F-1 : AAGGCAGGAGACAGGAGAC
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex1-F0 : GACCTCTACAGGGAGACGG
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex3-B2 : CATAGAGCTCAGATGTCATGG
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex4-F3 : CAGAACATGAACCTGGTGC
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex5-B3 : CGATCTCCTCACTGTTCAACA
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex6-B4 : CTGTCGTAGGACAGCAACAG
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex7-B5 : GGTGGTGATGATAAGTTCCAG
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex8-F4 : GGTGCCATATATCTGCTGTAC
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex9-B6 : CTACCAGCAGGATGATGATAG
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex10-B7 : GGATGGTCTGTCCAAAGAAG
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex11-Fsq : GGCTGGTGCAACGTCATGTAC
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex12-Fex : ATTCTGCTGGCTGATGGC
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex13-Bex : CGATGATGGTAAGGAACAGC
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex14-F5 : TTGTGGCCACCACGGTG
TRPV6	NM_01864 6	AP	V6-ex15-B8 : AGGTACTIONCGAGACACTGAGG

Tableau 3 : Séquences des amorces de PCR semi-quantitatives (SQ), dont celles utilisées pour l'ARN profiling (AP), et quantitative en temps réel (Q).

4) ARN profiling de TRPV6

Pour étudier si tous les exons du canal TRPV6 sont exprimés, s'il n'y a pas d'insertions de grandes tailles, nous avons conçu des amorces qui ciblent chaque exon connu en incluant la partie 5'-UTR. Les amorces désignées sont indiquées dans le Tableau 3 (AP) et les combinaisons utilisées ainsi que leur taille attendue dans le Tableau 4.

Couple d'amorces	Taille attendue, b.p.	Exon ciblé/couvert
F-1/B2	480	(5'-UTR)-2
F0/B2	460	(5'-UTR)-2
F1/B1	150	1-2
F1/B2	330	1-2-3
F3/B3	150	4-5
F3/B4	290	4-5-6
F3/B5	500	4-5-6-7
F4/B6	210	8-9
F4/B7	260	8-9-10
Fsq/Bex	240	11-12
Fex/Bex	150	12-13
F5/B8	280	14-15

Tableau 4 : Séquences des amorces de PCR semi-quantitative utilisées pour ARN profiling du canal TRPV6.

5) Génération des anticorps

Quatre anticorps polyclonaux de lapin ont été générés à la demande par Eurogentec en utilisant le programme 28-jours : l'un dirigé contre la partie extracellulaire correspondant à la première boucle du canal (rb79), le deuxième dirigé contre le domaine C-terminal (rb80), le troisième dirigé contre le domaine N-terminal (rb81) et le dernier dirigé contre le pore de ce canal (rb82). Ce dernier anticorps ayant un résultat ELISA insuffisant, avait été passé au programme 90 jours. Les séquences peptidiques des épitopes de ces anticorps sont précisées et indiquées sur le Tableau 5. Pour tous les traitements, la quantité de la protéine IgG entre les différents anticorps (rb79, rb82, et comme contrôle l'anticorps polyclonal de lapin anti-HA (sc805, Santa Cruz, CA) a été normalisée et était égale à 0,5 µg/µl.

Sur les 2 tentatives de génération d'anticorps monoclonal sur les épitopes de 79 et 82, seul l'anticorps monoclonal dirigé contre le pore du canal (MAB82) a réussi à être généré. En effet,

après les étapes de sélection des sera (testés par imagerie calcique, western blot et patch clamp), l'étape de fusion pour MAB82 a été un succès alors que celle de MAB79 a échoué pour tous les clones préalablement sélectionnés. Ainsi, le MAB82 obtenu est d'isotype IgG2a.

Antibody	Design/Manufacturer	Clone	Epitope	Dilution	Pretreatment IHC	Incubation IHC
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb79	QEAYMTPKD DIRLVG	1/200 IHC 1/500 WB	CC2 STD	32 min
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb80	QRRESWAQSR DEQNL	1/500 WB		
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb81	HTRGSEDLDK DSVEKL	1/500 WB		
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb82	TEDPEELGHF YDYPMA	1/500 WB		

Tableau 5. Liste des anticorps et leur épitope

IV. Analyse protéomique

1) Extraction de protéines totales

Les cellules utilisées pour le western blot sont cultivées sur des boîtes de Pétri de 100mm et gardées sur glace le temps de l'extraction. Après rinçage avec du PBS (Phosphate Buffered Saline), les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon RIPA composé de : Triton X-100 1% (détergent non ionique), NaCl 150mM, PO₄Na₂/K 20 mM pH 7,2 (tampon phosphate), deoxycholate de sodium 1%, EDTA 5mM et 0,1% de SDS (Sodium DodécylSulfate, détergent ionique). Un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma®) est ajouté (10µL/mL) ex-tempera avec 5Mm d'orthovanadate de sodium (conservation des phosphorylations). Les lysats obtenus sont ensuite ultra-soniqués et centrifugés à 12 000g à 4°C pendant 10min afin d'éliminer les débris non lysés. Les surnageants sont récupérés et dosés par la méthode BCA (Pierce).

2) Western-blot

Après dosage, 50µg de protéines totales sont récupérées pour réaliser une électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Après ajout de tampon de Laemmli pour dénaturer les protéines (Tris-HCl 125mM pH 6,8, SDS 4%, β-mercaptoéthanol 5% (réduction des ponts disulfures), glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,01%), une électrophorèse sur gel d'acrylamide 10% est réalisée. Les protéines ayant été dénaturées par les différents tampons (et par chauffage à 95°C pendant 5min) et chargées négativement grâce au SDS, celles-ci vont pouvoir migrer à travers le gel de polyacrylamide vers le pôle positif (bas du gel). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidène Fluoride) par électrotransfert semi-sec (Biorad) dont celle-ci aura été perméabilisée avec du méthanol durant 3min. Une fois le transfert effectué, on sature les sites aspécifiques de la membrane en incubant celle-ci 1h à température ambiante avec du TNT-lait 5% (Tris-HCl pH 7,4, NaCl 140mM, tween 20 0,05% et du lait en poudre écrémé). La membrane est ensuite incubée durant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (dilution 1/500^{ème} pour la plupart des anticorps utilisés). Après l'incubation de l'anticorps primaire sur la nuit, la membrane est rincée 2 fois avec la solution de TNT puis incubée durant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin selon l'anticorps primaire utilisé à une dilution de 1/100 000^{ème}) couplé à HRP (HorseRadish Peroxydase) dans du TNT-lait 1%. Après rinçage, la membrane est révélée par chimioluminescence à l'aide de la solution Supersignal West Dura contenant du luminol et du peroxyde d'hydrogène nécessaires à la HRP pour la réaction de chimioluminescence. Un calcul de densitométrie est effectué à l'aide du logiciel Image J afin de déterminer les variations d'expression de notre protéine d'intérêt (TRPV6) par rapport au gène de ménage (β-actine) dans différentes lignées/conditions.

3) Biotinylation

La biotinylation permet de séparer les protéines membranaires des protéines totales afin de déterminer l'expression de TRPV6 à la membrane cellulaire (celui-ci pouvant être contenu dans des vésicules à l'intérieur de la cellule). Après lavage au PBSB (PBS 10%, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 0,5mM, pH 8), les cellules sont incubées pendant 30min à +4°C avec une solution de PBS-biotine (1 mg/mL) (Sulfo-NHS-SS-Biotin Pierce) se fixant sur toutes les protéines à la membrane cellulaire puis avec une solution de PBSB-BSA (20ng/mL) durant 2 min afin de fixer la biotine ne s'étant pas fixée. Après rinçage, les cellules sont lysées avec la solution RIPA. Une partie des protéines est conservée comme contrôle et l'autre partie est incubée avec des

billes de streptavidine toute la nuit à +4°C. Après incubation, les billes sont rincées au PBS et les protéines membranaires sont éluées avec du tampon de Laemmli pour pouvoir réaliser un western blot.

4) Immunohistochimie

Les coupes de tissus paraffinées de prostate humaine anonymes de 21 prostatectomies ont été obtenues au Département de Pathologie Cellulaire, Hôpital St Vincent de Paul à Lille. Chaque coupe de tissu paraffinée a été soumise au déparaffinage puis démasquage d'antigène en utilisant le tampon citrate à 95°C dans le bain marie. Après saturation dans la solution contenant 1% de BSA et 0,05% Triton X100 en PBS-gélatine, les coupes de prostate étaient incubées avec les anticorps primaires tels que rb79 et rb82, (1:200), anti ki-67 (1:1000) et PSA (1:1000). L'immunohistochimie a été effectuée en utilisant «Benchmark XT automated slides stainer» (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) avec les protocoles conventionnels établis auparavant. La détection a été faite en utilisant le système de détection IVIEW-DAB (N760-500, Ventana Medical Systems, Inc.).

V. Etudes fonctionnelles

1) Viabilité cellulaire

a) Coloration au bleu de trypan

La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Chez une cellule vivante, le bleu trypan entrant est tout de suite relargué, contrairement aux cellules mortes. Ainsi, les cellules mortes sont colorées en bleu alors que les cellules vivantes ne le sont pas. Après les traitements avec un anticorps dans les puits de 12-puits plaque, les cellules sont détachées et individualisées par trypsinisation puis colorées par 0,4% de solution de bleu de trypan dans la solution isotonique avec pH 7,3, et comptées en cellules de Malassez. Chaque puit fait l'objet de 6 comptages en cellules de Malassez.

b) Test de MTS

Le test MTS (Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) est un test de dosage colorimétrique permettant de mesurer indirectement la viabilité cellulaire. Pour réaliser ce test, on utilise du sel de tétrazolium (MTS) et du phénazine méthosulfate (PMS). Ces

composés vont permettre de mesurer l'activité de la déshydrogénase mitochondriale présente dans les cellules métaboliquement actives. Via le NADH,H⁺, l'enzyme va réduire le MTS (en présence de PMS) en un composé coloré, le formazan. Ainsi, la quantité de formazan produit est indirectement significative de la viabilité cellulaire et peut être quantifiée avec un spectrophotomètre lecteur de plaques à une absorbance de 490nm. Pour se faire, entre 2000 et 10 000 cellules sont déposées dans des puits de plaques 96 puits avec un volume final de 100µL. Le MTS+PMS est ajouté directement dans le milieu durant 1h à l'obscurité à 37°C avant de mesurer l'absorbance. Ce dosage est effectué tous les jours durant au moins 3 jours afin d'obtenir une courbe de suivi de croissance cellulaire.

c) Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de différencier les cellules selon plusieurs critères : leur taille, leur granulométrie ou par des fluorophores. Ainsi, dans nos expériences, nous avons utilisé cette technique afin d'analyser la répartition des cellules dans le cycle cellulaire pour caractériser le pic sub-G1 caractéristique de cellules en apoptose mais nous avons aussi utiliser cette technique pour étudier le marquage de plusieurs lignées cellulaires avec nos anticorps générés notamment rb79, rb82 et MAB82.

i. Cycle cellulaire

Afin d'étudier l'état des cellules dans le cycle cellulaire après traitement avec les anticorps, il est nécessaire d'effectuer de la cytométrie en flux. Pour cela, 500 000 cellules sont récupérées par trypsinisation après traitement avec les différents anticorps. Ces cellules sont centrifugées (1000 rpm, 5min), rincées puis fixées avec du méthanol glacial (-20°C) pendant 10min. Après fixation, les cellules sont rincées 3 fois puis resuspendues dans 100µL de PBS. Les cellules sont ensuite traitées avec 100µL de RNase A (1 mg/mL) durant 15min. Enfin, les cellules sont marquées avec l'iodure de propidium (50 µg/mL) dans l'obscurité pendant 2h à +4°C avant de pouvoir être analysé au cytomètre.

ii. Etude du marquage des cellules avec les anticorps

Dans nos études sur le marquage de TRPV6 par les anticorps, des études de cytométrie en flux ont été réalisées avec l'aide de Mme Nathalie Jouy sur la plateforme de tri cellulaire qui utilise un cytomètre CYAN ADP XL9 (Beckman Coulter). Les cellules sont d'abord trypsinisées et resuspendues dans 100µL de PBS. Une première étape d'incubation avec l'anticorps primaire (rb79, rb82 ou MAB82) est réalisée durant 30 min à 4°C (1,5 µg d'anticorps dans un volume final de 100 µL PBS+BSA 1%) puis les cellules sont rincées 2 fois avec 1mL de PBS. Ensuite,

on incube les cellules avec l'anticorps secondaire correspondant (anti-souris ou anti-lapin) couplé à AlexaFluor488 (1 µg d'anticorps dans un volume final de 100 µL PBS+ BSA 1%) durant 1h à 4°C puis les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS. A la suite des incubations avec les anticorps, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 2% durant 30 min à température ambiante puis rincées 2 fois avec du PBS. Pour chaque lignée testée, 3 conditions sont étudiées : le contrôle négatif (sans anticorps), le contrôle anticorps secondaire seulement puis le test en lui-même.

2) Mort cellulaire

a) Coloration de Hoechst

Le bisbenzimidazole (Hoechst) est un agent intercalant de l'ADN permettant de visualiser la chromatine sous microscope à fluorescence. Après 48 à 72h de traitement avec les différents anticorps, l'ensemble des cellules (flottantes ou adhérentes) est récupéré et passé au cytopspin pour que les cellules soient déposées sur lame via la force centrifuge. Les cellules sont ensuite fixées au méthanol pendant 15 min à -20°C puis rincées avec du PBS. Les lames sur lesquelles les cellules sont fixées sont incubées durant 30 min à l'obscurité avec une solution de Hoechst (1 mg/mL). Les lames sont rincées 2 fois avec du PBS avant d'être montées avec des lamelles grâce au glycergel®. Les morphologies des noyaux apoptotiques comme la condensation périnucléaire de la chromatine, l'hyper-condensation de la chromatine, formation de vésicules apoptotiques sont observées au microscope à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) à une longueur d'onde de 435nm.

b) Technique de TUNEL

Le test de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transférase dUTP Nick End Labeling) permet de détecter des fragments d'ADN clivés durant l'apoptose. Après clivage par des endonucléases, l'ADN génère des extrémités 3' OH libres. Le test de TUNEL permet qu'une enzyme, la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transférase) reconnaisse ces extrémités et y ajoute des nucléotides marqués (ici marqués avec TMR-Red). Nous avons dans nos expériences utilisé le kit In situ Cell Death Detection Kit, TMR-red (Roche, France). Une fois les cellules traitées avec les anticorps, cytopspinées et fixées, une étape de perméabilisation avec 0,1% de Triton X-100 est nécessaire. Ensuite, 50 µL du mix enzyme+tampon est déposé sur les lames durant 1h à 37°C dans l'obscurité. Enfin, les cellules sont rincées 2 fois avant marquage au DAPI (50 µg/mL) et montage lame/lamelle sous glycergel®. Les lames sont observées en microscopie à épifluorescence (AxioImager, Zeiss).

3) Migration cellulaire

a) Test de blessure (Wound healing assay)

Des cellules cancéreuses prostatiques sont maintenues en culture jusqu'à atteindre une confluence maximale. A l'aide d'un cône de micropipette, une bande de cellules est arrachée du support, ce qui constitue la blessure. Le milieu de culture est changé et les cellules réincubées durant 24h à 48h permettant de suivre l'évolution de la blessure. En effet, les cellules se trouvant à la bordure de la blessure vont migrer vers l'espace libre créé. L'évolution est suivie par microscope à différents temps et différents endroits et analysée à l'aide du logiciel ImageJ.

b) Chambre de Boyden

Entre 2500 et 10 000 cellules sont déposées sur des inserts fixés dans des plaques 24 puits. Chaque insert est composé d'une membrane poreuse avec des pores de $8\mu\text{M}$. Le but est ainsi de créer un gradient de concentration de sérum entre le milieu contenu dans l'insert et le milieu contenu dans le puit pour inciter les cellules à migrer vers le milieu contenant du sérum. Les cellules vont ainsi migrer à travers la membrane poreuse de l'autre côté de l'insert en contact avec la solution contenant du sérum (entre 24h et 72h). Une fois le temps écoulé, les inserts sont rincés avec du PBS et les cellules présentes vers la face supérieure (cellules n'ayant pas migré à travers la membrane) sont enlevées à l'aide d'un coton-tige. Les cellules restantes ayant migrées de l'autre côté de l'insert à travers la membrane sont fixées durant 15min à $+4^{\circ}\text{C}$ avec du méthanol puis, après rinçage, les noyaux sont colorés en incubant les cellules 30 min d'une solution de Hoechst, intercalant de l'ADN colorant les noyaux en bleu. Le nombre de cellules est ensuite comptabilisé à l'aide de photos prise au microscope grâce au logiciel ImageJ.

c) Vidéomicroscopie

Le suivi du déplacement des cellules est suivi à l'aide d'un système de vidéomicroscopie. Pour cela, les cellules sont cultivées dans des boîtes spéciales (Ibidi®) ayant 4 compartiments. Avant l'expérience, les cellules sont incubées 30min avec une solution de Hoechst vital, colorant les noyaux, permettant de suivre le déplacement des cellules via un logiciel grâce à leur noyau coloré. Un traitement à l'iodure de propidium peut être effectué avant permettant de suivre l'incorporation de celui-ci à l'intérieur des cellules et analyser l'impact de nos anticorps sur la mortalité cellulaire au cours du temps.

VI. Imagerie calcique et électrophysiologie

1) Imagerie calcique

La technique d'imagerie calcique permet de détecter les variations de concentration calcique dans le cytoplasme de l'ensemble des cellules vivantes présentes dans le champ du microscope. Cette mesure quantitative est possible grâce à l'utilisation de la sonde ratiométrique Fura 2-AM. En effet, le Fura 2-AM est un chélateur calcique fluorescent possédant deux longueurs d'onde d'excitation en fonction qu'il soit libre (380 nm) ou lié (340 nm) au calcium et une unique longueur d'onde d'émission (510 nm). Ainsi, l'augmentation de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules se traduit par une diminution de la fluorescence émise à 510 nm à la suite d'une excitation à 380 nm alors que la fluorescence émise à 510 nm à la suite d'excitation à 340 nm augmente. Le second grand avantage du Fura 2-AM est dû à ce groupement acetométhoxyl (AM) qui lui permet de traverser la membrane plasmique des cellules, puis celle-ci est clivée dans le cytoplasme par des estérases empêchant la sonde de ressortir. Donc, les cellules à étudier sont chargées de sondes fluorescentes en ajoutant 2,5 μM de fura2-AM dans le milieu de culture pendant 45 min à 37°C, puis éliminé en changeant le milieu de culture 15 min à 37°C.

Les cellules sont finalement rincées quelques minutes avec du milieu HBSS standard (Hank's Balanced Salt Solution) dont la composition est la suivante : 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 0,3 Na_2HPO_3 , 0,4 KH_2PO_4 , 4 NaHCO_3 , 5 glucose, et 10 HEPES. Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH.

Enfin, les protocoles permettant de visualiser les différentes entrées et vidanges calciques seront développés explicitement dans chaque expérience d'imagerie. L'équipement permettant de visualiser les variations d'émission de fluorescence par la sonde aux 2 longueurs d'onde d'excitation 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 (Micro-Max 5 Mz, Princeton) et d'un ordinateur dont le logiciel (Métafluor 5.0, Universal Imaging) permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des images.

2) Patch clamp

Le « patch clamp » est une technique d'électrophysiologie sur cellule unique qui consiste à isoler électriquement un fragment de la membrane plasmique de la cellule vivante en

lui apposant une pipette de verre d'un diamètre de l'ordre du micromètre en appliquant une légère dépression dans cette pipette de verre. Ce protocole permet alors d'imposer un potentiel en mesurant simultanément des fluctuations de courant de l'ordre du picoampère (pA, 10-12A) avec une fréquence très élevée (> 1 kHz). L'ensemble des expériences de Patch-Clamp dans cette étude a été réalisé en configuration cellule entière à température ambiante. Les courants ioniques transmembranaires sont mesurés à l'aide d'un amplificateur EPC9 (HEKA Electronic, Allemagne) couplé à un ordinateur et analysés grâce au programme Origin 7.0 (Microcal, Northampton, MA).

La composition de la solution extracellulaire pour le patch-clamp est la suivante (en mM) 120 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 glucose, et 10 Hepes, pH 7,4 ajusté avec hydroxide de tetraethylammonium, et l'osmolarité 310 mOsm/kg ajusté avec D-mannitol. Les pipettes de patch étaient remplies avec la solution intracellulaire basique de (en mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 Hepes, 10 BAPTA, et 6 MgCl₂ (pH ajusté à 7,4 avec CsOH et l'osmolarité était 295 mOsm/kg ajusté avec D-mannitol).

Nous obtenons ainsi l'enregistrement de l'activité du canal calcique membranaire tel que TRPV6 ainsi que ses 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.

VII. Microscopie

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre et traitées avec 1 :500 de rb79 et/ou rb82 pendant 10 min suivies par la fixation avec 3,75% de paraformaldéhyde en PBS + 0,05% de glutaraldehyde. Une solution PBS-glycine (30 mM) a été utilisée pour neutraliser la réaction avec ou sans perméabilisation avec 0,5% de saponine. Les cellules étaient lavées en PBS et incubées avec du sérum d'âne pour couvrir les sites aspécifiques. L'Alexa Fluor® 488 ou 546 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes, 1/4000) ont été utilisés comme anticorps secondaires. L'analyse de la fluorescence a été effectuée en utilisant le Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510 connecté à Zeiss Axiovert 200 M avec « 40X1.4 numerical aperture oil immersion lens » à température ambiante. Les deux canaux ont été excités, récupérés séparément et ensuite couplés (merged) en utilisant le logiciel Carl Zeiss LSM Image Examiner.

VIII. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Origin 7.0 (Microcal Software Inc.). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes arithmétiques \pm écart-type (S.E.M) comparées par le test ANOVA. Dans les graphes, (*), (**) et (***) signifient une différence significative avec $P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$, respectivement.

RESULTATS

Au début des années 2000, beaucoup d'études sur l'expression du canal TRPV6 dans divers tissus ont été réalisées montrant notamment une surexpression dans de nombreuses pathologies telles que le cancer. Cependant, des outils spécifiques pour la détection de TRPV6 dans les cellules et divers tissus manquaient encore.

Pour cela, nous avons généré et validé 4 anticorps polyclonaux de lapin (rb79, rb80, rb81 et rb82) dirigés contre des épitopes spécifiques à TRPV6 de 15 acides aminés.

I. Génération et validation d'anticorps anti-TRPV6 et leurs utilisations dans le diagnostic du cancer de la prostate et dans des applications *in vitro*

Les données présentées ci-dessous feront l'objet d'un article intitulé : « Generation and validation of the anti-TRPV6 channel antibody and its use in cancer diagnosis applications *in vitro* ».

Résumé des données obtenues :

Au début des années 2000, beaucoup d'études sur l'expression du canal TRPV6 dans divers tissus ont été réalisées montrant notamment une surexpression dans de nombreuses pathologies telles que le cancer. Cependant, des outils spécifiques pour la détection de TRPV6 dans les cellules et divers tissus manquaient encore.

Dans cet article, nous avons généré et validé 4 anticorps polyclonaux de lapin (rb79, rb80, rb81 et rb82) dirigés contre des épitopes spécifiques à TRPV6 de 15 acides aminés. Sur l'ensemble de ces anticorps, seul l'un d'entre eux, rb79, a été capable de détecter la forme complète glycosylée du canal TRPV6 aux alentours de 100kDa.

Des études ont été réalisées permettant de valider l'utilisation de cet anticorps dans toutes les applications *in vitro* tels que immunoblotting, immunoprecipitation, immunocytochimie, immunofluorescence etc... Une des applications les plus importantes de cet anticorps est l'immunohistochimie en utilisant des sections paraffinées issues de résection de cancer. En utilisant ces résections de cancer de la prostate, nous avons confirmé l'absence de TRPV6 dans des tissus sains mais aussi dans les HBP et son expression a été corrélée aux différents grades du cancer de la prostate (score de Gleason), comme il avait déjà été identifié auparavant grâce au northern blot et à la PCR. Ainsi, l'anticorps polyclonal anti-TRPV6 (rb79) est utilisable pour toutes les applications *in vitro* de diagnostic et particulièrement pour le diagnostic clinique en

utilisant des sections paraffinées issues de patients souffrant de nombreuses maladies où le canal TRPV6 est impliqué.

1) Génération de 4 anticorps polyclonaux de lapin

La séquence entière de la protéine TRPV6 (disponible sur UniProt <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H1D0>) a été analysée et 4 épitopes uniques couvrant des domaines distincts comme la partie N-terminale, la 1^{ère} boucle extracellulaire, le pore et la partie C-terminale du canal TRPV6 ont été désignés pour générer des anticorps polyclonaux de lapin (Figure 1A-B). Les antigènes ont été synthétisés et les anticorps polyclonaux de lapin générés en utilisant un programme « AS-SMAF-SINGLE Rabbit – Speedy 28 days ». Les anticorps générés ont été nommés comme suit : rb80 pour l'anticorps ciblant la partie N-terminale, rb79 pour l'anticorps ciblant la 1^{ère} boucle extracellulaire, rb82 pour l'anticorps ciblant le pore et rb81 pour l'anticorps ciblant la partie C-terminale. Les analyses ELISA pour le sérum pré-immun (PPI), saignement large (GP), saignement final (SAB) et anticorps purifiés (PA) de rb79, rb80 et rb81 sont montrées dans les figures 1C-E. Les mêmes analyses ELISA sur deux lapins pour le pore du canal est montré dans les figures 1F-G. A cause de la complexité et la faible antigénicité de l'antigène du pore, le meilleur lapin (Figure 1F) a été choisi pour un plus long programme de 87 jours avec des boosts additionnels quotidiens. Les analyses finales ELISA du sérum (S), du surnageant (FT) et des anticorps purifiés (PA) est montré dans la figure 1H. L'anticorps ainsi obtenu a été nommé rb82.

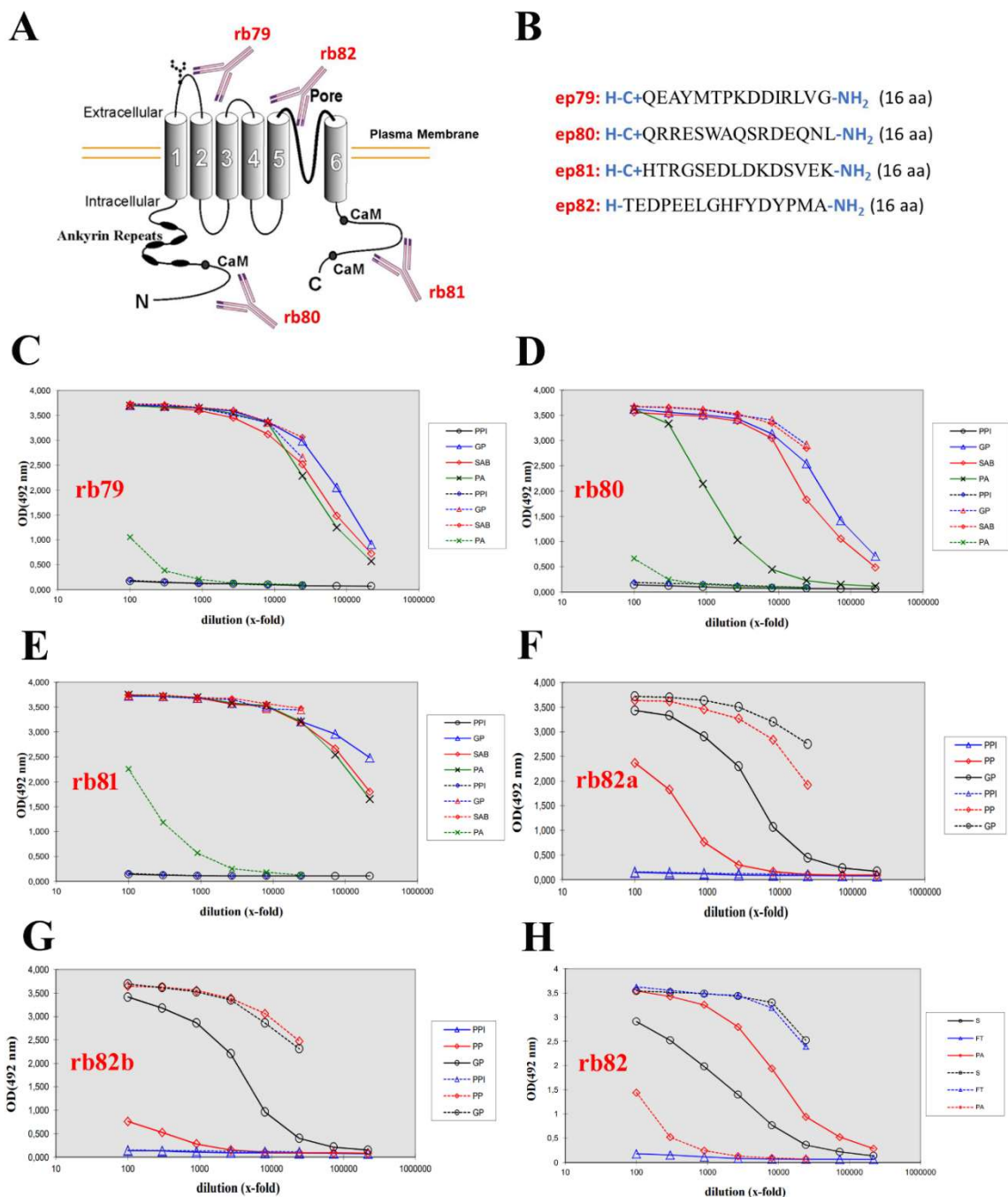


Figure 1. Design et immunotransferts de différents anticorps polyclonaux de lapin anti-TRPV6.

A. Schéma général du canal TRPV6 et position relative des épitopes pour les quatre anticorps, 79-82 (image du canal issu de <http://atlasgeneticsoncology.org/>). *B.* Les épitopes correspondant utilisés pour générer des anticorps anti-TRPV6, où la cystéine est utilisée pour coupler avec la protéine KLH. *C-H.* Analyses ELISA utilisant les peptides immobilisés. PPI – sérum pré-immun, GP – saignement, SAB – saignement final, PA – anticorps purifiés, PP –

petit saignement, S – sérum, FT – surnageant. Ligne pleine – peptide ; ligne discontinue – transporteur. C. Analyse ELISA de l'anticorps rb79. D. Analyse ELISA de l'anticorps rb80. E. Analyse ELISA de l'anticorps rb81. F. Analyse ELISA de l'anticorps rb82a (lapin 2358). G. Analyse ELISA de l'anticorps rb82b (lapin 2359). H. Saignement final et purification d'anticorps suivis d'une analyse ELISA de l'anticorps rb82.

2) Révélation de l'expression protéique de TRPV6 avec les anticorps polyclonaux de lapin

Les quatre anticorps générés ont d'abord été examinés en réalisant des immuno-empreintes ou SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Figure 2). Dans nos expériences, nous avons utilisé un panel de différentes lignées cellulaires cancéreuses connues pour exprimer TRPV6 (Raphaël et al. 2014a) comme LNCaP, DU-145, PC-3 et PC-3M.

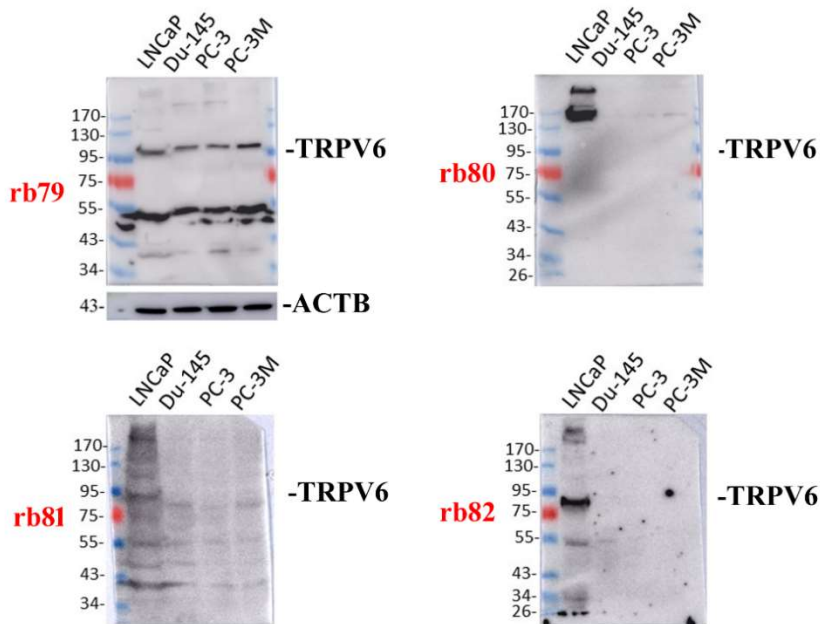


Figure 2. Immuno-empreintes des anticorps polyclonaux de lapin rb79-rb82 dans différentes lignées cellulaires.

Immuno-empreinte des lysats totaux des cellules LNCaP, DU-145, PC-3 et PC-3M en conditions dénaturantes révélés avec les anticorps polyclonaux de lapin anti-TRPV6 rb79-rb82.

L'immuno-empreinte des lysats totaux des cellules LNCaP, DU-145, PC-3 et PC-3M, révélé avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-TRPV6 rb79 a montré une taille attendue de la forme glycosylée de la protéine aux alentours de 95-100 kDa alors que la taille théorique de la protéine non glycosylée est d'environ 87,3 kDa (Figure 1A). De plus, une bande d'environ 50 kDa a été détectée qui s'est montrée par la suite être aspécifique, n'étant pas présente dans la co-immunoprécipitation (Figure 3G).

L'immunoempreinte des mêmes lysats totaux révélée avec l'anticorps polyclonal de lapin rb80 sur les mêmes lignées cancéreuses a montré une bande de haut poids moléculaire aux alentours de 160 kDa uniquement dans les cellules LNCaP (Figure 2). L'immunoempreinte avec l'anticorps rb81 a montré une multitude de bandes dans les cellules LNCaP, y compris une bande inférieure à 95 kDa. Cependant, la présence d'une traînée soulève des doutes quant à la spécificité de cet anticorps vis-à-vis du canal TRPV6.

Enfin, l'anticorps rb82 a montré une bande de 80 kDa exclusivement dans les cellules LNCaP qui est en-dessous de la protéine non glycosylée théorique attendue d'environ 87,3 kDa.

Selon les données obtenues, l'utilisation de tous les anticorps en western blot a été rejetée car ils ne montrent pas la taille attendue de la protéine monomérique et/ou la qualité de la détection est insuffisante à l'exception de l'anticorps rb79.

Pour poursuivre la validation des anticorps, quatre siARN ont été utilisés dans nos études pour réaliser une répression spécifique du canal TRPV6. La liste des séquences des siARN utilisés est indiquée dans le Tableau 1. Elles ciblent le 1^{er}, le 7^{ème}, le 11^{ème} et le 13^{ème} exon de l'ARNm. Tout d'abord, la PCR quantitative en temps réel du canal TRPV6 a été réalisée dans les cellules LNCaP transfectées soit avec 40 nM de siARN contrôle (luciférase) soit avec 40 nM de siARN 1 à 4 dirigés contre TRPV6 par rapport à l'expression du gène HPRT (Figure 3A). L'efficacité de la répression de TRPV6 au niveau de l'ARNm était de plus de 60% ce qui correspond à l'immuno-empreinte des lysats protéiques de cellules LNCaP traitées avec les différents siARN où la quantification des bandes spécifiques à TRPV6 par rapport à AKTB montre une diminution de l'expression de TRPV6 du même ordre de grandeur (Figure 3B).

Dans l'étape suivante, nous avons utilisé un système de surexpression de TRPV6. Il faut savoir qu'il est extrêmement difficile d'avoir un système cellulaire *in vitro* qui n'exprime pas le canal TRPV6 puisque la présence de 2mM de calcium dans la plupart des milieux utilisés rend l'expression de TRPV6 avantageuse pour la survie cellulaire. Nos données montrent une augmentation (variant de légère à forte) de l'expression de TRPV6 (Figure 3C) suggérant que

la bande à 100 kDa est spécifique au canal TRPV6.

De plus, nous avons vérifié si, dans la nouvelle lignée cellulaire HAP-1^{trpv6^{-/-}}, l'expression du canal TRPV6 était abolie. Étonnamment, une faible bande était encore présente à la taille attendue du canal TRPV6 (Figure 3D). Lors de l'analyse de la séquence de l'épitope de l'anticorps rb79, il a été conclu qu'il y avait 4 mésappariements entre cette séquence et la séquence homologue de l'analogue proche de TRPV6, le canal TRPV5. Sachant que ces canaux ont une forte homologie à la fois au niveau peptidique et nucléotidique (puisque ce sont les produits de la duplication d'un même gène dans l'évolution (J. B. Peng et al. 2000a), nous avons d'abord conçu un couple discriminant d'amorces permettant la détection de TRPV6 ou TRPV5 de manière spécifique et les avons testés (Figure 3E). Curieusement, en vérifiant le modèle de lignée cellulaire, HAP-1^{trpv6^{-/-}}, nous avons remarqué une extinction complète de l'ARNm de TRPV6 (via le système NMDA de désintégration de l'ARNm non-sens) mais aussi la surexpression du canal TRPV5 (Figure 3F). Nous avons donc émis l'hypothèse que la surexpression du canal TRPV5 au lieu du canal TRPV6 permettrait une liaison légère de l'anticorps rb79 avec TRPV5. Cette liaison doit être extrêmement faible comme visible dans l'expérience d'immuno-empreinte en raison de la haute sensibilité de la réaction ECL (Enhanced Chemo Luminescence) utilisée pour révéler le signal.

Finalement, une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps rb79 a été réalisée pour confirmer l'utilisation de cet anticorps ainsi que pour voir si l'on peut enrichir la quantité de TRPV6. Comme le montre la figure 3G, l'immunoprécipitation des lysats cellulaires de LNCaP à l'aide de rb79 (ou rb79 enrichi) donne clairement deux bandes correspondant à la fois aux formes glycosylées et non glycosylées du canal TRPV6. Fait intéressant, la bande vue sur le blot de la Figure 2 à environ 50 kDa disparaît prouvant que cette bande est aspécifique à TRPV6.

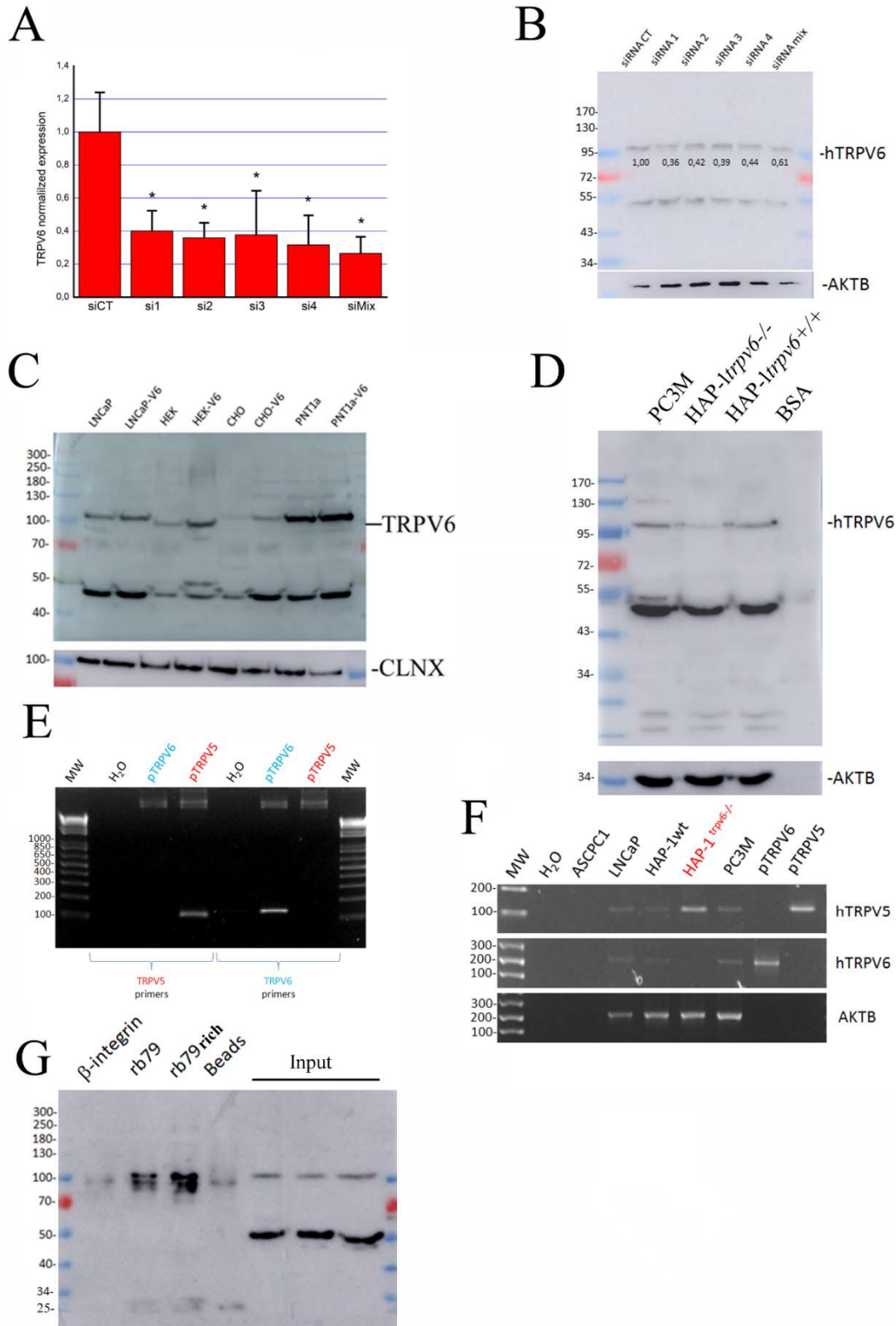


Figure 3. Validation de l'anticorps rb79 utilisant des modèles de répression, de surexpression et des modèles KO.

A. PCR quantitative en temps réel du canal TRPV6 dans les cellules LNCaP transfectées avec soit 40nM de siARN contrôle (luciférase) soit avec 40nM de siARN 1 à 4 contre le canal TRPV6 comparée à l'expression de HPRT (voir Tableau 1 pour les amorces). B. Immuno-empreinte des lysats protéiques issus de cellules LNCaP traitées avec des siARN dans les mêmes conditions qu'en A. et quantification des bandes comparées à AKTB. C. Transfection du canal TRPV6 avec le vecteur vEF1ap-5'UTR-TRPV6_CMVp-mCherry dans les lignées cellulaires LNCaP, HEK, CHO et PNT1a et immuno-empreintes correspondantes. D. Expression protéique de TRPV6 dans les modèles cellulaires PC-3M, HAP-1^{trpv6-/-} et HAP-1^{trpv6+/+} révélée avec l'anticorps rb79 et comparée à l'expression de AKTB. E. PCR semi-quantitative utilisant des amorces discriminatives de TRPV6 et TRPV5 listées dans le Tableau 1 à la fois sur le plasmide pTRPV6 et pTRPV5. F. PCR semi-quantitative utilisant les mêmes amorces discriminatives qu'en E. pour détecter les transcrits de TRPV6 et TRPV5 dans de nombreuses lignées cellulaires incluant HAP-1^{trpv6-/-} ainsi que les plasmides correspondants comme contrôles positifs comparée à l'expression de AKTB. G. Immunoprécipitation de lysats totaux issus de cellules LNCaP utilisant anti-β-intégrine, rb79 et une condition enrichie en rb79, avec des billes en contrôle négatif. Le blot a été révélé avec rb79.

3) Existe-t-il des variants d'épissage de la protéine TRPV6 dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP ?

Pour savoir si les bandes supplémentaires vers 50 kDa ne sont pas des formes alternatives ou des variants d'épissage, nous avons effectué un ARN profiling de notre ADNc. Le gène de TRPV6 est situé sur le chromosome 7 locus 33-34 et se compose de 15 exons (Figure 4A). Notre idée était ici de concevoir dans chaque exon une amorce soit vers l'avant soit vers l'arrière et en les croisant les unes avec les autres pour voir s'il peut y avoir des épissages, des délétions, des insertions etc. Tous les couples d'amorces et les tailles d'amplicons attendus sont indiqués dans le Tableau 2. Nous avons utilisé un plasmide vEF1ap-5'UTR-TRPV6_CMVp-mCherry contenant la partie 5'-UTR de TRPV6 comme précédemment reporté (Fecher-Trost et al. 2013a) comme contrôle (Figure 4B). Tous les couples d'amorces et les combinaisons de ceux-ci ont été validés. Ensuite, l'ADNc de la lignée cellulaire LNCaP a été testée et a montré la forme entière de l'ARNm de TRPV6 (Figure 4B) suggérant que les bandes supplémentaires révélées par les anticorps ne sont pas spécifiques à TRPV6.

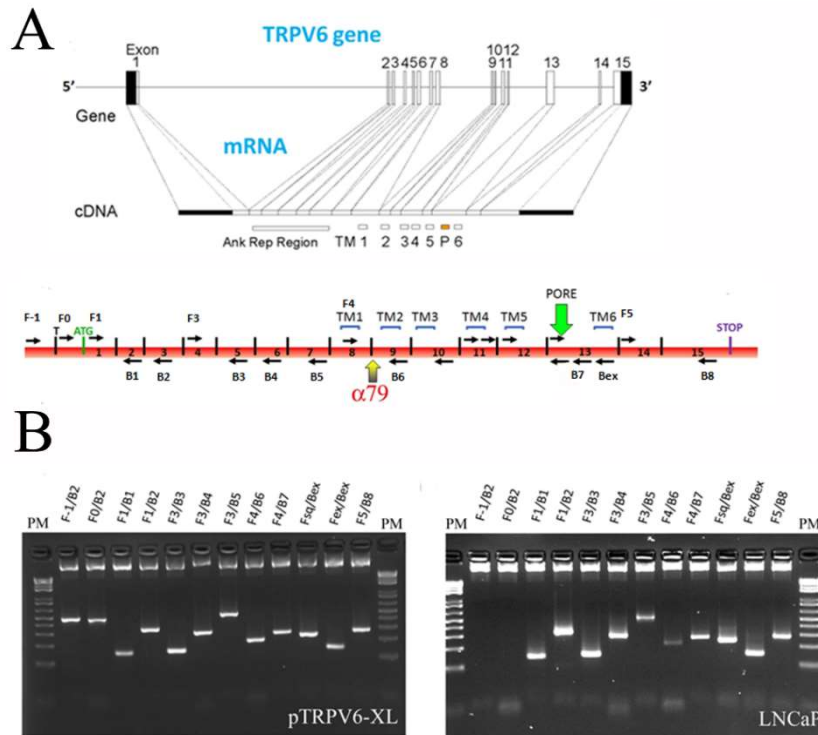


Figure 4. ARN profiling de l'ARNm du canal TRPV6.

A. Schéma général du gène *trpv6* avec la position relative des introns et exons et les variants épissés finaux de TRPV6 (Schéma issu de <http://atlasgeneticsoncology.org/>) avec la position des amorces listées dans le tableau 2. **B.** ARN profiling utilisant les différentes amorces générées et leurs tailles attendues du Tableau 2 utilisant le vecteur *vEF1ap-5'UTR-TRPV6_CMVp-mCherry* seul (panel de gauche) et l'ADNc total issu de cellules LNCaP (panel de droite).

4) Utilisation de l'anticorps polyclonal de lapin rb79 dans des expériences d'immunofluorescence et FACS

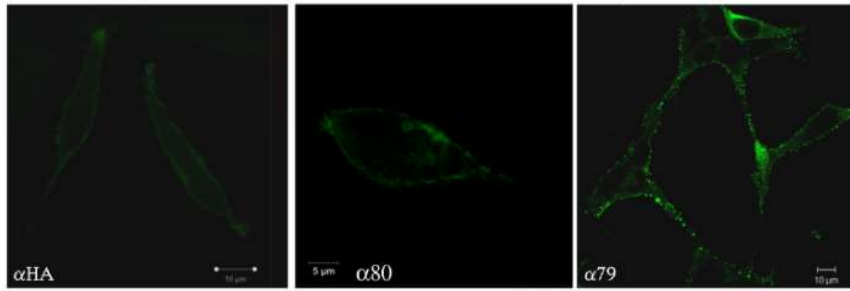
Comme l'anticorps polyclonal de lapin rb79 possède un épitope extracellulaire, nous avons initialement essayé de détecter le canal TRPV6 sur la surface externe de la membrane plasmique à l'aide de la microscopie confocale. Les cellules ont été fixées mais non perméabilisées avec la saponine permettant la coloration exclusive de la membrane plasmique (Figure 5A). Dans nos expériences, deux anticorps de contrôle ont été utilisés : un anticorps polyclonal de lapin anti-HA ayant le même isotype et l'anticorps polyclonal de lapin anti-TRPV6 rb80 qui cible

l'extrémité N-terminale du canal TRPV6 qui se trouve dans la partie intracellulaire. Comme on peut le voir dans la Figure 5A, rb79 est capable de marquer les canaux TRPV6 présents à la membrane plasmique à la surface des cellules LNCaP.

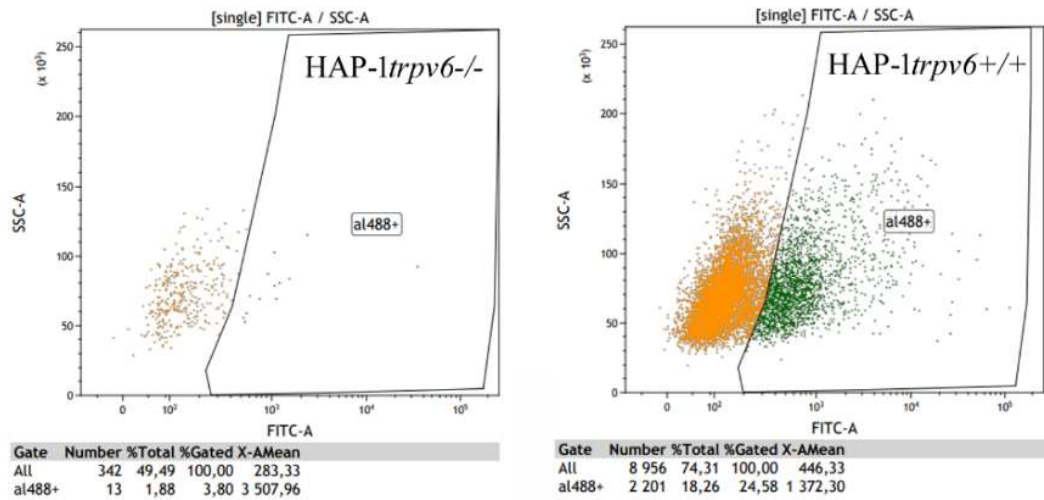
L'expérience supplémentaire de FACS a été réalisée sans perméabilisation. Le modèle cellulaire HAP-1^{trpv6^{-/-}} a été comparé aux cellules HAP-1^{trpv6^{+/+}} (Figure 5B). Les cellules HAP-1^{trpv6^{+/+}} semblent contenir 24,58% de cellules exprimant TRPV6 à la membrane plasmique contre 3,8% dans les cellules HAP-1^{trpv6^{-/-}}.

La méthode établie pour tester la spécificité des anticorps dans les expériences d'immunofluorescence consiste à transfecter les cellules avec la protéine de fusion, c'est-à-dire le canal TRPV6 couplé au marqueur fluorescent : pTRPV6-YFP. Une fois transfectées, les cellules sont fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire (rb79) suivi de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 546. De plus l'analyse de la colocalisation se fait à l'aide du logiciel spécifique au microscope Zeiss Zen. Le coefficient de colocalisation moyen entre les signaux rouges et verts est indiqué en %. Dans notre expérience, nous avons utilisé un plasmide contrôle contenant la séquence du canal calcique Orai1 fusionné à la protéine YFP. Comme on peut le voir sur la figure 5C, la différence est significative (70% contre 18%). Cet écart résiduel dans l'excès du signal rouge s'explique par la présence naturelle du canal TRPV6 dans les cellules LNCaP. Ainsi, l'anticorps rb79 convient à la fois aux expériences d'immunofluorescence et au FACS.

A



B



C

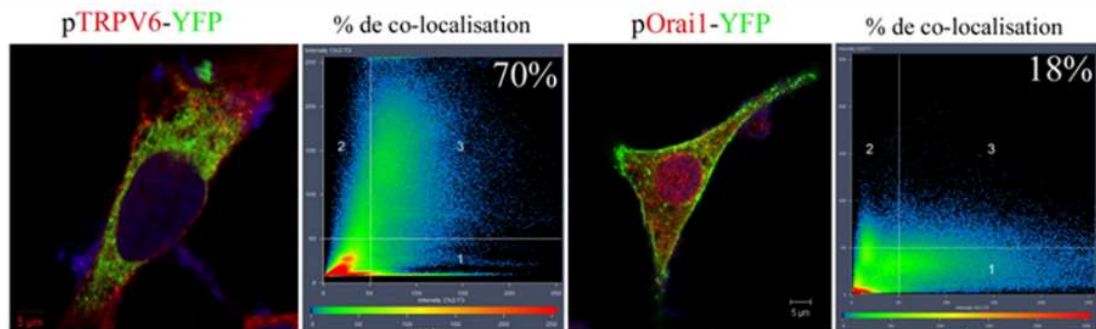


Figure 5. Marquage du canal TRPV6 à la membrane plasmique par l'anticorps rb79.

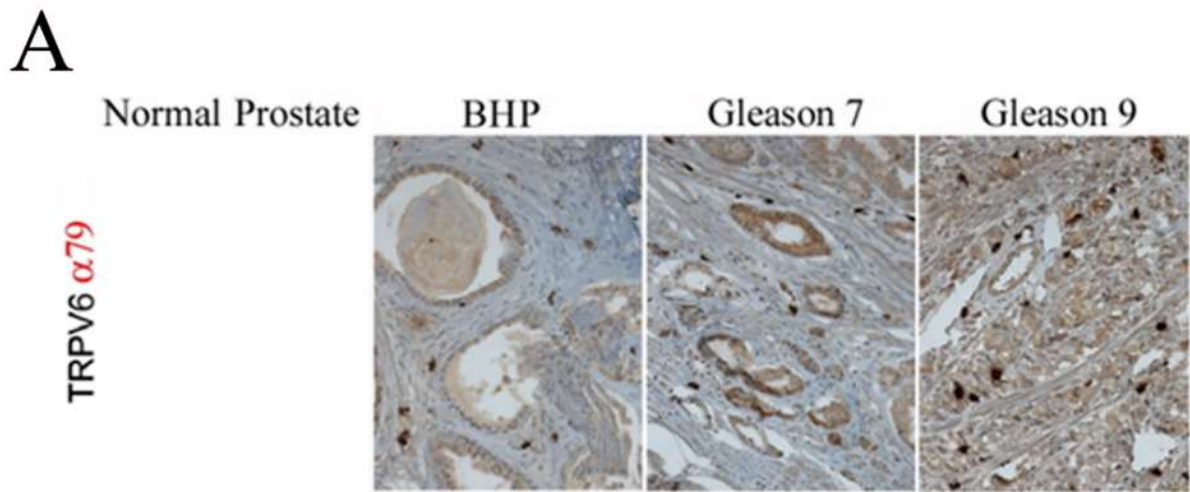
A. Signal d'immunofluorescence de cellules LNCaP non perméabilisées et fixées avec 3,5% de paraformaldehyde issues de traitement avec soit un anticorps polyclonal de lapin anti-HA, l'anticorps anti-TRPV6 rb80 (épitope N-terminal) soit avec rb79. B. Expression membranaire de TRPV6 marquée par rb79 dans des cellules non perméabilisées HAP-1^{trpv6}^{-/-} (gauche) et HAP-1^{trpv6}^{+/+} (droite) en utilisant le cytomètre en flux FACScan (Becton-Dickinson, San Jose,

CA). C. Signal d'immunofluorescence de cellules LNCaP fixées avec 3,5% de paraformaldehyde et perméabilisées avec de la saponine, transfectées avec soit le plasmide pTRPV6-YFP (gauche) soit avec pOrail-YFP (droite). Chaque condition a été traitée avec rb79 suivi du marquage par un anticorps secondaire AlexaFluor546 (rouge). Le coefficient moyen de chevauchement entre les signaux rouges (TRPV6) et verts (YFP) est montré en % sur le coin droit.

5) Utilisation de l'anticorps rb79 dans le diagnostic et le pronostic en clinique

Sur quatre anticorps générés, seul l'anticorps polyclonal de lapin rb79 a produit une coloration stable et claire des cellules épithéliales cancéreuses de la prostate. Cet anticorps a été utilisé pour effectuer des expériences d'immunohistochimie (IHC) en utilisant 21 échantillons cliniques humains provenant d'échantillons de résection de la prostate (Figure 6). Six cas de prostate normale (échantillons issus de résection du cancer de la vessie), six cas d'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP), six adénocarcinomes avec un score de Gleason 7 (3+4) et trois avec un score de Gleason 9 (4+5). L'analyse de fréquence (nombre de cas positifs par rapport au total) et d'intensité d'expression (trois niveaux d'intensité choisis) sur les échantillons cliniques est représentée sur la figure B. Nos données confirment l'absence d'expression de TRPV6 dans la prostate saine et un léger marquage dans la moitié des échantillons de HBP correspondant aux données publiées auparavant (Wissenbach et al. 2004a; J. B. Peng et al. 2000a; Raphaël et al. 2014a).

L'expression du canal TRPV6 a également été corrélée à l'expression des marqueurs d'agressivité tels que Ki-67, PSA, chromogranine A, CD31, CD56, synaptophysine, etc (raphael et al, 2014). On peut en conclure ici que l'anticorps polyclonal rb79 peut être utilisé à des fins de diagnostic mais aussi potentiellement à des fins de pronostic. De plus, rb79 a été utilisé pour effectuer des IHC de tumeurs dérivées de xénotreffes des cellules HAP-1 *trpv6^{-/-}* et HAP-1 *trpv6^{+/+}* (Figure 6C). Comme on peut le voir, l'anticorps rb79 ne détecte rien dans les cellules HAP-1 *trpv6^{-/-}* validant à la fois le modèle KO et la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de TRPV6.



B

TRPV6 ab79 Case Expression

(positive cases per total)

Healthy	BHP	Gleason 7	Gleason 9
0/6	3/6	6/6	3/3

TRPV6 ab79 Expression Intensity

(+ weak; ++ moderate; +++ strong)

Healthy	BHP	Gleason 7	Gleason 9
-	+	+++	++

C



HAP-1^{trpv6-/-}



HAP-1^{trpv6+/+}

Figure 6. Détection du canal TRPV6 dans des échantillons humains cliniques par rb79.

A. IHC d'échantillons humains marquée avec rb79 issus de résections de prostate dans le cas de prostate normale (résection de cancer de la vessie), d'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) et d'adénocarcinome de score de Gleason 7 et 9. B. Analyse statistique utilisant une

cohorte de 21 patients du nombre de cas exprimant TRPV6 et de l'intensité d'expression dans des échantillons cliniques à l'aide de rb79. C. IHC de coupes de tumeurs dérivées de xénogreffes de cellules HAP-1 ^{trpv6-/-} (gauche) et HAP-1 ^{trpv6+/+} (droite) dans des souris nude immunodéficientes.

Tableau I
Amorces et siARN

No	Name, Accession No	Forward (5'-...- 3')	Backward (5'-...- 3')	Expected Size (b.p)
1.	TRPV6, NM_018646	CCCTCAGTGTCTCGAA GTAC	TCAGATCTGATATTCCC AGCTC	134
4.	TRPV6, NM_018646	<i>CCCAAGGAGAAAGGGC TAAT</i>	<i>TTGGCAGCTAGAAGGAGA GG</i>	145
2.	TRPV5, NM_019841	TCTTCCAACCTCCTCC CTG	CCTCACTAAGGTTTCAGT CCAAG	115
3.	AKTB, NM_001101	CAGAGCAAGAGAGGC ATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACA TGATC	209
4.	HPRT, NM_000194	GGCGTCGTGATTAGTG ATGAT	CGAGCAAGACGTTTCAGT CCT	134
5.	TRPV6 siRNA-1	5'- CCUGCUGCAGCAGAAGAGG (dTdT)-3'		
6.	TRPV6 siRNA-2	5'- GACUCUCUAUGACCUCACA (dTdT)-3'		
7.	TRPV6 siRNA-3	5'- CGUCAUGUACUUCGCCCCGA (dTdT)-3'		
8.	TRPV6 siRNA-4	5'- CCUCCUCAUUGCCAUGAUG (dTdT)-3'		
9.	siLuciferase, AB_490793	5'-CUUACGCCUGAGUACUUCGA(dTdT)-3'		

Tableau 2

Amorces pour l'ARN profiling de TRPV6

Target	Accession number	Technique used	F1 or B1
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex1-F-1 : AAGGCAGGAGACAGGAGAC
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex1-F0 : GACCTCTACAGGGAGACGG
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex3-B2 : CATAGAGCTCAGATGTCATGG
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex4-F3 : CAGAACATGAACCTGGTGC
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex5-B3 : CGATCTCCTCACTGTTTACA
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex6-B4 : CTGTCGTAGGACAGCAACAG
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex7-B5 : GGTGGTGATGATAAGTTCCAG
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex8-F4 : GGTGCCATATATCTGCTGTAC
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex9-B6 : CTACCAGCAGGATGATGATAG
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex10-B7 : GGATGGTCTGTCCAAAGAAG
TRPV6	NM_018646	AP	V6-ex11-Fsq : GGCTGGTGCAACGTCATGTAC

TRPV6	NM_0186 46	AP	V6-ex12-Fex : ATTCTGCTGGCTGATGGC
TRPV6	NM_0186 46	AP	V6-ex13-Bex : CGATGATGGTAAGGAACAGC
TRPV6	NM_0186 46	AP	V6-ex14-F5 : TTGTGGCCACCACGGTG
TRPV6	NM_0186 46	AP	V6-ex15-B8 : AGGTACTIONTCGAGACACTGAGG

Taille attendue des amplicons de PCR

Primers	Expected size, bp	Targeted Exon/span
F-1/B2	480	(5'-UTR)-2
F0/B2	460	(5'-UTR)-2
F1/B1	150	1-2
F1/B2	330	1-2-3
F3/B3	150	4-5
F3/B4	290	4-5-6
F3/B5	500	4-5-6-7
F4/B6	210	8-9
F4/B7	260	8-9-10
Fsq/Bex	240	11-12
Fex/Bex	150	12-13
F5/B8	280	14-15

Tableau 3**Liste d'anticorps et leur épitope**

Et conditions d'utilisation en immunoempreinte et IHC

Antibody	Design/Manufacturer	Clone	Epitope	Dilution	Pretreatment IHC	Incubation IHC
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb79	QEAYMTPKDDI RLVG	1/200 IHC 1/500 WB	CC2 STD	32 min
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb80	QRRESWAQSRD EQNL	1/500 WB		
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb81	HTRGSEDLDKD SVEKL	1/500 WB		
TRPV6	Design : Dr. LEHEN'KYI, produced : EUROGENTEC, LTD, Belgium	rb82	TEDPEELGHFYD YPMA	1/500 WB		

II. Le ciblage du canal calcique TRPV6 par des anticorps polyclonaux dirigés contre l'épitope extracellulaire induisent l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques

Les données présentées ci-dessous feront l'objet d'un article intitulé : « TRPV6 calcium channel targeting by polyclonal antibodies raised against extracellular epitop induces cancer cell apoptosis »

Résumé des résultats obtenus :

De plus en plus de preuves suggèrent que la surexpression du canal calcique TRPV6 est un événement commun dans les cancers d'origine épithéliale. Il a été observé que TRPV6 était surexprimé dans des tissus provenant de tumeurs de l'ovaire, la prostate, le sein, la thyroïde, le colon et le pancréas. En dépit de la découverte de son rôle crucial dans la prolifération cellulaire cancéreuse et dans la survie *in vitro*, aucun outil efficace ciblant le canal TRPV6 *in vivo* n'a été reporté à ce jour afin d'être utilisé comme thérapie efficace contre ces cancers.

Dans cet article, nous avons généré 2 anticorps dirigés contre des épitopes extracellulaires ciblant la boucle extracellulaire entre les domaines transmembranaires S1 et S2 ainsi que la région du pore du canal. Ces 2 anticorps sont capables de moduler l'activité du canal TRPV6 à la membrane plasmique en modifiant le courant de l'entrée calcique (démonstré par la technique de Patch Clamp) et en altérant le signal de l'entrée calcique (montré par la technique d'imagerie calcique), ce qui amène à l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro* (démonstré par la technique de TUNEL). Les études préliminaires sur les mécanismes d'action des 2 anticorps semblent pourtant différent. En effet, par biotinylation membranaire, nous avons montré que l'anticorps rb79 permettant d'augmenter l'expression de TRPV6 à la membrane en modifiant potentiellement son recyclage à la membrane. L'ensemble des données obtenues montrent clairement la perspective de l'utilisation d'anticorps ciblant TRPV6 à des fins thérapeutiques dans les pathologies où TRPV6 est impliqué.

1) Design et validation des anticorps dirigés contre les épitopes extracellulaires du canal TRPV6

Quatre anticorps polyclonaux ont été générés contre la partie extracellulaire du canal TRPV6 (79a-c et 82). La 1^{ère} boucle entre les domaines transmembranaires S1 et S2 et la région du pore du canal ont été étudiés (Figure 7A). Pour le design des séquences peptidiques, la position relative à la membrane plasmique, la bicouche lipidique, les sites de glycosylation ainsi que la structure 3D déjà disponible du canal TRPV6 ont été pris en compte (Saotome et al. 2016) (Figure 7B). 37 acides aminés couvrent la 1^{ère} boucle extracellulaire située entre les domaines transmembranaires S1 et S2 (Figure 7A et B). Des analyses détaillées utilisant le logiciel NetNGlyc 1.0 ont montré les deuxième et troisième sites les plus probables de N-glycosylation, RTNNRT et RDNTL (Figure 7B). La présence de ces sites et leur N-glycosylation empêcheront l'accès stérique potentiel à l'épitope par l'anticorps. D'un autre

côté, la bicouche lipidique empêchera l'anticorps de se lier aux acides aminés respectifs de l'épitope. L'immuno-empreinte des lysats totaux des cellules LNCaP, DU-145, PC-3 et PC-3M révélée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-TRPV6 rb79 a montré une taille attendue de la forme glycosylée de la protéine autour de 95-100 kDa tandis que la séquence peptidique non modifiée est d'environ 84 kDa ainsi qu'une bande aspécifique d'environ 50 kDa (Figure 7C). Des anticorps dirigés contre l'épitope 79, seul 79a a été retenu pour les expériences ultérieures (appelé rb79). Quant à l'épitope 82, les résultats n'étaient pas satisfaisants (montrant probablement des dimères de TRPV6) mais étant le seul anticorps disponible, il a été retenu pour d'autres expériences (Figure 7D).

Comme les anticorps sont censés agir de manière extracellulaire, une expérience d'immunofluorescence avec 15min de préincubation suivie d'une fixation avec PAF à 3,5% sans aucune perméabilisation a été réalisée (Figure 7E). Un anticorps polyclonal de lapin anti-HA a été utilisé comme contrôle. Les données montrent clairement une liaison membranaire spécifique pour l'anticorps rb79. Etant donné que le marquage n'était pas convaincant pour l'anticorps rb82, une analyse logicielle des intensités de pixels dans la zone membranaire sélectionnée a été réalisée. Le rapport indiqué montre la spécificité du signal par rapport à l'arrière-plan adjacent (Figure 7E). L'intensité de la coloration était beaucoup plus forte pour rb82 par rapport à l'anticorps contrôle anti-HA mais toujours deux fois inférieure à celle de rb79. De plus, le co-marquage contrôle avec un marqueur de membrane plasmique tel que la cholera toxine (CTX) marquant les lipides G2M a été réalisé pour prouver une localisation au niveau de la membrane plasmique du canal TRPV6 (Figure 8). Ainsi, ces deux anticorps anti-TRPV6, rb79 et rb82 ont été choisis pour être utilisés dans d'autres expériences fonctionnelles.

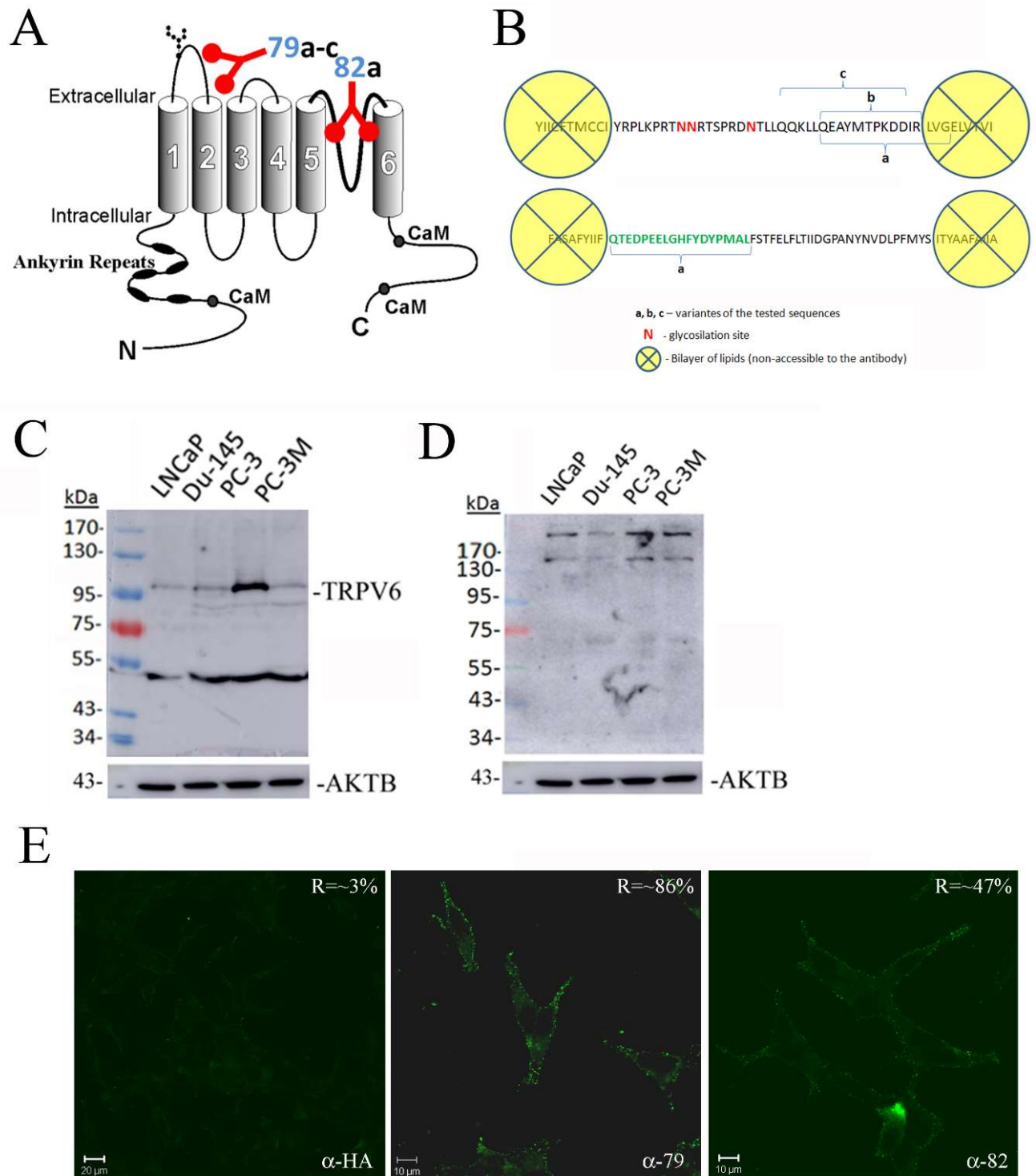


Figure 7. Design et validation de deux anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre le canal TRPV6.

A. Schéma général du canal et position relative des épitopes pour les deux anticorps 79 et 82 (image du canal issue de <http://atlasgeneticsoncology.org/>) B. Diagramme avec les positions des acides aminés dans les domaines transmembranaires S1 et S2 et les positions des acides

aminés dans les domaines transmembranaires S5 et S6, les variants d'épitope (a-c) et les sites de glycosylation (N). **C.** Immuno-empreinte des lysats totaux des cellules LNCaP, DU-145, PC-3 et PC-3M révélée avec l'anticorps polyclonal anti-TRPV6 rb79. **D.** Immuno-empreinte des lysats totaux de cellules LNCaP, DU-145, PC-3 et PC-3M révélée avec l'anticorps polyclonal anti-TRPV6 rb82. **E.** Expérience d'immunofluorescence des cellules LNCaP prétraitées avec les anticorps polyclonaux de lapin anti-HA et anti-TRPV6 rb79 et rb82 puis fixées avec 3,5% de paraformaldehyde sans perméabilisation et révélées avec l'anticorps anti-TRPV6 rb79. Le rapport indiqué dans le coin supérieur droit montre la spécificité du signal de coloration par rapport au fond.

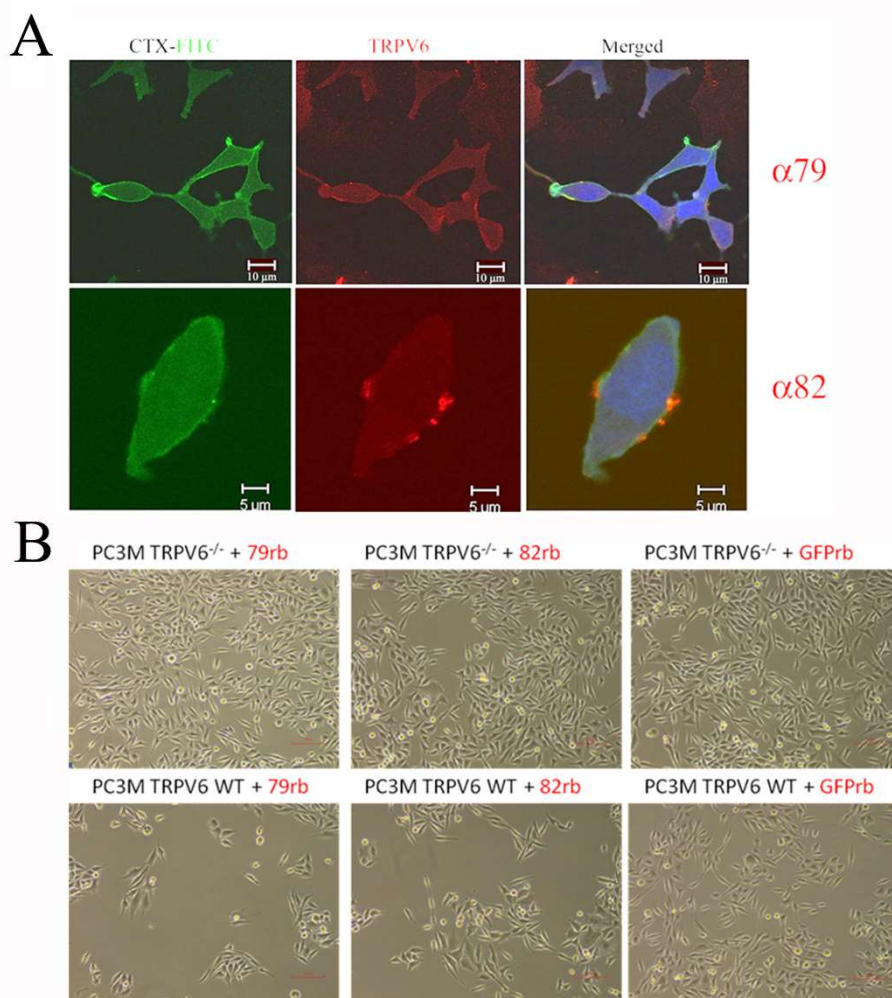


Figure 8. Expression membranaire de TRPV6 mise en évidence par marquage avec les anticorps rb79 et rb82 en immunofluorescence.

2) Des traitements avec les anticorps augmentent l'entrée capacitive de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques

TRPV6 a été montré comme un élément important de l'entrée SOCE (Store-operated calcium entry) dans les cellules cancéreuses prostatiques permettant l'utilisation de ce mécanisme pour détecter et analyser l'activité du canal TRPV6 (Raphaël et al. 2014a). Ce mécanisme est déclenché par la vidange des réserves de calcium dans le réticulum endoplasmique (RE). L'inhibition de la pompe SERCA avec la thapsigargine (1 μ M) est utilisée pour induire une fuite de calcium du RE vers le cytosol, ce qui va vider les réserves de calcium et ainsi activer les canaux SOC (store-operated channels) comme Orai1, TRPC1 etc qui à leur tour activeront le canal TRPV6 prenant une part importante dans l'amplification de l'entrée de calcium à l'intérieur des cellules (Raphaël et al. 2014a)(Figure 9A).

Pour le protocole, les cellules sont d'abord incubées avec la solution ne contenant pas de calcium afin de créer un gradient vers l'extérieur qui est amplifié par l'utilisation de thapsigargine bloquant les pompes SERCA et ne permettant ainsi pas au calcium d'être recapté dans le RE. Cette condition artificielle créera un grand manque de calcium, crucial pour la survie cellulaire et recrutera les canaux SOC. L'ajout de 2mM de calcium assurera une entrée de calcium via les SOC qui, à leur tour, activeront TRPV6.

La préincubation de cellules cancéreuses prostatiques LNCaP pendant 5min avec soit du glycérol (CT), soit des anticorps polyclonaux anti-HA ou anti-TRPV6 rb79 et rb82 (normalisés à 0,5 μ g/ μ L) à des dilutions de 1/500, a conduit à des effets différentiels tels qu'une augmentation significative de l'entrée capacitive de calcium avec traitement par rb79 et rb82 (Figure 9C). Pour prouver que ces effets sont médiés par le canal TRPV6, les résultats ont été confirmés en utilisant une stratégie de siARN afin de réprimer TRPV6. Ainsi, le SOCE a été significativement diminué lors de la répression du canal TRPV6 (Figure 9D) et l'augmentation du SOCE médiée par l'anticorps rb79 (siTRPV6 + rb79) a été significativement atténuée par rapport au contrôle (siCT + rb79) (Figure 9E). Les mêmes données ont été obtenues en prétraitant avec l'anticorps rb82 qui a pu augmenter de manière significative le SOCE (Figure 9F). De même, l'utilisation de siARN diminue l'entrée SOCE induite par rb82 (Figure 9G). Ainsi, les 2 anticorps rb79 et rb82 activent TRPV6 qui amplifie le SOCE et laisse entrer une plus grande quantité de calcium à l'intérieur des cellules LNCaP.

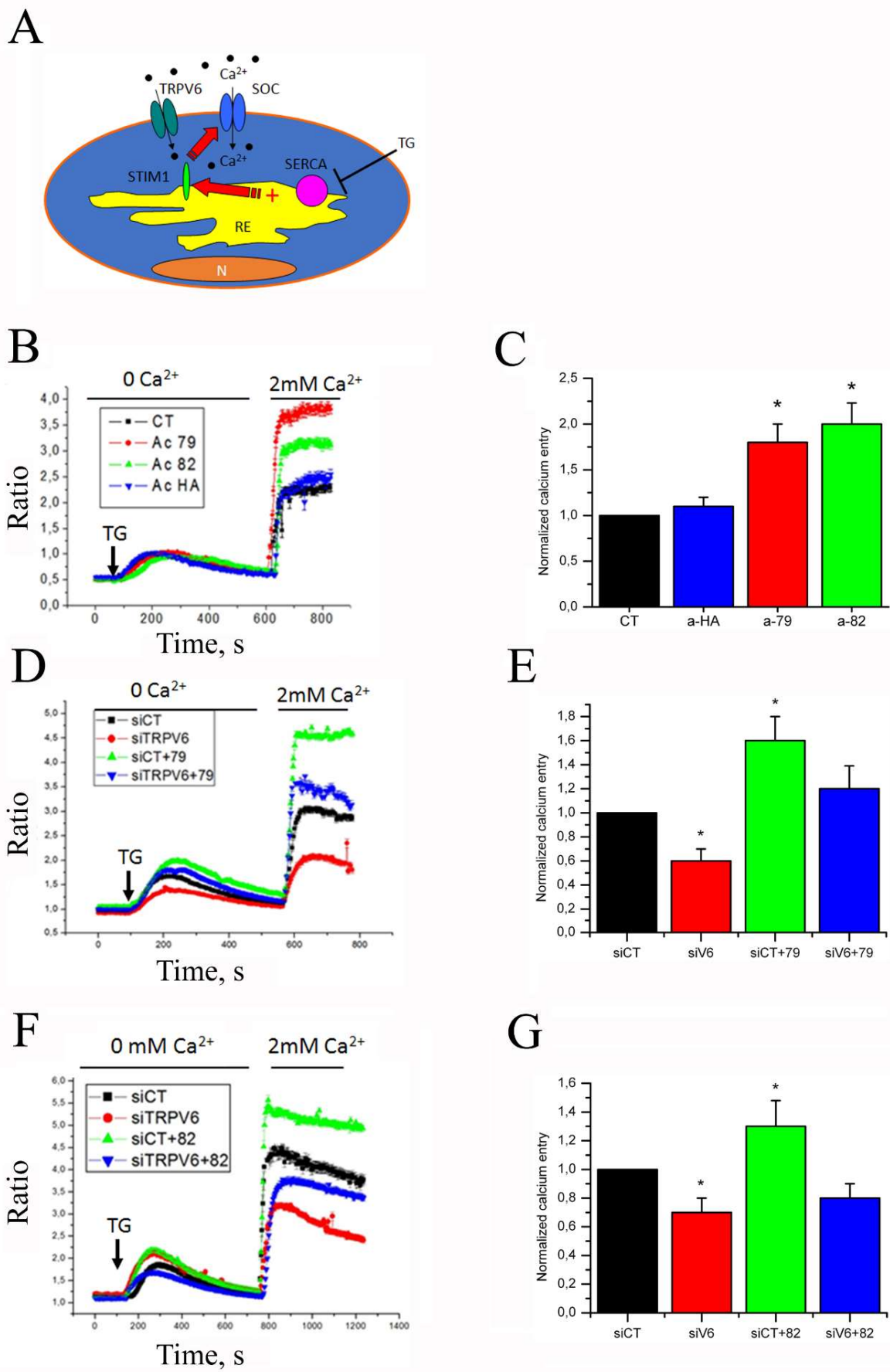


Figure 9. Effets des traitements avec les anticorps anti-TRPV6 sur l'entrée de calcium.

A. Schéma du SOCE (store-operated capacitive calcium entry) où le canal TRPV6 joue un rôle important. L'inhibition des pompes SERCA avec la thapsigargine provoque une fuite de calcium qui vide les stocks calciques réticulaires et active les canaux SOC (Store-Operated Channels) qui, à leur tour, vont activer le canal TRPV6 prenant une part importante dans l'amplification de l'entrée du calcium à l'intérieur des cellules. B. le SOCE dans les cellules LNCaP prétraitées 5 min avec soit le glycérol (CT), soit les anticorps polyclonaux de lapin anti-HA ou anti-TRPV6 rb79 et rb82. C, Représentation quantitative correspondante du SOCE affecté par les traitements induits par les anticorps montrés dans B. D, SOCE dans les cellules LNCaP avec l'anticorps anti-TRPV6 rb79 prétraitement de 5 min avec knockdown du canal TRPV6 (siARN, 40 nM, 48 heures). E, une représentation quantitative correspondante du SOCE affecté par les traitements indiqués dans D. F, SOCE dans les cellules LNCaP sous l'anticorps anti-TRPV6 rb82 prétraitement de 5 min avec le knockdown du canal TRPV6 (siRNA, 40 nM, 48 heures). G, une représentation quantitative correspondante du SOCE affecté par les traitements indiqués dans F.

3) Les anticorps rb79 et rb82 affectent directement les courants du canal TRPV6

Un standard dans l'action des anticorps extracellulaires sur un canal ionique est la technique d'électrophysiologie permettant de mesurer les courants ioniques traversant un canal particulier puisque chacun d'eux possède une caractéristique ou une signature conductrice unique. La spécificité des anticorps développés rb79 et rb82 a été vérifiée en mesurant leur effet sur les courants entiers enregistrés à partir de cellules HEK transfectées avec le plasmide vEF1ap-5'UTR-TRPV6wt_CMVp-mCherry (Figure 10). Les cellules ont été initialement baignées, comme décrit, dans une solution physiologique contenant 10mM de calcium connu pour bloquer l'activité de TRPV6 (Derler et al. 2006a; Niemeyer et al. 2001a; Singh et al. 2018a). Des courants spécifiques à TRPV6 sont obtenus en échangeant la solution extracellulaire (bain) avec une solution sans cation divalent (DVF), communément connue pour stimuler l'activité de TRPV6 (Derler et al. 2006a; Niemeyer et al. 2001a). L'anticorps polyclonal anti-TRPV6 de lapin rb79 est capable d'augmenter significativement le courant en se liant au canal TRPV6 (1/500, 0,5 µg/µL) par rapport à l'anticorps contrôle anti-HA (Figure 10A et B). Pour confirmer la spécificité de cette liaison, une expérience de dose-réponse a été menée et a montré l'activation progressive du canal TRPV6 (Figure 10C). Les mêmes effets ont été obtenus pour

l'autre anticorps : rb82 montrant une augmentation significative des courants spécifiques de TRPV6 (Figure 10D).

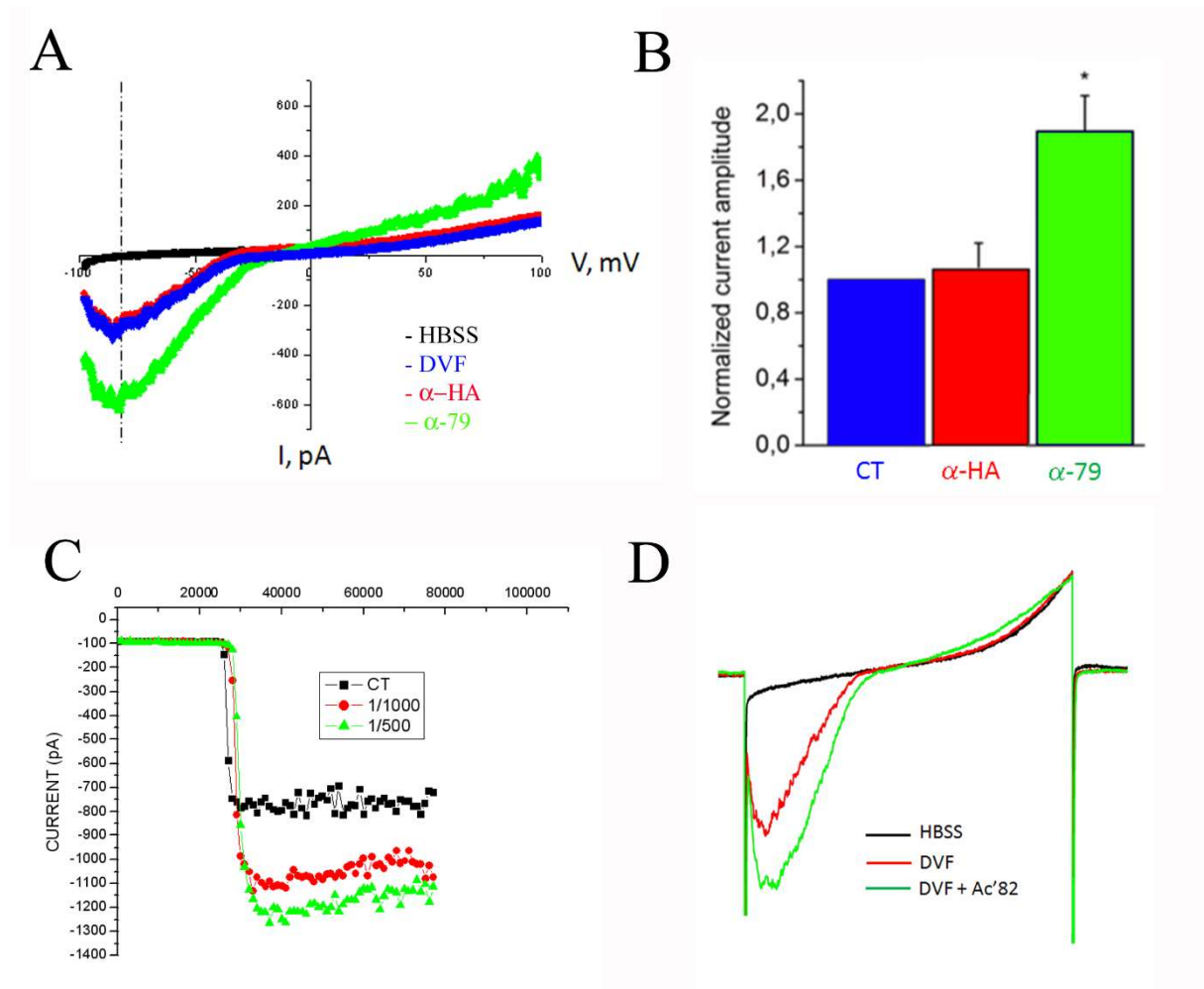


Figure 10. Les anticorps altèrent les courants électriques à travers le canal TRPV6.

A. Une courbe I/V standard avec la rampe -100/+100 mV appliquée sur la cellule HEK transfectée avec le vecteur vEF1ap-5'UTR-TRPV6wt_CMVp-mCherry et traitée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-TRPV6 rb79 par rapport à l'anticorps témoin du même isotype anticorps polyclonal anti-HA de lapin. **B.** Représentation quantitative correspondante des courants spécifiques de TRPV6 dans différentes conditions indiquées en A, $n = 3$, * - $p < 0,05$. **C.** Courbes dose-réponse de l'anticorps anti-TRPV6 de lapin rb79 à différentes dilutions. **D.** Une courbe I/V standard avec la rampe -100/+100 mV appliquée sur la cellule HEK transfectée avec le vecteur vEF1ap-5'UTR-TRPV6wt_CMVp-mCherry et traitée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-TRPV6 rb82.

4) Diminution de la survie cellulaire via la modulation de l'activité de TRPV6

Dès que nous avons prouvé l'action directe de nos anticorps sur le canal TRPV6, la question cruciale était de savoir si ces anticorps, rb79 et rb82, étaient capables d'influencer la viabilité cellulaire des cellules PCa *in vitro*. En effet, le canal TRPV6 est connu comme étant impliqué dans la survie cellulaire des cellules PCa et le ciblage de celui-ci avec des anticorps capables de modifier son activité peuvent entraîner des effets cellulaires au niveau de la survie. Pour cela, les cellules LNCaP ont été incubées pendant 72 heures soit avec du glycérol (CT) soit avec différentes dilutions d'anticorps rb79 et rb82 (Figure 11A et B). De plus, un anticorps anti-HA contrôle a également été utilisé à différentes dilutions. Etant donné que le test de survie cellulaire est basé sur l'évaluation de l'activité du cytochrome p-450, il s'agit d'un test complexe mesurant à la fois la prolifération et la mortalité cellulaire nécessitant l'utilisation de techniques supplémentaires. Dans notre expérience de comptage cellulaire, nous avons photographié la densité cellulaire avant comptage (Figure 11C) montrant une densité cellulaire clairement différente dans les conditions traitées avec rb79 et rb82. De plus, nous avons testé les effets des anticorps rb79 et rb82 (par rapport à autre anticorps contrôle anti-GFP) sur nos lignées cellulaires PC-3M *trpv6^{-/-}* et PC-3M *trpv6^{+/+}* (Figure 8B). Ces données ont confirmé une fois de plus le ciblage spécifique du canal TRPV6 par les anticorps rb79 et rb82. Le comptage cellulaire des cellules PCa traitées avec les anticorps est illustré à la figure 11D où nous avons ajouté deux autres anticorps contrôle ciblant le canal TRPV6 de l'intérieur de la cellule et ne pouvant donc pas cibler le canal TRPV6 présent sur les cellules vivantes intactes. Une autre lignée cellulaire PCa a également été utilisée pour voir si les anticorps rb79 et rb82 sont capables de cibler d'autres lignées cellulaires (Figure 11E). Nos données suggèrent fortement l'implication crucial du canal TRPV6 dans la survie des cellules PCa et donc la modulation de son activité peut être extrêmement bénéfique pour le traitement du cancer de la prostate. Les données montrent clairement que le type de cellules n'a pas d'importance pour l'anticorps 82 (les mêmes données ont été obtenues pour l'anticorps rb79, données non présentées). Enfin, des études du cycle cellulaire ont été effectuées montrant l'apparition d'un pic sub-G1 dans les conditions traitées avec les anticorps rb79 et rb82 (Figure 11F), ce qui suggère que les anticorps anti-TRPV6 agissent en induisant l'apoptose plutôt qu'en diminuant la prolifération cellulaire.

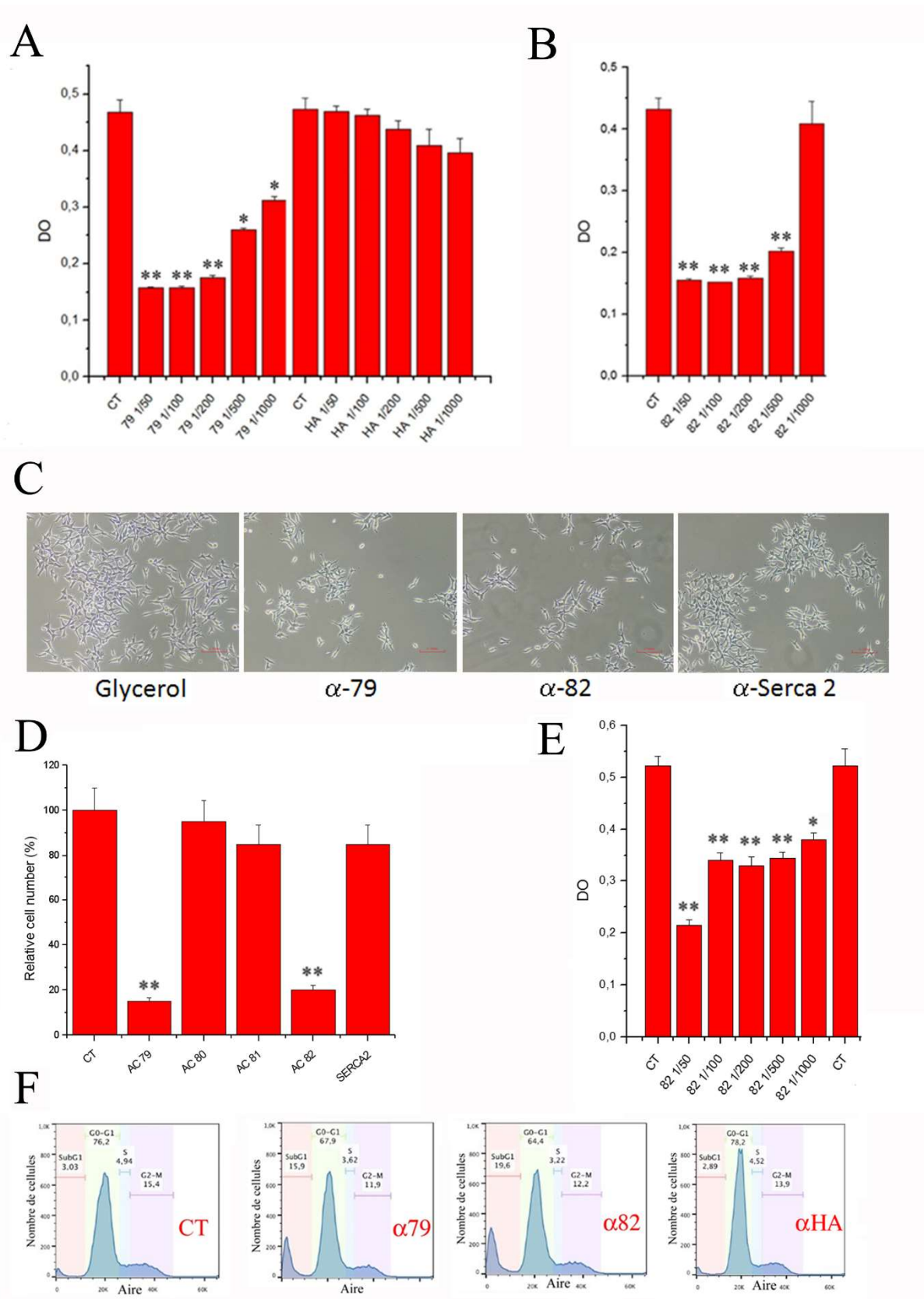


Figure 11. La modulation de TRPV6 via les anticorps 79 et 82 diminue la survie cellulaire.

*A. Test de survie cellulaire (MTS) de cellules LNCaP traitées soit avec la quantité équivalente de glycérol (CT) soit avec différents anticorps (anticorps anti-TRPV6 rb79 et anti-HA pendant 3 jours) dilutions normalisées à la quantité initiale de 0,5 µg/µl, n=3, * - p<0,05 ; ** - p<0,01. B. la même survie cellulaire des cellules LNCaP traitées avec l'anticorps anti-TRPV6 rb82. C. Photos des cellules LNCaP traitées pendant 3 jours avec une dilution 1/500 de l'expérience ci-dessus avec soit l'anticorps anti-TRPV6 rb79, rb82, anti-SERCA2B du même isotype et le glycérol. D. Comptage cellulaire des cellules LNCaP traitées pendant 3 jours avec les anticorps anti-TRPV6 rb79, rb82, mais aussi rb80 et rb81 (dirigés contre des épitopes intracellulaires du canal TRPV6) anti-SERCA2B de même isotype et glycérol (CT) ; n=3, ** - p<0,01. E. Test de survie cellulaire (MTS) de cellules PC-3M traitées pendant 3 jours avec l'anticorps anti-TRPV6 rb82 en utilisant différentes dilutions et le glycérol (CT) ; n=3, ** - p<0,01. F. Test du cycle cellulaire avec un pic sub-G1 distinct des cellules LNCaP en utilisant l'anticorps anti-TRPV6 rb79, rb82, anti-HA de même isotype et le glycérol (CT) pendant 3 jours.*

Un test d'apoptose classique, la coloration de Hoechst, a été utilisé pour confirmer l'hypothèse de l'induction de l'apoptose par les anticorps rb79 et rb82 (Figure 12A). La thapsigargine (3 jours de traitement) a été utilisée comme contrôle positif car elle induit une apoptose dépendante du calcium dans le traitement à long terme. La quantification des cellules apoptotiques a montré un taux de mortalité significatif induit par le traitement de 3 jours avec les anticorps rb79 et rb82 sur les cellules LNCaP (Figure 12B) et les cellules HEK (Figure 12C) qui sont plus sensibles à l'apoptose par rapport aux cellules PCa. Un autre test d'apoptose fiable est le test de TUNEL TMR-red, réalisé pour confirmer les données, qui a montré un taux élevé d'apoptose dans les conditions traitées avec les anticorps rb79 et rb82 par rapport au glycérol (CT) (Figure 12D). Le test du cycle cellulaire a ensuite été répété pour confirmer les données obtenues et le pic sub-G1 a été quantifié (Figure 12E). Les données quantifiées montrent que des cellules LNCaP traitées pendant 72 heures développent un taux significatif d'apoptose dans les conditions rb79 et rb82 (Figure 12E). Enfin, pour exclure la nécrose comme mécanisme possible, une série temporelle de 8, 24 et 48 heures a été réalisée à l'aide d'une coloration au bleu de trypan montrant l'apparition tardive des cellules colorées, comme indicateur de l'apoptose où l'intégrité de la membrane est compromise (Figure 12F).

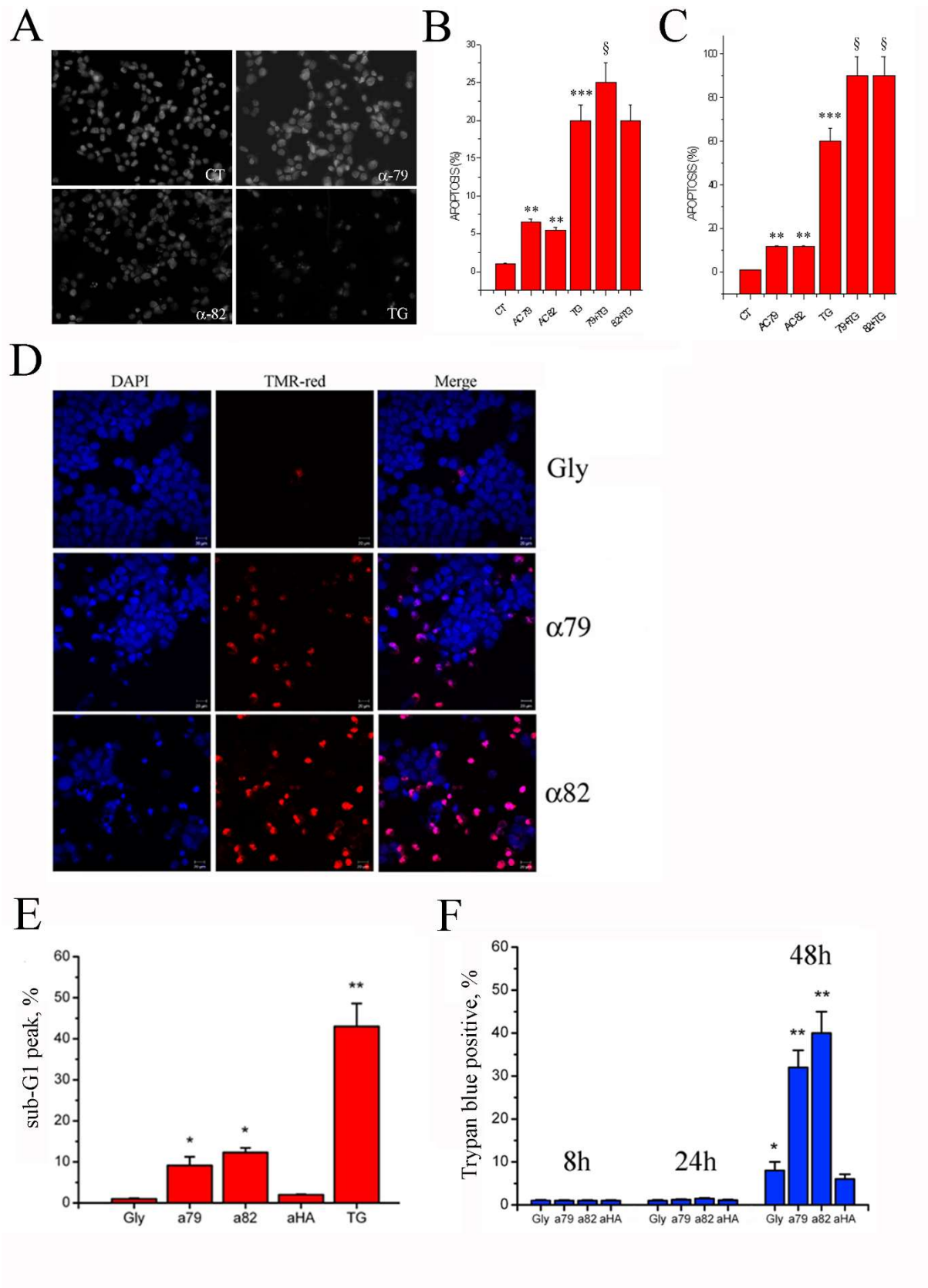


Figure 12. L'activation du canal TRPV6 par les anticorps 79 et 82 induit l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques.

*A. test d'apoptose utilisant la coloration Hoechst des cellules LNCaP. Les cellules ont été prétraitées pendant 72 heures soit avec la quantité équivalente de glycérol (CT) soit avec les anticorps anti-TRPV6 rb79 et rb82 pendant 72 heures (1/500, 0,5 µg/µl). Un traitement avec 1 µM de thapsigargine (TG) pendant 72 heures a été utilisé comme contrôle positif pour induire l'apoptose. B. Quantification du taux d'apoptose en utilisant la coloration Hoechst des cellules LNCaP. n=3, ** - p<0,01, *** - p<0,001. § - p<0,05 par rapport au traitement TG (1 µM, 72 heures) seul. C. Quantification du taux d'apoptose par coloration Hoechst des cellules HEK. n=3, ** - p<0,01, *** - p<0,001. § - p<0,05 par rapport au traitement TG (1 µM, 72 heures) seul. D. Test d'apoptose utilisant le test TUNEL TMR-rouge de cellules LNCaP traitées avec les anticorps anti-TRPV6 rb79 et rb82 et le glycérol (CT) ; n=3. E. Quantification du pic sub-G1 du test du cycle cellulaire des cellules LNCaP traitées pendant 72 heures soit avec la quantité équivalente de glycérol (CT) soit avec l'anticorps anti-TRPV6 rb79 et rb82 pendant 72 heures (1/500), ou anti-HA du même isotype. Un traitement avec 1 µM de thapsigargine (TG) pendant 72 heures a été utilisé comme contrôle positif pour induire l'apoptose. n=3, * - p<0,05 ; ** - p<0,01. F. Coloration au bleu Trypan des cellules LNCaP traitées avec la quantité équivalente de glycérol (CT) ou d'anticorps anti-TRPV6 rb79 et rb82 pendant 72 heures (1/500), ou d'anti-HA de même isotype, réalisée pendant 8, 24 et 48 heures. n=3, * - p<0,05 ; ** - p<0,01.*

5) Hypothèses des mécanismes d'action des anticorps rb79 et rb82

Quatre mécanismes de régulation des canaux ioniques sont connus aujourd'hui. Le premier est de réguler l'expression du canal ionique au niveau de la transcription, le second est de réguler la maturation de la protéine au niveau des modifications post-traductionnelles, le troisième est de réguler le trafic des canaux ioniques vers la membrane plasmique puisque ces protéines sont transmembranaires et doivent, tout en possédant des domaines hydrophobes, s'insérer dans les vésicules lipidiques dont le trafic vers la membrane plasmique est étroitement contrôlé et le quatrième est une régulation directe de l'activité des canaux ioniques sur la membrane plasmique. Puisque nous avons déjà montré que l'expression de TRPV6 est focalisée sur la membrane plasmique, nous avons poursuivi nos études en utilisant un protocole de biotinylation qui permet de suivre l'expression membranaire des protéines. Nos données utilisant des cellules LNCaP prétraitées avec les anticorps anti-TRPV6 rb79 et rb82, du glycérol et l'anticorps anti-HA pendant 15 minutes ont montré que dans le cas du prétraitement avec

l'anticorps rb79, l'expression membranaire de TRPV6 augmentait significativement alors qu'il n'y a pas d'effet avec l'anticorps rb82 (Figure 13A). En effet, nos données sont en corrélation avec celles précédemment obtenues. Par ailleurs, les données sur la régulation de TRPV6 via la translocation et sa stabilisation sur la membrane plasmique ont déjà été publiées (van de Graaf et al. 2006). En ce qui concerne l'anticorps rb82, son mécanisme d'action semble être une action directe sur le canal TRPV6 qui modifierait uniquement son activité.

Selon les données obtenues, seules les cellules exprimant le canal TRPV6 sur la membrane plasmique seront affectées par les anticorps anti-TRPV6 rb79 et rb82. Pour le démontrer, nous avons modifié un test TUNEL de manière que les cellules traitées pendant 3 jours avec les différents anticorps soient d'abord fixées et prétraitées sans perméabilisation avec l'anticorps rb79 pour détecter le canal TRPV6 à la membrane plasmique suivant le protocole de TUNEL TMR-red. Nos données montrent que seules les cellules exprimant TRPV6 (Figure 13B) sont colorées en rouge et sont donc apoptotiques, ce qui confirme notre hypothèse. Enfin, nos cellules PCa ont été suivies par vidéo-microscopie où le comportement cellulaire a été enregistré pendant le traitement avec les différents anticorps en ajoutant de l'iodure de propidium pour surveiller l'intégrité cellulaire (Figure 13C). On peut ainsi voir sur les enregistrements que les anticorps anti-TRPV6 tuent avec succès une majorité de cellules PCa.

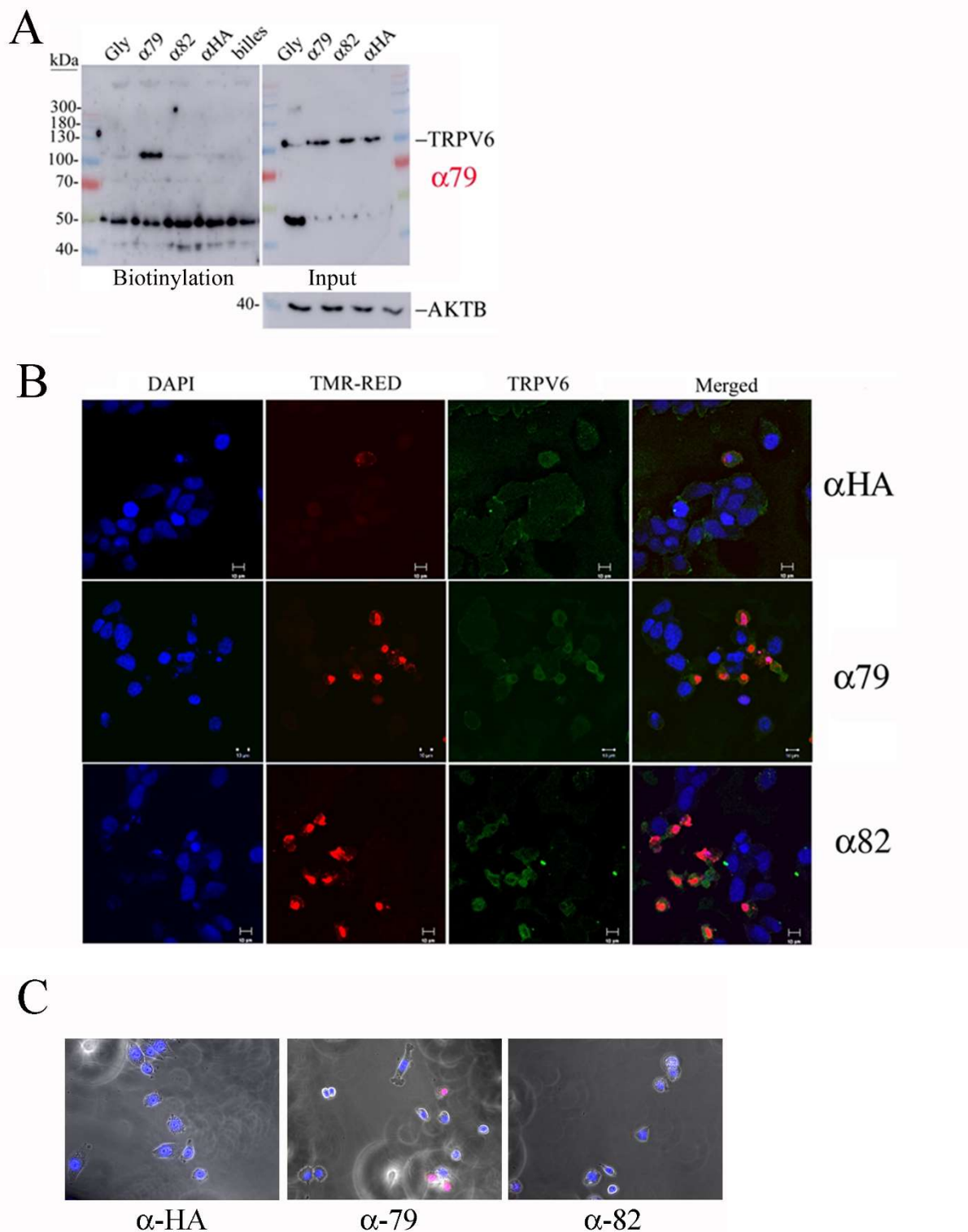


Figure 13. L'expression membranaire de TRPV6 est nécessaire pour l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses exprimant le canal TRPV6.

A. Expression membranaire du canal TRPV6 dans les cellules LNCaP révélée par les études de biotinylation. Les cellules ont été prétraitées pendant 15 minutes avec les anticorps anti-TRPV6 rb79, rb82, le glycérol et l'anticorps anti-HA (tous à 1/500 de 0,5 µg/µl). Le niveau du

canal TRPV6 est indiqué dans la fraction biotinylée par rapport à l'apport total et à la β -actine (AKTB). **B.** Test d'apoptose utilisant le test TUNEL TMR-rouge de cellules LNCaP prétraitées avec les anticorps anti-TRPV6 rb79 et rb82 pendant 72 heures (1/500), ou anti-HA du même isotype. Le canal TRPV6 a été révélé en utilisant l'anticorps anti-TRPV6 rb79. **C.** Vidéo-microscopie de cellules LNCaP traitées et enregistrées avec les anticorps rb79, rb82 et anticorps anti-HA pendant 72 heures (le tout au 1/500 de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), co-colorées avec l'iodure de propidium.

III. Le ciblage de TRPV6 par un anticorps monoclonal de souris MAB82 dirigé contre le pore du canal inhibe l'entrée de calcium, induit la mort cellulaire par apoptose et diminue la croissance tumorale *in vivo*

Nous avons précédemment montré que les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la première boucle extracellulaire et contre le pore du canal induisaient l'activation du canal TRPV6 entraînant la mort cellulaire par apoptose des cellules l'exprimant au niveau de la membrane plasmique.

Ainsi, pour faire suite à ces résultats, il était nécessaire de tester l'utilisation d'anticorps dirigés contre TRPV6 *in vivo* chez la souris. Pour cela, la production d'anticorps monoclonaux de souris était nécessaire. Nous avons donc tenté de générer des anticorps ciblant les mêmes épitopes que rb79 et rb82. Seul l'un d'entre eux, MAB82, dirigé contre le pore du canal a réussi à être généré (Figure 14).

Cependant, il était nécessaire de revalider la spécificité de cet anticorps envers TRPV6 ainsi que de tester son efficacité sur les cellules cancéreuses prostatiques exprimant TRPV6 à la membrane. Pour cela, des tests fonctionnels comme le MTS, la cytométrie en flux ou encore le TUNEL ont été réalisés.

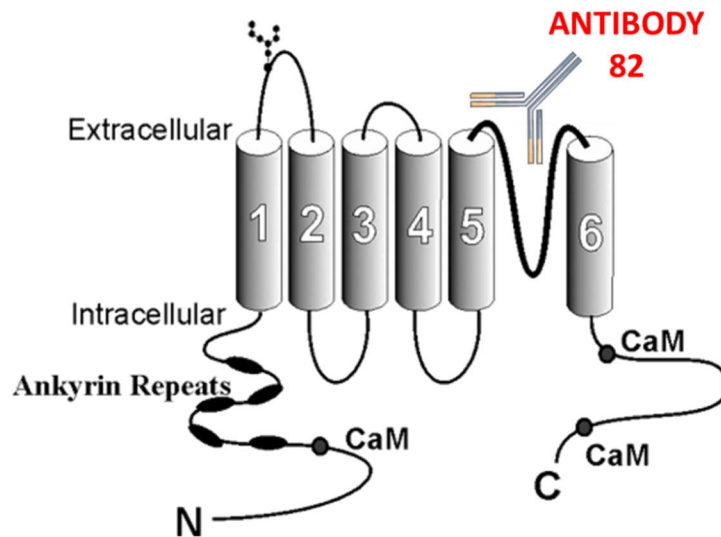


Figure 14. Schéma représentatif du ciblage de MAB82 au niveau du pore du canal TRPV6 situé entre les segments S5 et S6 (issu de <http://atlasgeneticsoncology.org/>).

a) MAB82 inhibe l'activité de TRPV6, diminuant ainsi l'entrée calcique médiée par TRPV6 et entraînant la mort cellulaire par apoptose

Un des standards dans l'action des anticorps sur les canaux ioniques est la technique d'électrophysiologie permettant de mesurer les courants ioniques traversant le canal puisque chacun d'eux présente une signature conductrice unique. Ainsi, la spécificité de l'anticorps monoclonal MAB82 a été vérifiée en mesurant son effet sur les courants cellulaires enregistrés à partir des cellules HEK transfectées avec le plasmide vEF1 α p-5'UTR-TRPV6wt_CMVp-mCherry (Figure 15). Les cellules étaient d'abord dans une solution physiologique contenant 10mM de Ca²⁺ connue pour bloquer l'activité du canal (Derler et al. 2006b; Niemeyer et al. 2001b; Singh et al. 2018b). Les courants spécifiques de TRPV6 ont été enregistrés en passant à une solution ne contenant pas de cation divalent (DVF) connue pour stimuler l'activité de TRPV6.

L'anticorps monoclonal MAB82 a ainsi été utilisé à plusieurs concentrations croissantes (1/1000^{ème}, 1/500^{ème} et 1/200^{ème}) afin d'établir un effet dose-dépendant de cet anticorps sur les courants TRPV6. La Figure 15 résume les courants observés montrant une inhibition de l'activité de TRPV6 de manière dose dépendante.

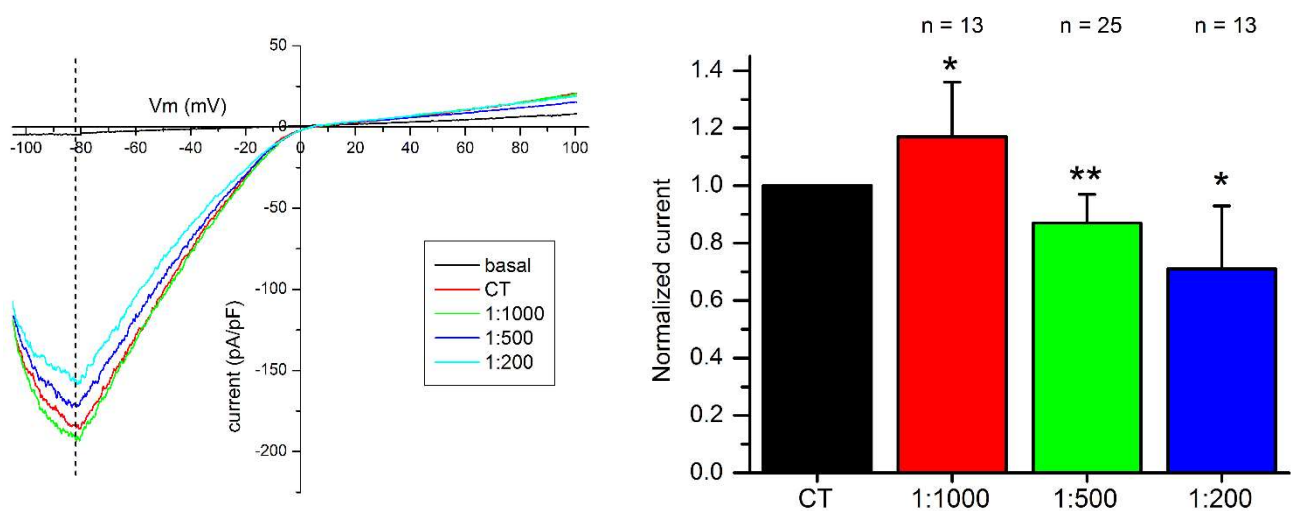


Figure 15. MAB82 inhibe l'activité du canal TRPV6.

*Activité du canal calcique TRPV6 mesurée par patch clamp dans les cellules HEK transfectées avec pTRPV6wt et traitées avec MAB82 à différentes dilutions allant de 1/200ème à 1/1000ème. Les courants normalisés à -80mV sont représentés sous forme d'histogramme * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.*

TRPV6 a été montré comme étant un élément important de l'entrée SOCE à l'intérieur des cellules cancéreuses prostatiques, ce qui nous permet d'utiliser ce mécanisme pour détecter et analyser les modulations de concentrations calciques dues à la modification de l'activité de TRPV6.

Ce mécanisme est artificiellement déclenché en vidant les stocks calciques réticulaires. En effet, la thapsigargine est un inhibiteur des pompes SERCA présentes à la membrane du réticulum endoplasmique qui empêchera le calcium présent dans le cytoplasme de rentrer dans le RE et entraînera la vidange du calcium via les canaux de fuite. Cette diminution de la concentration calcique est ressentie par STIM1 qui est transloqué à la membrane pour interagir avec les canaux SOC comme Orai1 ou TRPC1. L'activation de ceux-ci entraîne indirectement la translocation de TRPV6 à la membrane permettant une entrée massive de calcium médiée par celui-ci (Raphaël et al. 2014b).

Les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP ont ainsi été incubées avec une solution ne contenant pas de calcium dans le but de créer un gradient amplifié par l'utilisation de $1\mu\text{M}$ de

thapsigargin. Ces conditions artificielles permettent de créer un gros manque de calcium pour la cellule qui activera ses canaux SOC. L'ajout de 2mM de calcium extracellulaire permettra l'entrée massive de calcium via les SOC qui à leur tour activeront le canal TRPV6. Cette entrée de calcium est appelée entrée capacitive de calcium.

La préincubation des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP durant 5 min avec soit un anticorps monoclonal contrôle (MABAU1) ou l'anticorps monoclonal MAB82 (utilisés à une concentration finale de 2,4 $\mu\text{g/ml}$) montre que l'anticorps MAB82 diminue significativement l'entrée capacitive de calcium dans les cellules PCa suggérant l'inhibition de TRPV6, un des acteurs de cette entrée de calcium (Figure 16).

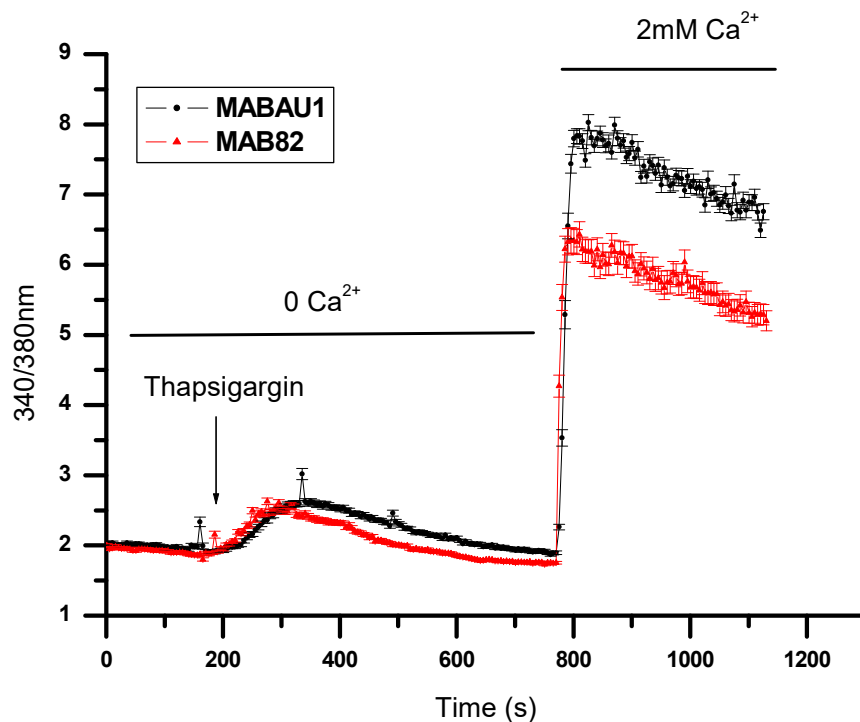


Figure 16. L'anticorps monoclonal MAB82 diminue l'entrée capacitive de calcium.

Entrée capacitive de calcium mesurée par imagerie calcique sur des cellules LNCaP après préincubation pendant 5min avec l'anticorps MABAU1 ou MAB82 (concentration finale à 2,4 $\mu\text{g/mL}$).

Nous avons montré que MAB82 inhibe spécifiquement le canal TRPV6 induisant une diminution de l'entrée capacitive de calcium dans les cellules PCa. Des tests permettant de mesurer la survie cellulaire ont été effectués grâce à la technique de MTS. Pour cela, les cellules

LNCaP ont été incubées à différents temps (24h, 48h et 72h) avec soit du glycérol, soit l'anticorps MABAU1, soit MAB82 à une concentration finale de 2,4 μ g/ml d'anticorps. Les résultats obtenus montrent une diminution significative de la survie cellulaire des cellules PCa dès 72h de traitement (Figure 17). Ces données suggèrent fortement que MAB82 est capable de diminuer la survie cellulaire en induisant la mort par apoptose des cellules PCa (confirmé par la technique de TUNEL).

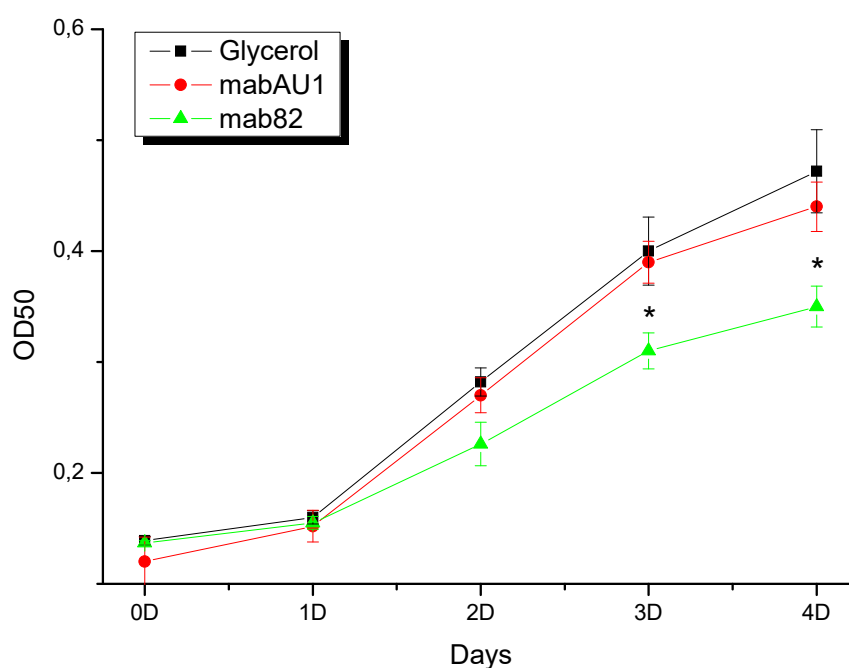


Figure 17. Diminution de la viabilité cellulaire après traitement avec MAB82.

*Survie des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP mesurée grâce au test MTS. Les cellules ont été traitées pendant 4 jours avec soit Glycérol, soit MABAU1 soit MAB82 à une concentration de 2,4 μ g/mL. n=3 ; *- p<0,05.*

Des expériences supplémentaires de vidéomicroscopie ont permis de suivre l'évolution en temps réel des cellules PCa traitées avec soit l'anticorps MABAU1 soit l'anticorps MAB82 (utilisés à une concentration finale de 2,4 μ g/mL). Pour cela, le comportement des cellules a été enregistré durant 3 jours à partir du jour de traitement en ajoutant de l'iodure de propidium, permettant de suivre l'intégrité des cellules. Ainsi, il a été montré que l'anticorps MAB82 induisait rapidement de la mortalité cellulaire (cellules remplies par l'iodure de propidium en

rouge) et diminuait significativement le déplacement des cellules dans l'espace, suggérant que les cellules restantes mourront prochainement (Figure 18).

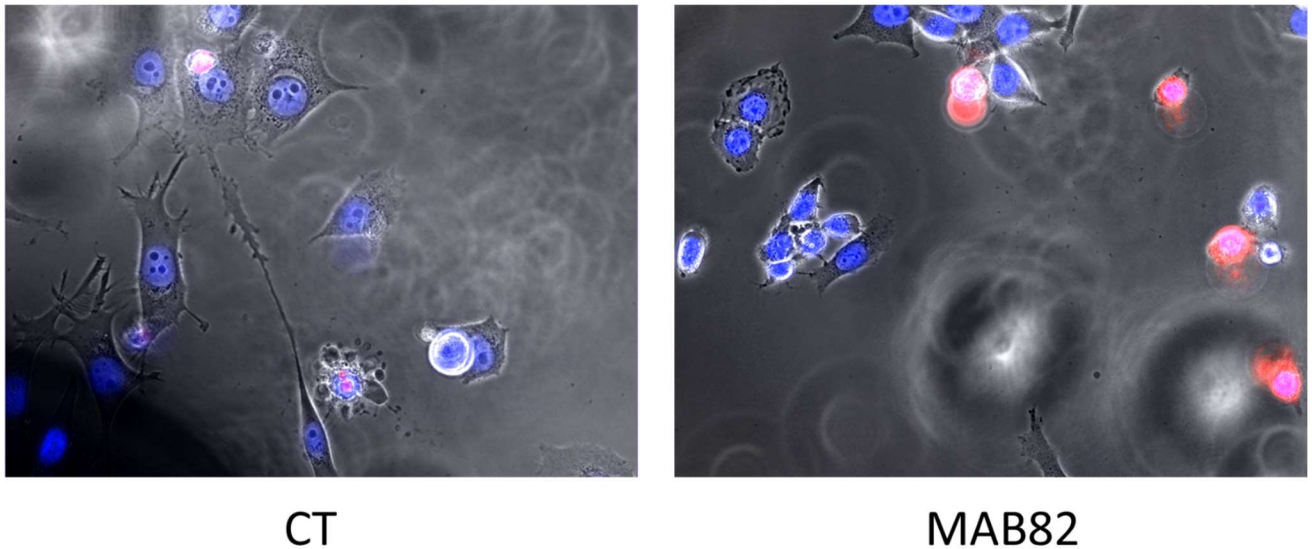


Figure 18. Suivi des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP.

Suivi après 24h de traitement avec soit l'anticorps contrôle MABAU1 (gauche) soit l'anticorps MAB82 (droite). Les cellules rouges sont les cellules remplies par l'iodure de propidium et les cellules sont suivies par videomicroscopie grâce au Hoechst vital (noyaux bleus).

b) *In vivo*, MAB82 induit une diminution de la croissance tumorale et une diminution de l'apparition de métastases

Afin d'étudier les effets de MAB82 sur la croissance tumorale, des expériences *in vivo* ont été réalisées sur des souris swiss-nude immunodéficientes. 3 millions de cellules PC-3M^{TRPV6}^{-/-} transfectées avec vEF1 α -5'UTR-TRPV6wt_CMVp-mCherry (appelés pTRPV6wt) ou avec vEF1 α -5'UTR_CMVp-mCherry (appelés pmCherry) ont été injectées en xénogreffe en sous-cutanée. Chacun des groupes a été divisé en 2 pour être traité soit avec MABAU1 (contrôle négatif) soit avec MAB82 à une dose de 100 μ g/kg par voie intrapéritonéale. Les traitements sont effectués dès l'apparition des tumeurs (9^{ème} jour de l'expérience ; taille d'environ 50 à 100mm³) 2 fois par semaine.

Le suivi de la croissance tumorale montre ainsi une diminution significative de celle-ci dès le 24^{ème} jour soit 2 semaines après le début des traitements (Figure 19), montrant que l'anticorps MAB82 est efficace *in vivo* pour traiter les tumeurs surexprimant TRPV6. En parallèle, la croissance tumorale est suivie grâce au fluorophore mCherry présents dans les cellules cancéreuses injectées avec l'imagerie petit animal (Figure 20).

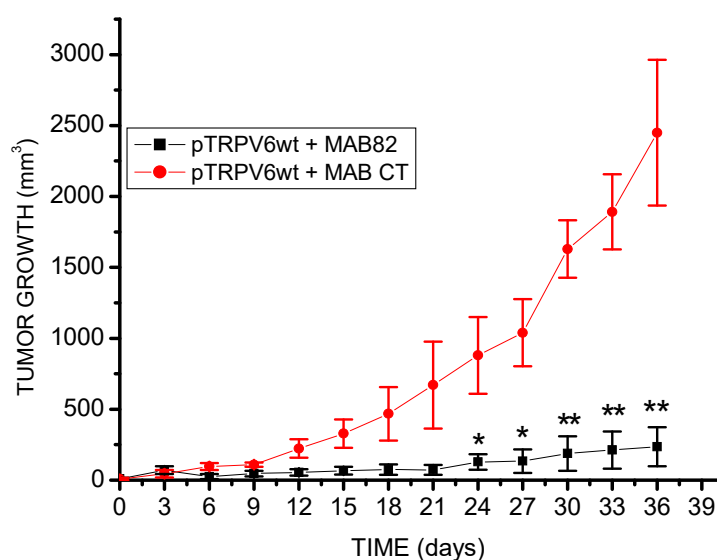


Figure 19. Effets de l'anticorps monoclonal MAB82 sur la croissance tumorale de cellules PCa exprimant TRPV6.

*Les traitements sont effectués à partir du 9ème jour (apparition des tumeurs) 2 fois par semaine à une concentration de 100µg/kg et la croissance tumorale est suivie à l'aide d'un pied à coulisse. *-p<0,05 ;**-p<0,01.*

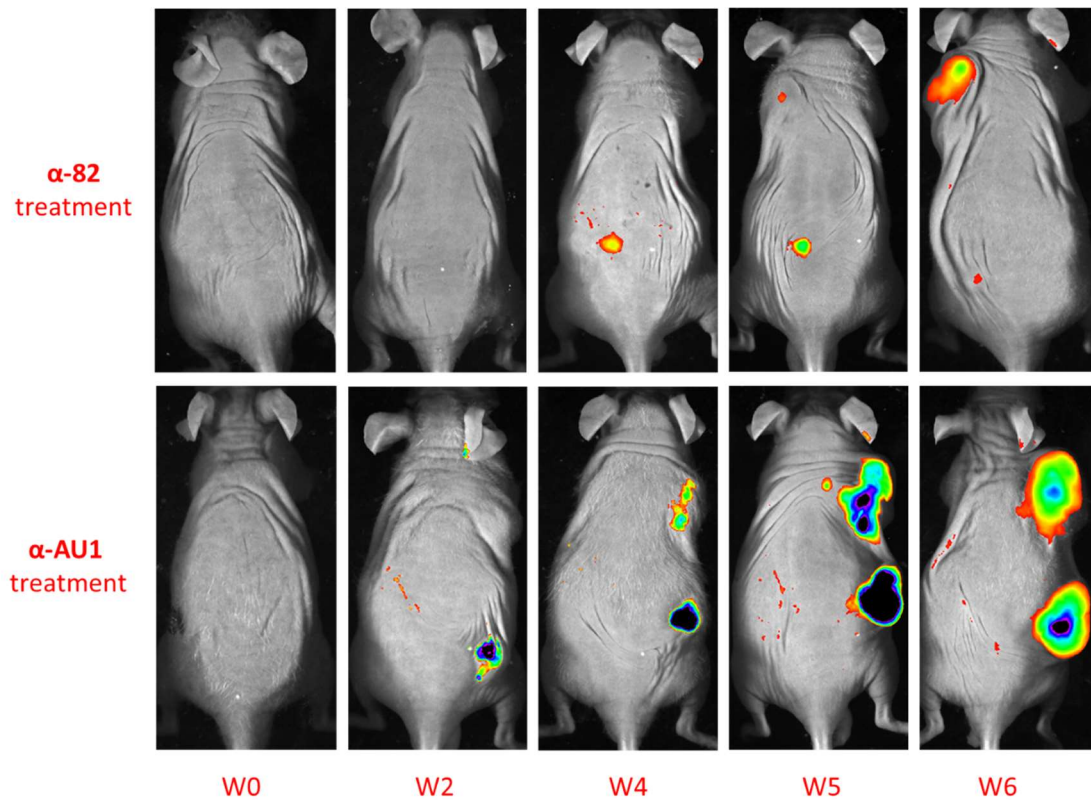


Figure 20. Suivi de la croissance tumorale par imagerie petit animal sur 6 semaines grâce au fluorophore mCherry présent dans les cellules PCa injectées.

De plus, des expériences ont été réalisées permettant de suivre la distribution de MAB82 à l'intérieur de l'organisme après injection intrapéritonéale. Pour cela, l'anticorps a été couplé à un fluorophore (CF790) et sa distribution a été enregistrée par imagerie petit animal à différents temps. Les résultats montrent que l'anticorps MAB82 se distribue lentement dans l'organisme suggérant que l'injection des anticorps directement dans la circulation sanguine pourrait permettre une meilleure distribution de celui-ci et ainsi avoir de meilleurs résultats sur la croissance tumorale (Figure 21).

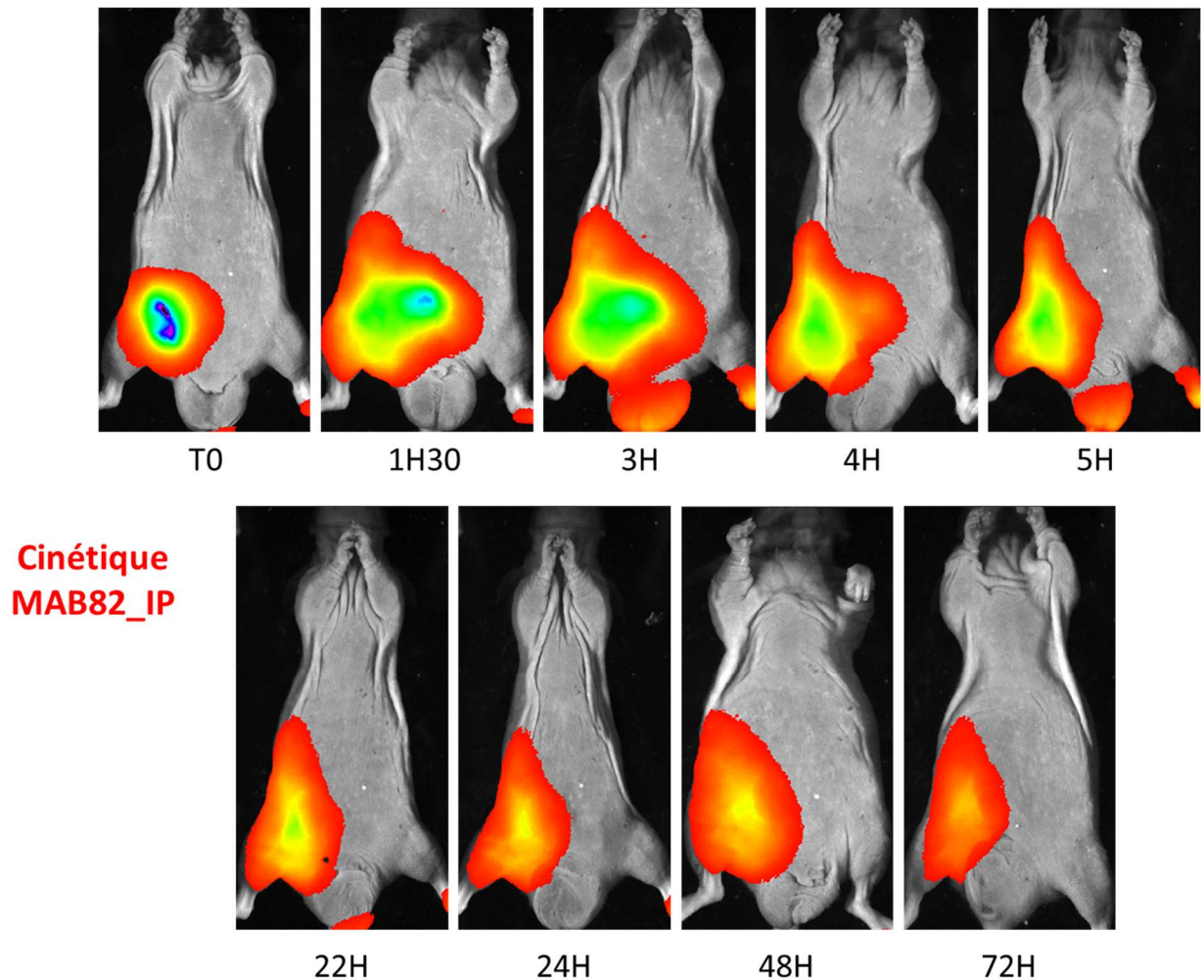


Figure 21. Etude de la distribution de l'anticorps MAB82 après injection.

MAB82 est couplé à un fluorophore (CF790) permettant d'être suivi par imagerie petit animal à différents temps.

De même, la distribution de l'anticorps MAB82 a été suivie directement dans les organes. Pour cela, 15 minutes après injection intrapéritonéale de MAB82-CF790, l'animal a été sacrifié, les différents organes récupérés et directement analysés par imagerie petit animal. Les résultats montrent ainsi que MAB82 se distribue de manière plutôt homogène dans la majorité des organes (Figure 22). Comparé à l'anticorps monoclonal contrôle (MABAU1), MAB82 montre une accumulation au niveau du pancréas, des testicules et au niveau d'organes composant le tractus digestif.

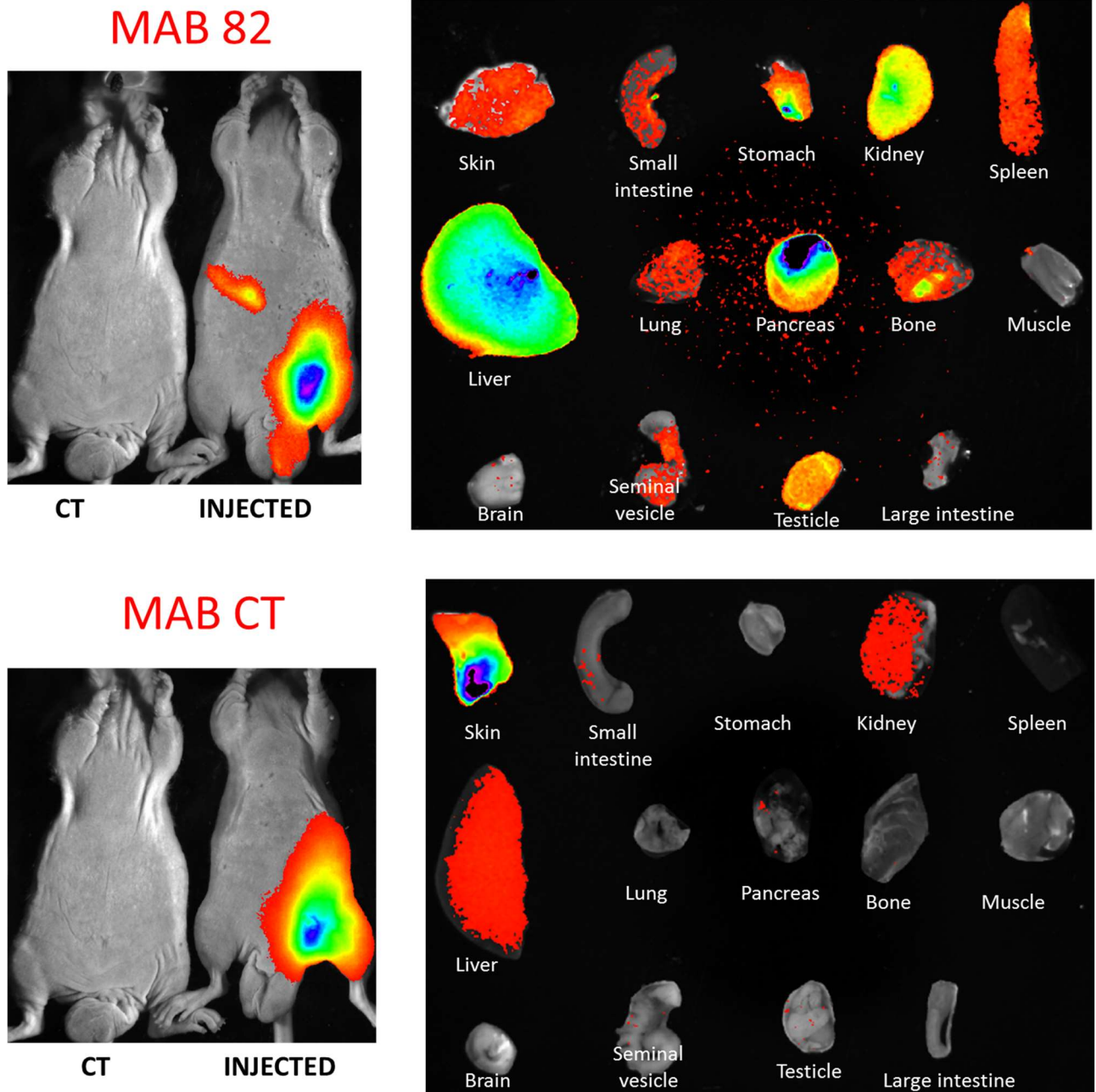


Figure 22. Distribution des anticorps monoclonaux MABAU1 et MAB82 dans les différents organes.

Les anticorps sont marqués avec un fluorophore (CF790) et détectés grâce à l'imagerie petit animal.

Lorsque les tumeurs ont atteint la taille maximale autorisée (i.e. 2500mm³), les tumeurs sont excisées, permettant de suivre la potentielle apparition de métastases. Dans cette expérience, les groupes de souris présentant des tumeurs n'exprimant pas TRPV6 (groupe PC-3M^{TRPV6-/-}+pmCherry) n'ont pas développé de métastases alors que 100% des souris ayant été injectées

avec des cellules PCa exprimant TRPV6 (PC-3M^{TRPV6-/-}+pTRPV6wt) et traitées avec l'anticorps contrôle MABAU1 ont présenté des métastases au niveau des pattes. Cependant, TRPV6 jouant un rôle dans la prolifération cellulaire des cellules PCa, il n'est pas possible de conclure sur le rôle de celui-ci dans l'apparition des métastases dans cette expérience. De même, on remarque que les traitements du groupe exprimant TRPV6 avec l'anticorps MAB82 diminuent l'apparition de métastases (Figure 23). Ces résultats peuvent laisser penser que MAB82 pourrait inhiber le développement des métastases mais cette hypothèse doit être confirmée par des expériences supplémentaires (injections de cellules en intracardiaque ou directement dans l'os par exemple).

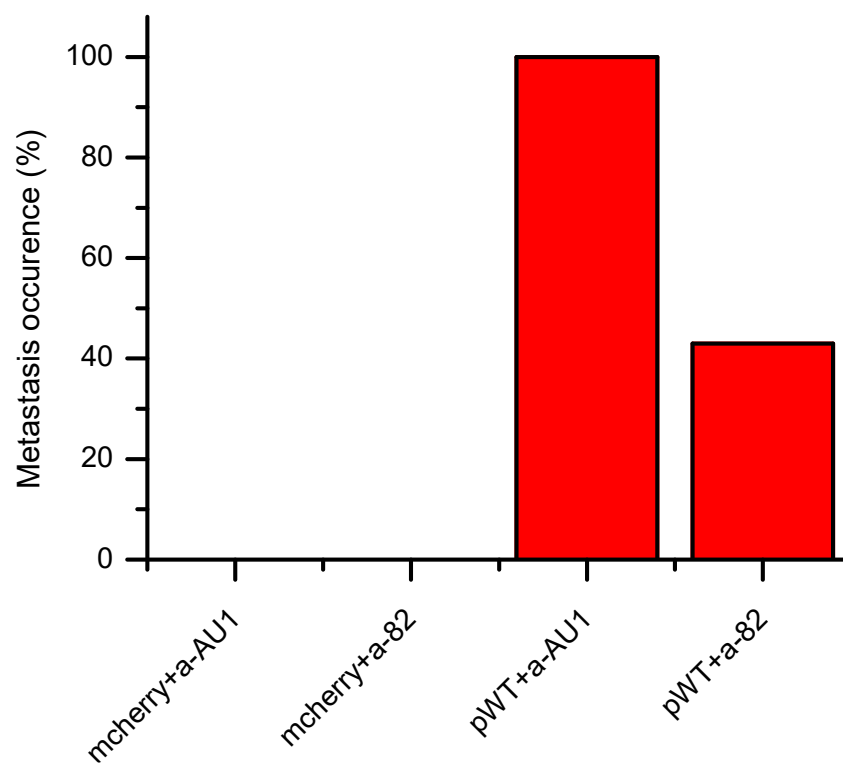


Figure 23. Pourcentage d'apparition de métastases après excision de la tumeur primaire. Les souris ont ici été suivies 10 semaines après excision de la tumeur primaire.

Enfin, de manière générale, le traitement des souris présentant des tumeurs exprimant TRPV6 par MAB82 permet d'augmenter les taux de survie (Figure 24) avec une survie de 100% des souris du groupe PC-3M^{TRPV6-/-}+pTRPV6wt traitées avec l'anticorps MAB82 comparé à un taux de survie d'environ 40% pour le groupe traité avec l'anticorps contrôle au bout de 40 jours de suivi.

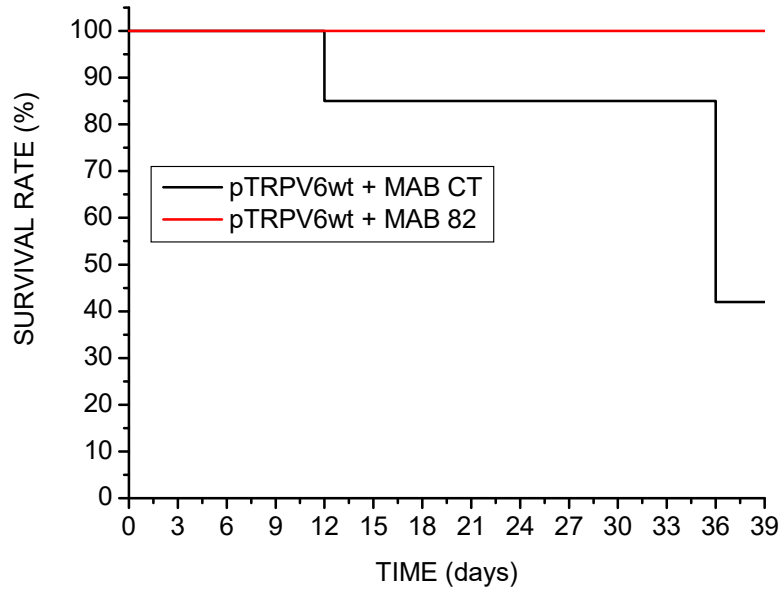


Figure 24. Les souris présentant des tumeurs exprimant TRPV6 traitées avec MAB82 montrent une amélioration de la survie par rapport au contrôle. Courbe de Kaplan-Meier permettant d'analyser la survie des souris des différents groupes.

IV. Etude du rôle de TRPV6 dans la mise en place du phénotype agressif/métastatique du cancer de la prostate

Des données préliminaires d'immunohistochimie ont montré que TRPV6 était exprimé en bordures des tumeurs. De plus, les expériences *in vivo* réalisées précédemment peuvent laisser penser que TRPV6 joue un rôle dans la mise en place du phénotype agressif/métastatique du cancer de la prostate. Notre hypothèse de travail était ici d'étudier le rôle de TRPV6 dans des processus de migration/invasion (tests de blessure / Chambre de Boyden / Vidéomicroscopie) *in vitro*. Pour cela, nous avons tout d'abord effectué des tests de blessure sur des lignées cellulaires cancéreuses n'exprimant pas TRPV6 (PC-3M^{TRPV6-/-}) ou exprimant TRPV6 (PC-3M^{TRPV6+/+}). La répression de TRPV6 par des siARN a montré une diminution significative des taux de migration (Figure 25) montrant qu'il est impliqué dans ces processus.

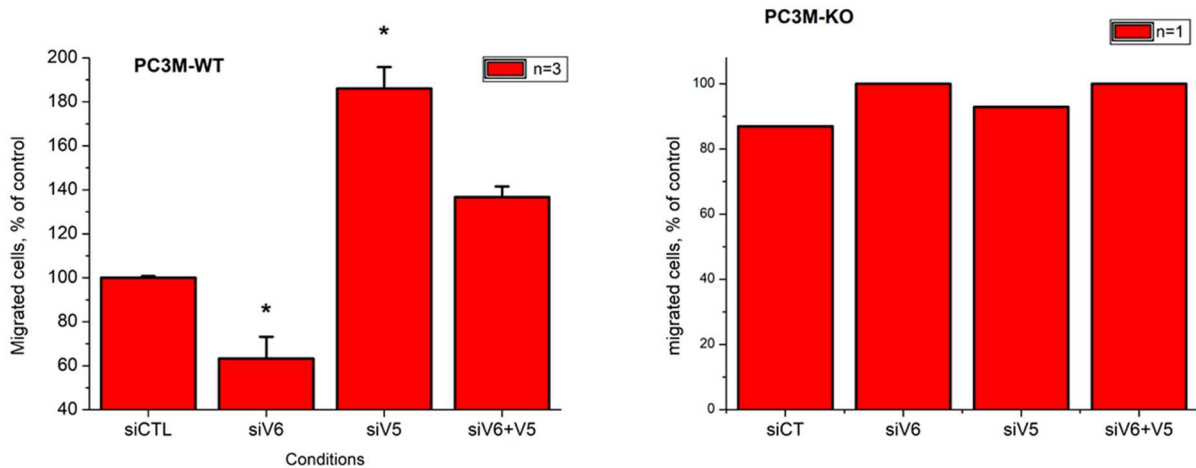


Figure 25. L'inhibition de TRPV6 induit une diminution de la migration basale des cellules cancéreuses prostatiques PC-3M.

*Les cellules sont transfectées par lipofection avec différents siARN à une concentration de 40nM. La migration a été étudiée par test de blessure (wound healing) et analysée grâce au logiciel ImageJ. *- $p < 0,05$.*

Des expériences supplémentaires effectuées avec des chambres de Boyden sur un modèle de lignées cellulaires cancéreuses HAP-1^{trpv6^{-/-}} montre que l'expression de TRPV6 (groupe HAP-1^{trpv6^{-/-}} + pTRPV6wt) augmente significativement les taux de migration basale (pas de différence de concentration de sérum) ainsi que les taux de migration polarisée (les cellules migrent d'un milieu à 2% de sérum à un milieu de 10% sérum). De plus, aucune différence des taux de migration dans le groupe HAP-1^{trpv6^{-/-}} + pTRPV6mut qui exprime le canal TRPV6 non fonctionnel (mutation D541A empêchant la fixation du calcium et ainsi le passage de celui-ci à travers le canal) n'a été observée démontrant qu'il s'agit du calcium entrant via TRPV6 qui active des voies de signalisation impliqués dans la migration et non une interaction entre TRPV6 et une potentielle autre protéine (Figure 26).

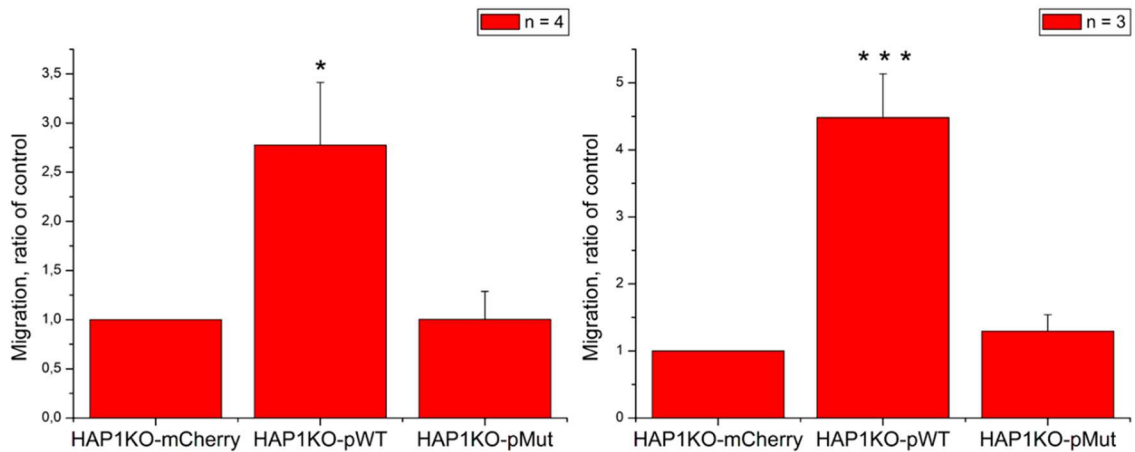


Figure 26. Les cellules exprimant TRPV6 montrent une augmentation des taux de migration basale (gauche) ainsi qu'une augmentation des taux de migration polarisée (droite).

*L'étude de la migration a été suivie par chambre de Boyden et analysée par ImageJ. *- $p < 0,05$;***- $p < 0,001$.*

Enfin, des expériences de suivi du déplacement des cellules PCa par vidéomicroscopie permettent de confirmer les résultats avec une diminution significative du déplacement des cellules PC-3M dont l'expression de TRPV6 est réprimée par siRNA (Figure 27).

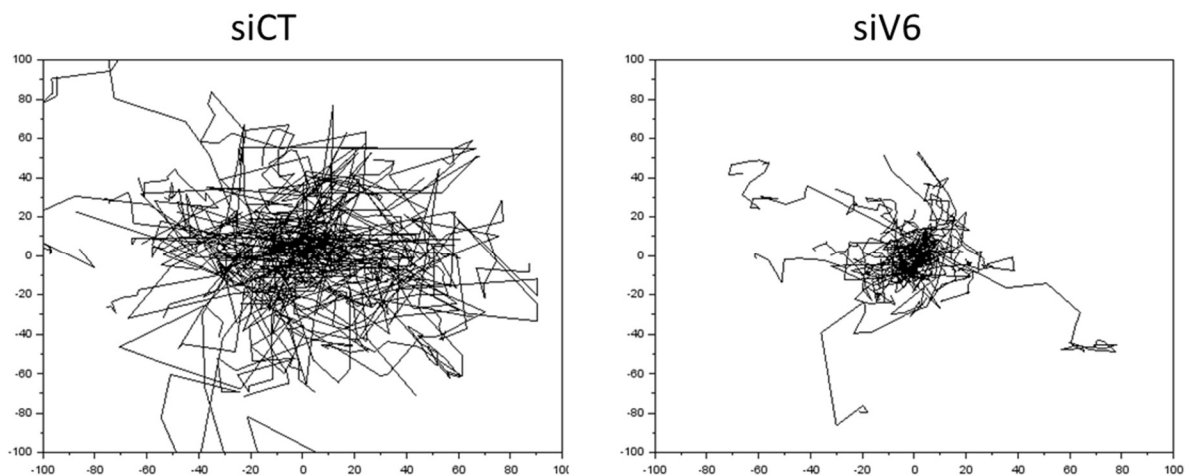


Figure 27. Suivi du déplacement des cellules cancéreuses prostatiques.

Réalisé à l'aide de la coloration des noyaux au Hoechst vital durant 48h par vidéomicroscopie traitées avec soit siCT (gauche) soit siTRPV6 (droite).

DISCUSSION

Les canaux ioniques sont des protéines spécialisées dans le transport des ions. Tous les canaux ioniques, et notamment les canaux TRP, jouent un rôle crucial dans une variété de fonctions physiologiques. En outre, il a été démontré que ces canaux sont associés à plusieurs maladies, dont le cancer. Ils sont désormais considérés comme des marqueurs importants, voire des caractéristiques du cancer (Prevarskaya, Skryma, et Shuba 2010).

Parmi les voies de signalisation modifiées dans la tumorigenèse, celles qui favorisent la prolifération cellulaire et inhibent l'apoptose sont parmi les plus importantes. De nombreuses protéines dans les cellules cancéreuses présentent une expression accrue ou diminuée par rapport à leur niveau d'expression dans les cellules normales. Certaines de ces protéines, codées par des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, jouent un rôle clé dans la tumorigenèse et dans le développement de métastases, tandis que d'autres, dont celles impliquées dans l'homéostasie intracellulaire du Ca^{2+} , sont associées à la morbidité et la mortalité du cancer (Lehen'kyi et Prevarskaya 2011)

La première mention de l'apparition du canal TRPV6 dans certains cancers dont le PCA est apparue au début des années 2000. L'expression du canal TRPV6 a été principalement étudiée par deux équipes, celle de Hediger (J. B. Peng et al. 2000b) et celle de Flockerzi (Wissenbach et al. 2004b). Toutes deux ont utilisé le northern blot comme technique de détection de TRPV6 dans les tumeurs. Bien que la première équipe ait détecté TRPV6 (précédemment appelé CAT1) dans l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) (J.-B. Peng, Brown, et Hediger 2003), la seconde a affirmé que TRPV6 n'était pas détectable dans les tumeurs de la prostate de petite taille et confinées (grade T1) alors que des transcrits de TRPV6 ont été détectés dans 20% des tumeurs classées pT2a et pT2b, 79% des pT3a et dans plus de 90% des pT3b qui présentaient des extensions extra-prostatiques (Fixemer et al. 2003) et également que les transcrits de TRPV6 ne sont pas détectables dans la prostate normale, dans les néoplasies intraépithéliales de la prostate bénigne ou de haut grade (Wissenbach et al. 2004b; Raphaël et al. 2014b).

Nous avons démontré que l'expression de TRPV6 peut également se produire dans les HBP à un niveau relativement faible, environ 50%, et que son expression protéique augmente de manière significative dans les adénocarcinomes ayant un score de Gleason 7 et 9. Le synopsis exhaustif de la présence de TRPV6 dans diverses tumeurs humaines et les techniques

employées pour étudier son expression ont déjà été publiés (V'yacheslav Lehen'kyi, Raphaël, et Prevarskaya 2012).

Les données obtenues précédemment dans le cancer de la prostate permettent de suggérer que le canal TRPV6 est un promoteur de tumeur dans la prostate, étant exprimé de novo. Il contribue significativement à la survie des cellules PCa en facilitant la prolifération et la résistance à l'apoptose, favorise la formation de métastases osseuses, et potentialise la tumorigenèse *in vivo*. Globalement, les preuves croissantes suggèrent que la surexpression du canal calcique TRPV6 est un événement commun dans les cancers d'origine épithéliale. Il a été observé que TRPV6 était régulé à la hausse dans des échantillons de tissus provenant de tumeurs de l'ovaire, de la prostate, du sein, de la thyroïde, du côlon et du pancréas (V'yacheslav Lehen'kyi, Raphaël, et Prevarskaya 2012). Malgré la découverte de son rôle crucial dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses *in vitro*, aucun outil fiable de détection du canal TRPV6 n'a été rapporté jusqu'à présent pour être utilisé dans des applications de diagnostic *in vitro*. En outre, bien qu'aucune isoforme de cette protéine ne soit connue à ce jour, une traduction alternative de cette protéine a déjà été signalée (Fecher-Trost et al. 2013b), et pourrait avoir lieu dans certaines maladies comme le cancer, comme cela a été montré précédemment pour l'autre canal TRP, TRPM8 (Bidaux et al. 2016). Malgré l'échec de la validation de trois des quatre anticorps polyclonaux pour la détection de TRPV6, un outil fiable pour détecter l'expression de TRPV6 est d'une grande importance.

Dans le présent travail, nous montrons la génération et la validation de quatre anticorps polyclonaux de lapin anti-TRPV6 (rb79 à rb82) contre un épitope de 15 acides aminés. Parmi eux, seul un anticorps, rb79, était capable de détecter la forme glycosylée complète du canal TRPV6 autour de 100 kDa puisque ce canal contient un site de N-glycosylation putatif fort comme son analogue proche TRPV5 (Chang et al. 2005 ; Lu et al. 2008). Dans notre modèle cellulaire HAP-1^{trpv6^{-/-}}, l'anticorps généré est toujours capable de détecter une légère bande de la même taille. L'analyse précise a révélé quatre mésappariements au niveau de l'épitope entre les protéines TRPV5 et TRPV6. La bande légèrement visible peut être due à la surexpression de son analogue proche TRPV5 dans le modèle cellulaire HAP-1^{trpv6^{-/-}}.

Le canal épithélial calcique TRPV5 est également un membre du sous-groupe des canaux de la famille des récepteurs à potentiel transitoire (TRP) TRPV. TRPV5 comme TRPV6 joue un rôle majeur dans le maintien des niveaux de Ca²⁺ sanguins chez les organismes supérieurs. Les deux canaux présentent de nombreuses similitudes, puisqu'ils partagent un

niveau élevé (75 %) d'identité d'acides aminés, des propriétés fonctionnelles comparables et des mécanismes de régulation similaires. Les études d'aujourd'hui restent contradictoires sur le rôle de ce canal dans la tumorigénèse humaine. Par exemple, le rôle du TRPV5 a également été étudié (Hartel et al. 2006), et les résultats ont montré que le niveau de TRPV5 a tendance à être associé à la survie des patients. Cependant, la durée de survie prolongée n'était pas significativement associée au TRPV5 seul dans certains cancers (Fan, Shen, et Yuan 2014). TRPV5 était diminué dans le carcinome des cellules rénales (CCR) par rapport aux tissus rénaux normaux, une constatation qui a été corrélée avec l'expression du récepteur de la vitamine D (VDR). Le knockdown de l'expression de TRPV5 a supprimé le changement induit par le knockdown de VDR dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules caki-1. Dans l'ensemble, ces résultats ont confirmé que le VDR fonctionne comme un suppresseur de tumeur dans les cellules du CCR et supprime la prolifération, la migration et l'invasion du CCR en régulant l'expression de TRPV5 (Y. Chen et al. 2018, 5).

L'anticorps rb79 généré s'est révélé adapté à toutes les applications *in vitro*, telles que l'immunoblotting, l'immunoprécipitation, l'immunocytochimie, l'immunofluorescence, etc. L'une des applications les plus importantes que nous démontrons est l'immunohistochimie à partir de coupes en paraffine provenant de spécimens de résection cancéreuse de 21 patients. En utilisant les spécimens de résection du cancer de la prostate, nous avons confirmé l'absence de la protéine TRPV6 dans l'hyperplasie saine et bénigne, ainsi que son expression et sa corrélation avec les grades du cancer de la prostate, comme cela a été rapporté précédemment en utilisant le Northern blot et la PCR. Dans une étude précédente, il a également été montré que l'expression du canal TRPV6 est associée à l'expression des marqueurs d'agressivité tels que Ki-67, PSA, Chromogranine A, CD31, CD56, Synaptophysine, etc... (Raphaël et al. 2014b). Ces données suggèrent que le fait de disposer d'un outil adéquat tel que l'anticorps polyclonal de lapin anti-TRPV6, rb79, permettra son utilisation à des fins de diagnostic.

En conclusion, l'anticorps polyclonal de lapin anti-TRPV6 rb79 généré convient à toutes les applications de diagnostic *in vitro* et en particulier au diagnostic en clinique à partir de coupes de paraffine de patients souffrant de diverses maladies et troubles où les canaux TRPV6 sont impliqués.

Nos résultats avec les anticorps polyclonaux *in vitro* ont confirmé la preuve du concept et montrent que la génération d'anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes

extracellulaires du canal TRPV6 peut être d'une extrême importance dans des questions thérapeutiques telles que le cancer, notamment le PCa. A savoir qu'aujourd'hui, malgré la découverte du rôle crucial de TRPV6 dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses *in vitro*, aucun outil fiable pour cibler le canal TRPV6 *in vivo* n'a été rapporté jusqu'à présent pour être utilisé comme thérapie efficace contre les cancers mentionnés. TRPV6 représente pourtant une cible potentielle dans le traitement du cancer en raison de son implication dans la prolifération des cellules cancéreuses, le développement des métastases et l'inhibition de l'apoptose. Un certain nombre d'inhibiteurs de TRPV6 sont déjà connus et sont mentionnés dans le ciblage de la signalisation calcique dans le cancer (Cui et al. 2017).

Pour le moment, le seul composé anti-TRPV6 étudié au niveau des études cliniques est la Soricidine qui a passé la phase I des essais cliniques, étant sans danger pour les patients humains et toléré jusqu'à 6,2 mg/kg (Fu et al. 2017b). Six cas sur 23 ont été rapportés jusqu'à présent avec des effets secondaires tels que l'hypocalcémie (4 patients), l'anémie (1 patient) et la fibrillation auriculaire (1 patient). En conclusion, la soricidine a de bonnes chances de faire l'objet de nouveaux essais cliniques, ouvrant ainsi la voie à toutes les autres stratégies thérapeutiques anti-TRPV6. Néanmoins, aucun outil fiable ciblant le canal TRPV6 n'a été reporté à ce jour pour être utilisé comme thérapie ciblée contre le cancer.

Dans nos travaux, nous avons misé sur la création d'un outil le plus naturel possible afin de le proposer pour la thérapie avec le moins de toxicité pour un humain. Notre choix a été fait en faveur d'un anticorps monoclonal. Pour cela nous avons suivi un parcours complet depuis la conception et la validation des anticorps *in vitro* à l'aide de tests fonctionnels, tels que le test MTS de survie cellulaire, le comptage cellulaire et les études du cycle cellulaire, les colorations Hoechst, TUNEL et trypan bleu, le patch-clamp et la vidéomicroscopie, jusqu'aux études *in vivo* complètes, à l'aide de l'anticorps monoclonal de souris MAB82, y compris les tests d'occurrence de la tumorigenèse et des métastases.

Nos données suggèrent fortement que malgré des mécanismes d'action différents par rapport au MAB82, les deux anticorps rb79 et rb82 modulent l'activité du canal TRPV6 en l'ouvrant et en laissant davantage de calcium entrer dans la cellule. Selon nos données du patch-clamp, cette entrée massive est due à l'activation continue de TRPV6 sur la membrane plasmique, soit directement par l'anticorps 82, soit indirectement par la stabilisation et l'accumulation du canal sur la membrane plasmique par l'anticorps 79. En effet, il a été démontré que l'activation des canaux calciques va engendrer l'augmentation de l'influx

calcique qui va surcharger les mitochondries en calcium, provoquer la rupture de la membrane interne des mitochondries, libération du cytochrome C avec l'activation de cascade de caspases qui mène à l'apoptose (Dubois, Prevarskaya, et Vanden Abeele 2016; Dubois, Vanden Abeele, et Prevarskaya 2013). Nos données sont également intéressantes du fait de l'utilisation de plusieurs anticorps pertinents de contrôle de même isotype (IgG1 pour le lapin et IgG2a pour la souris), comme les anticorps polyclonaux anti-HA, anti-SERCA2B et anti-GFP.

L'élaboration d'anticorps monoclonaux était une étape cruciale dans l'application de ceux-ci dans des études *in vivo* chez la souris. Malheureusement, les deux tentatives pour créer un MAB contre l'épitope de l'anticorps rb79 n'ont pas été fructueuses, tandis que l'épitope de l'anticorps rb82 a donné des résultats.

Nous démontrons que l'anticorps monoclonal MAB82 ciblant le pore du canal TRPV6 était capable d'inhiber spécifiquement TRPV6, diminuant l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule et entraînant la mort cellulaire par apoptose. Nous avons précédemment montré que l'entrée de Ca(2+) dans les cellules LNCaP est médiée par TRPV6, avec l'activation subséquente en aval du facteur de transcription du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT). Cette entrée de Ca(2+) médiée par TRPV6 est également impliquée dans la survie accrue et la résistance à l'apoptose des cellules LNCaP. L'inhibition de cette entrée, à contrario, provoquerait les effets observés dans nos manipes.

Par conséquent, MAB82 a permis de diminuer significativement la croissance tumorale *in vivo*, diminuant par la même occasion le risque d'apparition de métastases. Nos résultats, étant très encourageants, confirment l'hypothèse développée du début de ma thèse sur les perspectives du ciblage du canal TRPV6 dans les approches thérapeutiques telles que cancer, quelques soit son type et l'origine à une seule condition – l'expression du TRPV6 à la surface de cellules.

Nous avons montré que les anticorps ciblant la partie extracellulaire de TRPV6 sont d'une grande efficacité dans les modèles *in vitro* et *in vivo*. En outre, l'anticorps polyclonal rb79 a montré un intérêt certain dans l'utilisation de celui-ci dans l'étude clinique des cancers de la prostate, marquant la totalité des échantillons de patients atteints du cancer de la prostate alors qu'il ne marque pas du tout la prostate saine. Nos données sont en bonne cohérence par rapport aux données obtenues précédemment par d'autres équipes de recherche dans le monde (J. B. Peng et al. 2000b) et celle de Flockerzi (Wissenbach et al. 2004b).

Les données les plus solides concernent l'utilisation du MAB82 *in vivo* dans le modèle immunodéficient de souris où nos modèles knockout du canal TRPV6 ont été obtenues. Nous avons fourni un ensemble complet de données pour les traitements *in vivo*, avec 2 groupes, des cellules PCa exprimant ou non le canal TRPV6, et dans chaque groupe, 2 sous-groupes pour le traitement, soit avec l'anticorps monoclonal anti-AU1 de souris (contrôle), soit l'anticorps anti-TRPV6 MAB82. La diminution de la taille des tumeurs, le taux de survie et le taux d'apparition des métastases dans le cas de l'anticorps monoclonal de souris anti-TRPV6 MAB82, suggèrent des effets bénéfiques nets émergeant du ciblage du canal TRPV6. De plus, aucune formation de métastase n'a été notée dans le groupe PC-3M^{trpv6-/-}+pmCherry, alors que le potentiel métastatique était de 100% dans le groupe PC-3M^{trpv6-/-}+pTRPV6wt traité avec l'anticorps AU1 de contrôle.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'anticorps monoclonal de souris anti-TRPV6 n°82, MAB82, doit être soumis à une étape supplémentaire de maturation d'affinité, le rendant plus affiné et plus avide quant à la liaison du canal TRPV6, et donc plus efficace *in vivo*, avant son humanisation. L'ingénierie des anticorps à l'aide de la technologie d'affichage, de la conception assistée par ordinateur et de la mutagenèse de site permet d'améliorer diverses propriétés des anticorps thérapeutiques candidats dans le but d'accroître leur sécurité, leur efficacité et leurs possibilités de développement. Ces propriétés comprennent l'affinité et la spécificité de liaison à l'antigène, l'efficacité biologique, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique, l'immunogénicité et les caractéristiques physico-chimiques de développement. Une stratégie du meilleur de sa catégorie peut nécessiter l'optimisation de toutes ces propriétés pour générer un bon anticorps thérapeutique (Wang et al. 2021). En conclusion, le MAB82 généré peut être perfectionné, humanisé et utilisé avec succès chez les patients souffrant de diverses maladies et troubles où le canal TRPV6 est impliqué.

Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'anticorps ciblant TRPV6 chez des patients atteints du cancer de la prostate, ainsi que d'autres cancers exprimant TRPV6, permettrait de diminuer significativement la croissance tumorale. De nombreux cancers présentent une surexpression du canal TRPV6 comme le cancer du côlon, de la thyroïde, du pancréas, du sein, de la parathyroïde ou encore des ovaires, ce qui permet d'ouvrir les possibilités d'action de ces anticorps à d'autres types de cancer mais aussi à d'autres pathologies comme les pancréatites où l'expression de TRPV6 est augmentée. En effet, des études de cytométrie en flux avec MAB82 ont été réalisées sur d'autres types de lignées cellulaires suggérant sa potentielle utilisation dans celles-ci.

De manière intéressante, une étude de phase clinique I utilisant un inhibiteur de TRPV6, SOR-C13 a montré une diminution de la croissance tumorale chez un patient atteint du cancer du pancréas. Celui-ci étant un cancer sans aucune option thérapeutique, l'utilisation d'anticorps anti-TRPV6 pourrait amener à des traitements efficaces chez certains patients (Fu et al. 2017b).

Le fait que canal TRPV6 est exprimé dans les tissus sains semble être un contre-argument. Pourtant, la surexpression de TRPV6 dans les cancers étant largement supérieure à son expression dans les organes sains comme l'intestin (organe où TRPV6 est le plus exprimé physiologiquement), les potentiels effets secondaires seront, s'il y en a, moindre. En effet, l'inhibition complète de TRPV6 chez la souris KO n'empêche pas la viabilité de celle-ci (F. Chen et al. 2014) ce qui suggère une faible toxicité potentielle d'immunothérapie utilisant un anticorps contre TRPV6. Cependant, avant de pouvoir utiliser l'anticorps monoclonal MAB82 chez des patients atteints de PCa, il est nécessaire de procéder à une étape d'humanisation de l'anticorps en modifiant les séquences des chaînes de MAB82 pour éviter que celui-ci soit rejeté dès son entrée dans l'organisme par le système immunitaire. L'humanisation des anticorps est une technologie essentielle pour réduire le risque potentiel d'immunogénicité associé aux anticorps d'origine animale et a été appliquée à une majorité des anticorps thérapeutiques sur le marché. Cependant, pour développer une molécule d'anticorps en tant que produit pharmaceutique au niveau biotechnologique actuel, d'autres propriétés doivent être prises en compte parallèlement à l'humanisation dans la génération et l'optimisation des anticorps (Taichi Kuramochi et al. 2019).

Les propriétés critiques des anticorps thérapeutiques devraient être suffisamment qualifiées, notamment l'immunogénicité, l'affinité de liaison, la stabilité physico-chimique, l'expression dans les cellules hôtes et la pharmacocinétique, ainsi que les méthodologies de base de l'ingénierie des anticorps concernées. En optimisant simultanément les anticorps à ces propriétés, il devrait s'avérer possible de raccourcir la période de recherche et développement nécessaire pour identifier un candidat clinique hautement qualifié et, par conséquent, d'accélérer le début de l'essai clinique (T. Kuramochi et al. 2014).

Dans nos expériences, d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre TRPV6 ont été générés afin que leur efficacité soit testée. En effet, l'élaboration d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre d'autre partie du canal TRPV6 nous permettra d'identifier les anticorps les plus efficaces pouvant être utilisés par la suite en thérapie. Pour cela nous avons

utilisé la technique de « phage display » en utilisant tous les fragments extracellulaires du canal TRPV6. Les bibliothèques d'anticorps par affichage phagique se sont avérées être une ressource inestimable pour l'isolement d'anticorps diagnostiques et potentiellement thérapeutiques, ces derniers étant généralement des fragments d'anticorps convertis en formats IgG (Reader et al. 2019). Les progrès récents dans la production de bibliothèques d'anticorps hautement diversifiés et fonctionnels sont examinés ici, y compris pour les Fab, les scFv et les nanocorps (Valdés-Tresanco et al. 2022). Ces progrès comprennent l'optimisation des codons pendant la génération de la diversité CDR, l'amélioration des niveaux d'affichage en utilisant de nouvelles séquences de signal, des chaperons moléculaires et des isomérases et l'utilisation d'échelles très stables avec des niveaux d'expression relativement élevés. En outre, de nouvelles stratégies pour le reformatage par lots de bibliothèques de phagémides scFv et Fab, dérivées du phage panning, en formats IgG sont décrites (Qi et al. 2012). Ces stratégies permettent le criblage d'anticorps dans le format d'utilisation finale, facilitant ainsi une sélection plus efficace de produits thérapeutiques potentiels.

Pour faire suite à ces résultats, des études précliniques sont nécessaires et seront effectuées, notamment des tests de toxicité sur plusieurs lignées cellulaires (cellules du foie ou du rein par exemple) afin de déterminer les potentiels effets secondaires (TRPV6 étant exprimé principalement dans le tractus digestif). De plus, des tests *in vivo* sur les anticorps les plus prometteurs seront effectués. En effet, les anticorps thérapeutiques et les médicaments nanothérapeutiques suscitent une grande inquiétude en raison de leur utilisation généralisée contre de nombreuses maladies dans le monde. Ils sont fréquemment utilisés pour des thérapies ciblées en partant du principe qu'ils provoquent moins d'effets secondaires que les médicaments non ciblés. Malgré leur spécificité et leur conception particulière pour des actions thérapeutiques, ils peuvent néanmoins avoir des effets indésirables non voulus sur le système immunitaire (Özenver et Efferth 2020). En outre, l'étude des mécanismes d'action précis et des voies de signalisation empruntées est une étape importante pouvant amener à des améliorations pour potentialiser les effets des anticorps anti-TRPV6.

Enfin, il peut être intéressant d'envisager des combinaisons de traitement pour améliorer les effets sur la croissance tumorale. La connaissance croissante de la pathogenèse et des voies moléculaires qui sous-tendent le développement et la progression du cancer conduit à l'introduction de thérapies ciblées, telles que l'inhibiteur du FGFR récemment approuvé, l'Erdafitinib, ou l'anticorps anti-nectine 4 conjugué au médicament, l'Enfortumab vedotin. Les conjugués anticorps-médicament représentent une approche thérapeutique innovante qui

permet d'associer un anticorps monoclonal spécifique du gène, conjugué de manière covalente via un linker à un agent cytotoxique (charge utile) (Ungaro et al. 2022). De plus, les tumeurs de la prostate sont des tumeurs solides où l'un des principaux freins des traitements actuels est l'accessibilité à celles-ci. De multiples mécanismes interdépendants, tels qu'une faible charge mutationnelle tumorale, des cellules immunosuppressives et une immunité cellulaire altérée, semblent bouleverser le système immunitaire, créant un microenvironnement tumoral immunosuppresseur et entraînant une moindre efficacité du traitement dans le cancer avancé de la prostate (Movassaghi et al. 2021). Ainsi, on peut facilement émettre l'hypothèse que l'utilisation de médicaments permettant d'augmenter la vascularisation autour de la tumeur permettrait une meilleure accessibilité de celle-ci par l'anticorps.

La létalité du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration est due à l'absence de régimes thérapeutiques capables de générer des réponses durables. De multiples stratégies sont actuellement testées pour surmonter la résistance immunitaire, notamment en combinant différentes classes de modalités de traitement. Plusieurs essais achevés et en cours ont montré que l'association de vaccins ou d'inhibiteurs de points de contrôle à une hormonothérapie, une radiothérapie, des conjugués anticorps-médicaments, une thérapie par cellules T à récepteur d'antigène chimérique ou une chimiothérapie peut renforcer les réponses immunitaires et induire des réponses cliniques durables sans toxicité significative (Teo et Morris 2016; Paller, Carducci, et Philips 2012; Mukherji, Eichholz, et De Bono 2012).

En conclusion, les données obtenues sont prometteuses et permettent de percevoir le ciblage du canal TRPV6 par ses épitopes extracellulaires comme thérapie potentielle du cancer, notamment le cancer de la prostate. Même si une étude sur ce ciblage est loin d'être finie, le nombre de perspectives est énorme et donne l'espoir que les tumeurs qui expriment le canal TRPV6 peuvent être touchées dans une monothérapie et plus probablement dans une thérapie combinée ayant pour but d'augmenter la survie de patients.

PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux a permis d'ouvrir une grande voie au ciblage de TRPV6 dans de nombreux modèles. Cependant, beaucoup de points restent à développer :


- Etudier les mécanismes d'action spécifique des anticorps qui induisent l'apoptose : Quelle(s) voie(s) de signalisation entre en jeu (voie intrinsèque ou extrinsèque) ? Quelles sont les caspases impliquées ?
- Etudier les mécanismes de migration/invasion pour le canal TRPV6 en identifiant les marqueurs impliqués (FAK, calpaine, Rac1/Cdc42, Rho kinase, MMP2, MMP9 etc...)
- Quel est le rôle de TRPV6 dans la guidage/installation des métastases dans l'os ? Quelle stratégie thérapeutique peut-on utiliser contre les métastases *in vivo* ? Pour cela, il est nécessaire d'étudier les mécanismes d'implication de TRPV6 dans le guidage et/ou l'installation des métastases dans l'os, de cibler et supprimer *in vivo* des tumeurs exprimant TRPV6 en utilisant des modèles différents de xélogreffe de cellules cancéreuses (injections intracardiaques ou intraosseuses).
- Effectuer une étude rétrospective concernant l'utilisation de TRPV6 comme marqueur pronostic pour la formation de métastases.
- Continuer d'étudier le rôle de TRPV6 dans les processus de migration/invasion des cellules PCa à l'aide de technique comme la videomicroscopie ou la technique de transwell en utilisant des matrices extracellulaires.
- Réaliser des co-cultures de clones stables PC-3M^{trpv6-/-} exprimant soit pTRPV6wt(mCherry), soit pTRPV6^{D541A}(mCherry) ou pmCherry avec des cellules de tissu osseux comme SaOs-2 et/ou des cellules d'ostéoblastes humains primaires afin d'étudier le rôle de TRPV6 dans l'installation et la formation de colonies dans la niche osseuse avec possibilité de culture 3D.
- Faire des tests d'adhérence aux cellules humaines endothéliales de moelle osseuse (HBME-1) contre des cellules humaines endothéliales d'une veine ombilicale (HUVEC). En effet, le rôle de certaines protéines membranaires comme les connexines et les glycoprotéines dans le tropisme des cellules PCa dans l'os a été démontré (Boucher et al. 2018). Cependant, ces protéines sont totalement indépendantes de la voie classique CXCL12/CXCR4 connue pour être impliqué dans le guidage des cellules dans l'os (Weidle et al. 2016).
- Des étapes de maturation d'affinité de l'anticorps sont nécessaires (changement des acides aminés au niveau du paratope) pour obtenir un anticorps plus efficace.

- Humaniser l'anticorps MAB82. En effet, avant de pouvoir utiliser l'anticorps monoclonal MAB82 chez des patients atteints de PCa, il est nécessaire de procéder à une étape d'humanisation de l'anticorps en modifiant les séquences des chaînes de l'anticorps.
- À la suite de l'humanisation de l'anticorps, d'autres tests *in vitro* et *in vivo* devront être refaits.
- En parallèle de nos expériences, un phage display a été réalisé permettant d'obtenir 12 nouveaux anticorps ciblant le canal TRPV6 dont l'action devra être testée.
- Etudier le ciblage de TRPV6 par des anticorps monoclonaux dans d'autres pathologies ou cancer.

ANNEXES

Review

Role of the TRPV Channels in the Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis

Aurélien Haustrate ^{1,2}, Natalia Prevarskaya ^{1,2} and V'yacheslav Lehen'kyi ^{1,2,*} 

¹ Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003, Laboratory of Excellence Ion Channels Science and Therapeutics, Department of Biology, Faculty of Science and Technologies, University of Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France; aurelien.haustrate@inserm.fr (A.H.); natacha.prevarskaya@univ-lille.fr (N.P.)

² Univ. Lille, Inserm, U1003 – PHYCEL – Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, France

* Correspondence: vyacheslav.lehenkyi@univ-lille.fr; Tel.: +33-320-337-078

Received: 14 October 2019; Accepted: 21 January 2020; Published: 28 January 2020



Abstract: It has been widely established that transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels play a crucial role in calcium homeostasis in mammalian cells. Modulation of TRPV channels activity can modify their physiological function leading to some diseases and disorders like neurodegeneration, pain, cancer, skin disorders, etc. It should be noted that, despite TRPV channels importance, our knowledge of the TRPV channels functions in cells is mostly limited to their plasma membrane location. However, some TRPV channels were shown to be expressed in the endoplasmic reticulum where their modulation by activators and/or inhibitors was demonstrated to be crucial for intracellular signaling. In this review, we have intended to summarize the poorly studied roles and functions of these channels in the endoplasmic reticulum.

Keywords: TRPV channels; endoplasmic reticulum; calcium signaling

1. Introduction: TRPV Channels Subfamily Overview

Functional TRPV channels are tetrameric complexes and can be both homo or hetero-tetrameric. They can be divided into two groups: TRPV1, TRPV2, TRPV3, and TRPV4 which are thermosensitive channels, and TRPV5 and TRPV6 channels as the second group. TRPVs are important therapeutic targets in view of their role in various disorders such as cancer, neurodegenerative disorders, and pain. They are generally highly selective for calcium (ranging from the ratio 3:1 for TRPV2 to 100:1 for TRPV6).

TRPV channels are expressed in many cell types and tissues and are located mostly on the plasma membrane. A number of studies have been performed as to the role of these channels on the plasma membrane proving that these channels play an important role in calcium homeostasis. Besides, some of them have been also shown to be located in the endoplasmic reticulum (ER). ER is a large calcium store in cells and is definitely involved in calcium-triggered pathways.

In the current review, we focus on the role of the TRPV channels in the ER. Among the TRPV channels found in the ER, there are TRPV1, TRPV2, TRPV3, and TRPV4. TRPV5 and TRPV6 are highly selective calcium channels, which were not shown so far to be expressed in the ER.

2. TRPV1 Channel in ER

TRP vanilloid-1 (TRPV1) is the first and the founding member of the TRPV subfamily and was initially cloned from the rat dorsal root ganglia (DRG) [1]. It can be activated by various stimuli such as temperature (>43 °C), acidic conditions as well as by capsaicin. It has long been recognized that TRPV1 is located on the plasma membrane, serving to non-selectively permeate calcium ions coming from the

extracellular medium into the cytoplasm. Interestingly, the increasing evidence suggests that TRPV1 is also located intracellularly in various cell types such as neurons [2], myocytes [3], and cancer cells [4].

Quantification of calcium flux into TRPV1-overexpressing cells demonstrated that 85 to 90% of functional TRPV1 was expressed on the ER membrane [5]. TRPV1 activation was associated with the changes in the expression of several prototypical ER stress genes in lung cells. TRPV1 activation was shown to promote cytotoxicity via activation of EIF2 α K3, phosphorylation of EIF2 α , and expression of GADD153.

TRPV1 plays an important role in nociceptive neurons. Two vanilloid receptor pools were detected in these neurons: one on the plasma membrane and the other in the endoplasmic reticulum. A study by [6] has characterized this functional significance using calcium imaging in both stably transfected cells and dorsal root ganglion neurons. It has been demonstrated using both TRPV1 activators such as capsaicin or resiniferatoxin, and Ruthenium red to block plasma membrane-localized receptors, that endoplasmic reticulum pool is independent of the plasma membrane pool. Authors also demonstrated that the direct depletion of calcium via activation of the endoplasmic reticulum-localized TRPV1, triggered the store-operated calcium entry.

Activation of TRPV1-expressing insect cells (*Spodoptera frugiperda* (Sf 9)) produced an increase in the cytosolic free Ca²⁺ concentration and, in the absence of extracellular Ca²⁺, there was still an increase in the cytosolic free Ca²⁺ suggesting that intracellular TRPV1 (and not plasma membrane-localized TRPV1) could play an important role in calcium signaling [7]. TRPV1 channel was shown to be localized in the ER using confocal imaging. Moreover, 2-APB has also blocked thapsigargin-induced Ba²⁺ influx, but not that induced by resiniferatoxin. These data suggest that TRPV1 forms agonist-sensitive channels in the ER, which once activated, releases Ca²⁺ from internal stores. However, they do not activate the endogenous store-operated Ca²⁺ entry.

More recently, it was shown that the ER of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels [8]. The sensitivity to capsaicin of ER-localized TRPV1 was smaller than the sensitivity of the plasma membrane-localized TRPV1. However, the precise TRPV1 function in the ER is still misunderstood.

In 2014, Wong et al., reported that ER calcium release by the *Drosophila* TRPV channel Inactive (*Iav*) controlled the synaptic growth, synaptic transmission and presynaptic signaling inside the cell, while contributing to the Ca²⁺ resting levels [9]. The authors genetically screened most *Drosophila* TRP channels for a potential synaptic role at the level of the glutamatergic larval neuromuscular junctions (NMJs) and have found that mutations in *iav* impaired the synaptic growth. On the contrary, the expression of the human TRPV1 in *iav*-deficient motor neurons rescued these defects. *Iav* was also shown to be localized in the ER [9]. Loss of *Iav* resulted in the decreased presynaptic resting [Ca²⁺]_i, as well as in the diminished synaptic transmission and synaptic vesicle release probability.

Furthermore, the activation of ER-localized TRPV1 by endo-vanilloids was able to trigger the ATF3-dependent ER stress pathway, which was sufficient to mediate the death of high-grade astrocytomas [10].

All these data confirm the functional presence of TRPV1 as a Ca²⁺ release channel in the ER (Figure 1).

Capsaicin, the activator of TRPV1, increased the apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma model by inducing ER stress. The use of capsaicin was shown to increase the levels of inositol-requiring 1 enzyme (IRE1), to produce reactive oxygen species (ROS), as well as the expression of GADD153 and GRP78. Furthermore, it increased calcium levels, induced cytochrome c release as well as caspase 3 and 9 activation (Figure 1) [10–12]. The selective cannabinoid type 1 (CB1) receptor agonist seemed to attenuate ER stress both in neurons and in the central nervous system. In fact, this agonist, ACEA, has also been reported to activate TRPV1 channels. While using ACEA and TRPV1 antagonists, the neuroprotective effect of ACEA was shown to be reversed, suggesting that TRPV1 is crucial in neuroprotective effect of ACEA against ER stress [13,14].

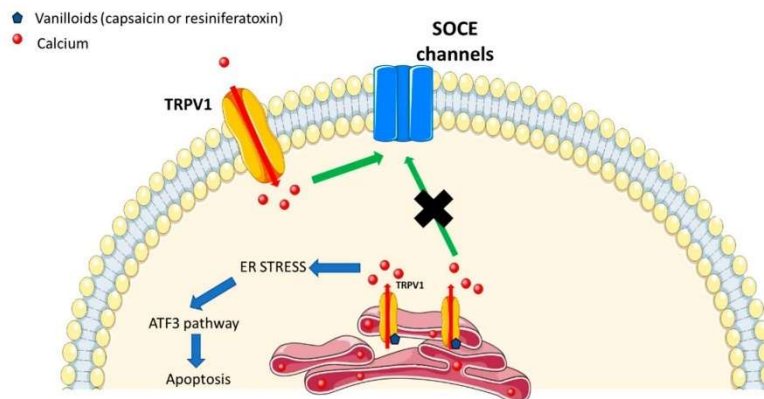


Figure 1. Endoplasmic reticulum-localized transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) plays a different role than the plasma membrane-localized TRPV1 and can activate other calcium pathways.

3. TRPV2 Channel in ER

Transient receptor potential vanilloid type 2, TRPV2, is a non-selective cation-permeable cation channel which is activated by heat ($>52\text{ }^{\circ}\text{C}$), ligands such as cannabidiol [15], 2-APB [16], probenecid [17] as well as mechanical stresses. In most of the cells, a significant amount of TRPV2 is situated in the ER under unstimulated conditions. Upon stimulation of the cells using, for example, phosphatidylinositol 3-kinase-activating ligands, TRPV2 is translocated to the plasma membrane and functions thereon as a cation channel. Mechanical stress was shown to also induce the translocation of the TRPV2 channel to the plasma membrane. The TRPV2 expression was shown to be high in some cell types including neurons, neuroendocrine cells, innate immunity-involved immune cells, as well as in certain types of cancer cells. TRPV2 was shown to modulate various cellular functions in these cells [18–20].

TRPV2 channel is obviously expressed in various tissues including the central nervous system, neuroendocrine cells and epithelial cells in the kidney as well as in the liver [21]. IGF1 induced TRPV2 translocation towards the plasma membrane depending on the activity of the phosphatidylinositol (PI) 3-kinase [22]. Among six members of the TRPV family channels, the expression of only TRPV2 channel was detected in macrophages. TRPV2 channel is mainly localized in the ER [23]. In macrophages, a chemotactic peptide fMLP also induced the translocation of TRPV2 from ER to the plasma membrane. fMLP activated PI 3-kinase by a G protein-dependent mechanism which was sufficient to translocate TRPV2 to the plasma membrane [23].

In Duchenne muscular dystrophy (DMD) myotubes, the store-operated calcium entry (SOCE) was reported to be increased under the influence of calcium/PLC/PKC pathway. Similarly, $\alpha 1$ -syntrophin regulation increased the TRPV2-dependent cation influx [24].

4. TRPV3 Channel in ER

It has been more than 15 years since TRPV3 has been discovered as a heat-sensitive but capsaicin-insensitive channel [25]. It can be activated by physiological temperatures (between $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $39\text{ }^{\circ}\text{C}$) and by selective both endogenous and exogenous compounds such as 2-Aminoethyl diphenylborinate 2-APB [26], diphenylboronic anhydride (DPBA), diphenyltetrahydrofuran (DPTHF), farnesyl pyrophosphate [27]. TRPV3 is widely expressed in physiological conditions, especially in the skin [28] and in the brain [29]. Its expression can be modified leading to disorders such as cancer [30,31].

It has been recently demonstrated using calcium imaging technique that TRPV3 is expressed in the endoplasmic reticulum of Embryonic Stem Cells (ESCs) [32]. In fact, when extracellular calcium is depleted, the cytosolic calcium can be increased using TRPV3 activators but not in the case when ER stores were already depleted. The authors have shown using trypan blue and MTT assays, a decrease in mESC proliferation when TRPV3 was activated. Cell cycle analysis revealed that TRPV3 activation arrested mESCs at G2/M phase [32], suggesting its role in cell cycle control.

Recently, some mutations in TRPV3: G573A, G573S, G573C and W692G have been detected leading to such disorders like Olmsted Syndrome (OS) [33,34] as well as other skin disorders [35]. These mutants were mainly retained in the ER [36] leading to reduced surface localization.

5. TRPV4 Channel in ER

TRPV4 was identified as a mechanosensitive channel [37]. It is involved in the multiple physiologic functions (systemic osmotic pressure, sensory system, skin homeostasis, urinary system, hepatic), dysfunctions (neurological disorders), and diseases. It can be activated by numerous stimuli such as osmotic stress, temperature (>34 °C), and pharmacological compounds. In 2006, Arniges et al. identified five splice variants of TRPV4, sub-divided into two groups. The first group (TRPV4-A and TRPV4-D) was successfully processed in the ER and was targeted to the plasma membrane, while, the second group variants, (TRPV4-B, TRPV4-C, and TRPV4-E) were retained. All alternative spliced variants involved the deletions affecting the ankyrin domains except for TRPV4-D. In fact, ankyrin domains are essential for oligomerization of TRPV4 and lack of oligomerization was shown to be responsible for its accumulation in the ER [38]. The STIM1 protein was demonstrated to associate specifically with the C-terminal tail of TRPV4 to form a complex regulated through phosphorylation of serine824 of TRPV4 [39].

Other data showed the crucial role of C-terminus domain in oligomerization of TRPV4 in the ER [40]. In addition, the C-terminus may also interact with the N-terminus [41]. Wang et al. showed that OS-9, a ubiquitously expressed endoplasmic reticulum (ER)-associated protein, interacted with the cytosolic N-terminal tail of TRPV4. They have found that this protein can block TRPV4 output from the ER and consequently decrease its expression at the plasma membrane. OS-9 bound to monomers and immature TRPV4 variants to decrease polyubiquitination. In fact, OS-9 acted as protector of TRPV4 from ubiquitination and was a modulator of its transport [42].

Protease-activated receptor 2 (PAR2) is expressed on nociceptive neurons, and can induce the sensitization of TRPV4 channels, the activation of PLC β , and the release of inositol trisphosphate (IP3), which stimulates the release of calcium from intracellular calcium stores [43].

Infrared radiations (carried out using an optical fiber) produced an increase in cytosolic calcium concentrations in spiral ganglion neurons which was mediated by the release from intracellular stores. When TRPV4 was blocked, the increase in the cytosolic calcium concentration was abolished suggesting that the activation of TRPV4 channels played a crucial role in the regulation of IR-induced calcium level elevations providing a new tool to deplete intracellular calcium pools [44].

In addition, it was shown that TRPV4, TRPC1, and TRPP2 can assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel [45]. TRPP2 can protect cells from apoptosis while reducing calcium levels in the ER [46], suggesting a complex role of these channels in this mechanism.

6. TRPV5 and TRPV6 Channels

TRPV5 and TRPV6 channels are only highly selective calcium channels inside TRV subfamily. They can form either homo or heterotetramers. Physiologically, TRPV5 is mostly expressed in the kidney and TRPV6 is mostly expressed in the intestine. They were not shown to be expressed in the ER but they can indirectly modify their expression at the plasma membrane. In fact, when calcium is depleted from the ER, this depletion is recognized by STIM1 EF-hand domains. This recognition will permit STIM1 unfolding. In such a way, STIM1 can interact with SOCE channels. Calcium entry provided by SOCE channels will allow for the TRPV6 translocation towards the plasma membrane

by engaging Annexin1/S100A11 complex in prostate cancer cells. TRPV5 and TRPV6 being highly calcium selective and constitutively active, may let a large amount of calcium to enter inside the cell to fill up the calcium pool in the ER. The Annexin1/S100A11 complex may vary depending on the tissue: Annexin1/S100A11 for the prostate cancer [47] and S100A10/Annexin 2 complex in the intestine and the kidney [48].

TRPV6 was also shown to be involved in the apoptosis resistance and proliferation in various cell types [49–51]. It is known that ER stress induced by thapsigargin increased the TRPV6 expression in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. However, the TRPV6 inhibition had no effect on ER stress. Cleaved-ATF6 α caused a significant increase in the TRPV6 protein levels suggesting that ATF6 α pathway may activate TRPV6 expression under the ER stress. TRPV6 overexpression was shown to play a protective role against the ER stress in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. In this case, TRPV6 would decrease JNK activation which is a regulator of the apoptosis induced by the ER stress [52].

7. Relationships between Channels

As an example of the relationship among TRV channel subfamily, odontoblasts have been suggested to contribute to the nociceptive sensation in the tooth via the expression of the transient receptor potential (TRP) channels. TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels were shown to be expressed in native human odontoblasts HODs. The relative intracellular distribution of these three channels was similar while TRPV1, TRPV2, and TRPV3 proteins were preferentially detected in both mitochondria and ER. Thus, HODs could play an important role in mediating pulp thermo-sensation due to the expression of these three TRPV channels. The difference in their relative intracellular distribution may suggest an important role in the sensing of the outer stimuli [53].

The relationships and/or the crosstalks between channels are still not clear and their interaction needs to be further investigated.

8. Conclusions

It should be noted that the precise data about the role and function of TRPV channels have not been established so far. Though the role of only one channel, TRPV1, has been studied so far, our knowledge of all of them is still very poor. Other TRPV channel candidates are likely to be good candidates to be studied, especially TRPV4, which colocalizes together with STIM1—a key regulator of calcium pools in the ER. Many studies still focus on the role of TRP channels on the plasma membrane and their role in the other organelles is poorly elucidated. New techniques can also help to study the further role of ER-localized TRPV channels including, but not limited to, intracellular patch clamp technique and intracellular calcium imaging. Thus, the relationship between TRPV channels and their interaction needs to be further investigated.

Author Contributions: Conceptualization, A.H. and V.L.; methodology, A.H.; validation, A.H., V.L.; formal analysis, N.P.; investigation, A.H.; writing—original draft preparation, A.H.; writing—review and editing, A.H. and V.L.; supervision, N.P. and V.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The researches receive funding from the “Ligue National Contre Cancer”, France.

Acknowledgments: We thank Ms Pauline JEZRAOUI for the valuable administration support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **1997**, *389*, 816–824. [[CrossRef](#)]
2. Szallasi, A.; Blumberg, P.M.; Annicelli, L.L.; Krause, J.E.; Cortright, D.N. The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 581–587. [[CrossRef](#)]

3. Xin, H.; Tanaka, H.; Yamaguchi, M.; Takemori, S.; Nakamura, A.; Kohama, K. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 756–762. [[CrossRef](#)]
4. Sanchez, M.G.; Sanchez, A.M.; Collado, B.; Malagarie-Cazenave, S.; Olea, N.; Carmena, M.J.; Prieto, J.C.; Diaz-Laviada I, I. Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *515*, 20–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Thomas, K.C.; Sabnis, A.S.; Johansen, M.E.; Lanza, D.L.; Moos, P.; Yost, G.S.; Reilly, C.A. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 830–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kárai, L.J.; Russell, J.T.; Iadarola, M.J.; Oláh, Z. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16377–16387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wisnoskey, B.J.; Sinkins, W.G.; Schilling, W.P. Activation of vanilloid receptor type I in the endoplasmic reticulum fails to activate store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem. J.* **2003**, *372*, 517–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gallego-Sandín, S.; Rodríguez-García, A.; Alonso, M.T.; García-Sancho, J. The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 32591–32601. [[CrossRef](#)]
9. Wong, C.-O.; Chen, K.; Lin, Y.Q.; Chao, Y.; Duraine, L.; Lu, Z.; Yoon, W.H.; Sullivan, J.M.; Broadhead, G.T.; Sumner, C.J.; et al. A TRPV channel in Drosophila motor neurons regulates presynaptic resting Ca²⁺ levels, synapse growth, and synaptic transmission. *Neuron* **2014**, *84*, 764–777. [[CrossRef](#)]
10. Stock, K.; Kumar, J.; Synowitz, M.; Petrosino, S.; Imperatore, R.; Smith, E.S.J.; Wend, P.; Purfürst, B.; Nuber, U.A.; Gurok, U.; et al. Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1232–1238. [[CrossRef](#)]
11. Ip, S.-W.; Lan, S.-H.; Lu, H.-F.; Huang, A.-C.; Yang, J.-S.; Lin, J.-P.; Huang, H.-Y.; Lien, J.-C.; Ho, C.-C.; Chiu, C.-F.; et al. Capsaicin mediates apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through mitochondrial depolarization and endoplasmic reticulum stress. *Hum Exp Toxicol* **2012**, *31*, 539–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chien, C.-S.; Ma, K.-H.; Lee, H.-S.; Liu, P.-S.; Li, Y.-H.; Huang, Y.-S.; Chueh, S.-H. Dual effect of capsaicin on cell death in human osteosarcoma G292 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *718*, 350–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vrechi, T.A.; Crunfli, F.; Costa, A.P.; Torráo, A.S. Cannabinoid Receptor Type 1 Agonist ACEA Protects Neurons from Death and Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Related Apoptotic Pathway Signaling. *Neurotox Res* **2018**, *33*, 846–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mecha, M.; Torrao, A.S.; Mestre, L.; Carrillo-Salinas, F.J.; Mechoulam, R.; Guaza, C. Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis* **2012**, *3*, e331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pumroy, R.A.; Samanta, A.; Liu, Y.; Hughes, T.E.; Zhao, S.; Yudin, Y.; Rohacs, T.; Han, S.; Moiseenkova-Bell, V.Y. Molecular mechanism of TRPV2 channel modulation by cannabidiol. *Elife* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gao, L.; Yang, P.; Qin, P.; Lu, Y.; Li, X.; Tian, Q.; Li, Y.; Xie, C.; Tian, J.; Zhang, C.; et al. Selective potentiation of 2-APB-induced activation of TRPV1-3 channels by acid. *Sci Rep* **2016**, *6*, 20791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bang, S.; Kim, K.Y.; Yoo, S.; Lee, S.-H.; Hwang, S.W. Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci. Lett.* **2007**, *425*, 120–125. [[CrossRef](#)]
18. Monet, M.; Lehen, kyi V; Gackiere F; Firlej V; Vandenberghe M; Roudbaraki M, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* **2010**, *70*, 1225–1235. [[CrossRef](#)]
19. Morelli, M.B.; Nabissi, M.; Amantini, C.; Farfariello, V.; Ricci-Vitiani, L.; di Martino, S.; Pallini, R.; Larocca, L.M.; Caprodossi, S.; Santoni, M.; et al. The transient receptor potential vanilloid-2 cation channel impairs glioblastoma stem-like cell proliferation and promotes differentiation. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 1067–1077. [[CrossRef](#)]
20. Santoni, G.; Amantini, C.; Maggi, F.; Marinelli, O.; Santoni, M.; Nabissi, M.; Morelli, M.B. The TRPV2 cation channels: from urothelial cancer invasiveness to glioblastoma multiforme interactome signature. *Lab. Invest.* **2019**. [[CrossRef](#)]
21. Kowase, T.; Nakazato, Y.; Yoko-O, H.; Morikawa, A.; Kojima, I. Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues. *Endocr. J.* **2002**, *49*, 349–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Kanzaki, M.; Zhang, Y.Q.; Mashima, H.; Li, L.; Shibata, H.; Kojima, I. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 165–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nagasawa, M.; Nakagawa, Y.; Tanaka, S.; Kojima, I. Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *210*, 692–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Harisseh, R.; Chatelier, A.; Magaud, C.; Déliot, N.; Constantin, B. Involvement of TRPV2 and SOCE in calcium influx disorder in DMD primary human myotubes with a specific contribution of α 1-syntrophin and PLC/PKC in SOCE regulation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **2013**, *304*, 881–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Smith, G.D.; Gunthorpe, M.J.; Kelsell, R.E.; Hayes, P.D.; Reilly, P.; Facer, P.; Wright, J.E.; Jerman, J.C.; Walhin, J.-P.; Ooi, L.; et al. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **2002**, *418*, 186–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chung, M.-K.; Lee, H.; Mizuno, A.; Suzuki, M.; Caterina, M.J. 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 5177–5182. [[CrossRef](#)]
27. Bang, S.; Yoo, S.; Yang, T.-J.; Cho, H.; Hwang, S.W. Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19362–19371. [[CrossRef](#)]
28. Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Andersson, D.A.; Moqrich, A.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Story, G.M.; Colley, S.; Hogenesch, J.B.; McIntyre, P.; et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **2002**, *296*, 2046–2049. [[CrossRef](#)]
29. Xu, H.; Ramsey, I.S.; Kotecha, S.A.; Moran, M.M.; Chong, J.A.; Lawson, D.; Ge, P.; Lilly, J.; Silos-Santiago, I.; Xie, Y.; et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **2002**, *418*, 181–186. [[CrossRef](#)]
30. Vriens, J.; Janssens, A.; Prenen, J.; Nilius, B.; Wondergem, R. TRPV channels and modulation by hepatocyte growth factor/scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Cell Calcium* **2004**, *36*, 19–28. [[CrossRef](#)]
31. Jariwala, U.; Prescott, J.; Jia, L.; Barski, A.; Pregizer, S.; Cogan, J.P.; Arasheben, A.; Tilley, W.D.; Scher, H.I.; Gerald, W.L.; et al. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol. Cancer* **2007**, *6*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lo, I.C.; Chan, H.C.; Qi, Z.; Ng, K.L.; So, C.; Tsang, S.Y. TRPV3 Channel Negatively Regulates Cell Cycle Progression and Safeguards the Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *J. Cell. Physiol.* **2016**, *231*, 403–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ni, C.; Yan, M.; Zhang, J.; Cheng, R.; Liang, J.; Deng, D.; Wang, Z.; Li, M.; Yao, Z. A novel mutation in TRPV3 gene causes atypical familial Olmsted syndrome. *Sci Rep* **2016**, *6*, 21815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhi, Y.P.; Liu, J.; Han, J.W.; Huang, Y.P.; Gao, Z.Q.; Yang, Y.; Wu, R.N. Two familial cases of Olmsted-like syndrome with a G573V mutation of the TRPV3 gene. *Clin. Exp. Dermatol.* **2016**, *41*, 510–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Qu, Y.; Wang, G.; Sun, X.; Wang, K. Inhibition of the Warm Temperature-Activated Ca²⁺-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel Attenuates Atopic Dermatitis. *Mol. Pharmacol.* **2019**, *96*, 393–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yadav, M.; Goswami, C. TRPV3 mutants causing Olmsted Syndrome induce impaired cell adhesion and nonfunctional lysosomes. *Channels (Austin)* **2017**, *11*, 196–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Delany, N.S.; Hurlle, M.; Facer, P.; Alnadaf, T.; Plumpton, C.; Kinghorn, I.; See, C.G.; Costigan, M.; Anand, P.; Woolf, C.J.; et al. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol. Genomics* **2001**, *4*, 165–174. [[CrossRef](#)]
38. Arniges, M.; Fernández-Fernández, J.M.; Albrecht, N.; Schaefer, M.; Valverde, M.A. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1580–1586. [[CrossRef](#)]
39. Shin, S.H.; Lee, E.J.; Chun, J.; Hyun, S.; Kang, S.S. Phosphorylation on TRPV4 Serine 824 Regulates Interaction with STIM1. *Open Biochem J* **2015**, *9*, 24–33. [[CrossRef](#)]
40. Becker, D.; Müller, M.; Leuner, K.; Jendrach, M. The C-terminal domain of TRPV4 is essential for plasma membrane localization. *Mol. Membr. Biol.* **2008**, *25*, 139–151. [[CrossRef](#)]
41. Lei, L.; Cao, X.; Yang, F.; Shi, D.-J.; Tang, Y.-Q.; Zheng, J.; Wang, K. A TRPV4 channel C-terminal folding recognition domain critical for trafficking and function. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10427–10439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Beraud, E. T cell vaccination in autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, *636*, 124–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Grant, A.D.; Cottrell, G.S.; Amadesi, S.; Trevisani, M.; Nicoletti, P.; Materazzi, S.; Altier, C.; Cenac, N.; Zamponi, G.W.; Bautista-Cruz, F.; et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J. Physiol. (Lond.)* **2007**, *578*, 715–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Barrett, J.N.; Rincon, S.; Singh, J.; Matthewman, C.; Pasos, J.; Barrett, E.F.; Rajguru, S.M. Pulsed infrared releases Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum of cultured spiral ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* **2018**, *120*, 509–524. [[CrossRef](#)]
45. Du, J.; Ma, X.; Shen, B.; Huang, Y.; Birnbaumer, L.; Yao, X. TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *FASEB J.* **2014**, *28*, 4677–4685. [[CrossRef](#)]
46. Wegierski, T.; Steffl, D.; Kopp, C.; Tauber, R.; Buchholz, B.; Nitschke, R.; Kuehn, E.W.; Walz, G.; Köttgen, M. TRPP2 channels regulate apoptosis through the Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **2009**, *28*, 490–499. [[CrossRef](#)]
47. Raphaël, M.; Lehen'kyi, V.; Vandenberghe, M.; Beck, B.; Khalimonchik, S.; Vanden Abeele, F.; Farsetti, L.; Germain, E.; Bokhobza, A.; Mihalache, A.; et al. TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orail-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 3870–3879. [[CrossRef](#)]
48. Van de Graaf, S.F.J.; Hoenderop, J.G.J.; Gkika, D.; Lamers, D.; Prenen, J.; Rescher, U.; Gerke, V.; Staub, O.; Nilius, B.; Bindels, R.J.M. Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* **2003**, *22*, 1478–1487. [[CrossRef](#)]
49. Lau, J.K.; Brown, K.C.; Dom, A.M.; Witte, T.R.; Thornhill, B.A.; Crabtree, C.M.; Perry, H.E.; Brown, J.M.; Ball, J.G.; Creel, R.G.; et al. Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. *Apoptosis* **2014**, *19*, 1190–1201. [[CrossRef](#)]
50. Chow, J.; Norng, M.; Zhang, J.; Chai, J. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells—Mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 565–576. [[CrossRef](#)]
51. Lehen'kyi, V.; Flourakis, M.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **2007**, *26*, 7380–7385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Li, Z.; Meng, Z.; Lu, J.; Chen, F.M.; Wong, W.-T.; Tse, G.; Zheng, C.; Keung, W.; Tse, K.; Li, R.A.; et al. TRPV6 protects ER stress-induced apoptosis via ATF6 α -TRPV6-JNK pathway in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2018**, *120*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wen, W.; Que, K.; Zang, C.; Wen, J.; Sun, G.; Zhao, Z.; Li, Y. Expression and distribution of three transient receptor potential vanilloid (TRPV) channel proteins in human odontoblast-like cells. *J. Mol. Histol.* **2017**, *48*, 367–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Monoclonal Antibodies Targeting Ion Channels and Their Therapeutic Potential

Aurélien Haustrate¹, Aline Hantute-Ghesquier¹, Natalia Prevorskaya¹
and Vyacheslav Lehen'kyi^{1,2*}

¹Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003, Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics, Department of Biology, Faculty of Science and Technologies, University of Lille, Villeneuve d'Ascq, France, ²FONDATION ARC, Villejuif, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jean-François Desaphy,
University of Bari Aldo Moro,
Italy

Reviewed by:

Theodore R. Cummins,
Indiana University Bloomington,
United States
Ciro Leonardo Pierri,
University of Bari Aldo Moro,
Italy

*Correspondence:

Vyacheslav Lehen'kyi
vyacheslav.lehenkyi@univ-lille.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacology of Ion Channels and
Channelopathies,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 08 November 2018

Accepted: 14 May 2019

Published: 05 June 2019

Citation:

Haustrate A, Hantute-Ghesquier A,
Prevorskaya N and Lehen'kyi V
(2019) Monoclonal Antibodies
Targeting Ion Channels and
Their Therapeutic Potential.
Front. Pharmacol. 10:606.
doi: 10.3389/fphar.2019.00606

Monoclonal antibodies (mAbs) represent a rapidly growing pharmaceutical class of protein drugs that becomes an important part of the precision therapy. mAbs are characterized by their high specificity and affinity for the target antigen, which is mostly present on the cell surface. Ion channels are a large family of transmembrane proteins that control ion transport across the cell membrane. They are involved in almost all biological processes in both health and disease and are widely considered as prospective targets. However, no antibody-based drug targeting ion channel has been developed so far that has progressed to clinical use. Thus, we provide a comprehensive review of the elaborated mAbs against ion channels, describe their mechanisms of action, and discuss their therapeutic potential.

Keywords: monoclonal antibody, ion channel, mechanism, targeting, therapy

MONOCLONAL ANTIBODIES AND ION CHANNELS TO DATE

Since the first appearance of the therapeutic monoclonal antibody (mAb) (Orthoclone OKT3) in early 1986, this class of biopharmaceutical agents has significantly expanded, reaching more than 70 mAb products (76 for 2017, **Table 1**, inspired from: <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>), which were approved in the US or Europe for the treatment of various diseases and disorders (Ecker et al., 2015). If the approval rate will be the same, i.e., of approximately four to five new products per year, around 80 mAb drugs will appear on the market by 2020, and overall worldwide sales will be more than \$125 billion (Shalini Shahani, 2017).

Ion channels are considered as attractive targets since they are present on the plasma membrane and are potentially accessible by the soluble membrane-impermeable therapeutic drugs such as antibodies. They also constitute the third bestselling group of prescribed drugs (Wickenden et al., 2012). Irrespective of this apparent success in the use of pharmacological tools against ion channels, only some of the predicted in the human genome 400 ion channel genes have been targeted to date (Bagal et al., 2013). Despite the advantage of the targeting ion channels using antibodies because of their high specificity, unfortunately, no antibody-based drug has been developed to date and used in clinics, though some of them have already been engaged in clinical trials and are discussed below.

ION CHANNELS AS PROSPECTIVE THERAPEUTIC TARGETS

There is no biological process to mention that does not involve an ion channel or ion flux. Ion channels constitute a wide family of transmembrane proteins that allow ion flux inside and outside of the cell.

TABLE 1 | Monoclonal antibodies (mAbs) approved by the EMA and FDA for therapeutic use.

International nonproprietary name (INN)	Target	Type	Year of first FDA approval	Therapeutic indication(s)
Avelumab	PD-L1	Human IgG1/κ	2017	Metastatic Merkel cell carcinoma
Dupilumab	IL-4Ra	Human IgG4	2017	Asthma; dermatitis
Durvalumab	PD-L1	Human IgG1/κ	2017	Metastatic urothelial carcinoma
Ocrelizumab	CD20	Humanized IgG1κ	2017	Multiple sclerosis
Brodalumab	IL-17RA	Human IgG2/κ	2017	Psoriasis
Bezlotoxumab	<i>C. difficile</i> toxin B	Human monoclonal antitoxin antibody	2016	Enterocolitis; pseudomembranous
Adalimumab	TNFα	Human IgG1	2016	Arthritis; juvenile rheumatoid arthritis; psoriatic arthritis; rheumatoid colitis; ulcerative Crohn's disease; psoriasis; spondylitis; ankylosing
Reslizumab	IL-5	Human IgG4/κ	2016	Asthma
Olaratumab	PDGFR-α	Human IgG1	2016	Sarcoma
Obiltoximab	PA component of <i>B. anthracis</i> toxin	Chimeric (mouse/human) IgG1/κ	2016	Anthrax infection
Infliximab	TNFα	Chimeric human-murine IgG1	2016	Spondylitis; ankylosing; arthritis; rheumatoid colitis; ulcerative
Atezolizumab	PD-L1	Human IgG1	2016	Metastatic non-small cell lung cancer
Daratumumab	CD38	Human IgG1/κ	2015	Multiple myeloma
Elotuzumab	SLAMF7	Human IgG1	2015	Multiple myeloma
Necitumumab	EGFR	Human IgG1	2015	Carcinoma, non-small-cell lung
Secukinumab	Interleukin-17A	Human IgG1/κ	2015	Arthritis; psoriatic psoriasis; spondylitis; ankylosing
Mepolizumab	IL-5	Human IgG1/κ	2015	Asthma
Nivolumab	PD-1	Human IgG4	2015	Carcinoma; non-small-cell lung carcinoma; renal cell Hodgkin disease melanoma
Alirocumab	PCSK9	Human IgG1	2015	Dyslipidemias
Idarucizumab	Dabigatran etexilate	Human Fab	2015	Hemorrhage
Evolocumab	LDL-C/PCSK9	Human IgG2	2015	Dyslipidemias; hypercholesterolemia
Dinutuximab (1)	GD2	Human IgG1/κ	2015	Neuroblastoma
Bevacizumab	CD19	BITEs	2014	Precursor cell lymphoblastic leukemia-lymphoma
Pembrolizumab	PD-1	Human IgG4	2014	Melanoma
Ramucirumab	VEGF	Human IgG1	2014	Stomach neoplasms
Vedolizumab	Integrin-α4β7	Humanized IgG1	2014	Colitis; ulcerative Crohn's disease
Siltuximab	cCLB8	Chimeric IgG1κ	2014	Giant lymph node hyperplasia
Alemtuzumab	CD52	Humanized IgG1	2014	Multiple sclerosis
Trastuzumab emtansine	HER2	Humanized IgG1 as ADC	2013	Breast cancer
Obinutuzumab	CD20	Humanized IgG1	2013	CLL
Raxibacumab	<i>Bacillus anthracis</i> protective antigen	Human IgG1	2012	Prevention and treatment of inhalation anthrax
Pertuzumab	HER2	Humanized IgG1	2012	Breast cancer
Infliximab	TNF-alpha	Chimeric IgG1 Ab	Not approved (approved in 1997 by EU EMA)	Spondylitis; ankylosing arthritis; rheumatoid colitis; ulcerative Crohn's disease; arthritis; psoriatic psoriasis
Brentuximab	CD30 (conjugate of Mab and MMAE)	Chimeric IgG1 as ADC (antibody drug conjugate)	2011	Hodgkin lymphoma (HL), systemic anaplastic large cell lymphoma (ALCL)
Belimumab	BLyS	Human IgG1	2011	Systemic lupus erythematosus (SLE)
Ipilimumab	CTLA-4	Human IgG1	2011	Melanoma
Denosumab	RANKL	Human IgG2	2011	Prevention of SREs in patients with bone metastases from solid tumors
Tocilizumab	IL-6 receptor	Humanized IgG1	2010	Rheumatoid arthritis
Denosumab	RANKL	Human IgG2	2010	Osteoporosis
Ofatumumab	CD20	Human IgG1	2009	Chronic lymphocytic leukemia
Besilesomab	NCA-95	Murine IgG1	Not approved (approved in 1997 by EU EMA)	<i>In vivo</i> diagnosis of inflammation/infection sites via scintigraphic imaging → nontherapeutic
Canakinumab	IL-1β	Human IgG1	2009	Cryopyrin-associated periodic syndromes including familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome; tumor necrosis factor receptor associated periodic syndrome (TRAPS); hyperimmunoglobulin D Syndrome (HIDS)/mevalonate kinase deficiency (MKD) and familial Mediterranean fever (FMF)
Golimumab	TNFα	Human IgG1	2009	Rheumatoid arthritis; psoriatic arthritis; ankylosing spondylitis
Ustekinumab	IL-12/IL-23	Human IgG1	2009	Plaque psoriasis
Certolizumab pegol	TNFα	Humanized IgG Fab fragment	2008	Crohn's disease; rheumatoid arthritis
Catumaxomab	EpCAM and CD3	Trifunctional MAb IgG2a/IgG2b	Not approved	Malignant ascites in patients with EpCAM-positive carcinomas

(Continued)

TABLE 1 | Continued

International nonproprietary name (INN)	Target	Type	Year of first FDA approval	Therapeutic indication(s)
Eculizumab	Complement C5	Humanized IgG2/4	2007	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Ranibizumab	VEGF-A	Humanized IgG1 Fab fragment	2006	Neovascular (wet) age-related macular degeneration; macular edema following retinal vein occlusion
Panitumumab	EGFR	Human IgG2	2006	Metastatic colorectal carcinoma
Catumaxomab	EpCAM	Humanized MAb	2005	Head and neck cancer
Natalizumab	VLA-4	Humanized IgG4	2004	Multiple sclerosis (relapsing); Crohn's disease
Cetuximab	EGFR	Chimeric IgG1	2004	Head and neck cancer; colorectal cancer
Fanolesomab	CD15	Murine MAb	2004	Imaging of equivocal appendicitis → nontherapeutic
Bevacizumab	VEGF	Humanized IgG1	2004	Metastatic colorectal cancer; non-small cell lung cancer; metastatic breast cancer; glioblastoma multiforme; metastatic renal cell carcinoma
Omalizumab	IgE	Humanized IgG1	2003	Asthma
Tositumomab and iodine 131 tositumomab	CD20	Murine IgG2a	2003	Non-Hodgkin's lymphoma
Efalizumab (2)	CD11a	Humanized IgG1	2003	Psoriasis
Ibritumomab tiuxetan	CD20	Murine IgG1	2002	Non-Hodgkin's lymphoma
Adalimumab	TNF α	Human IgG1	2002	Rheumatoid arthritis; juvenile idiopathic arthritis; psoriatic arthritis; ankylosing spondylitis; Crohn's disease, plaque psoriasis
Alemtuzumab	CD52	Humanized IgG1	2001	B-cell chronic lymphocytic leukemia
Gemtuzumab ozogamicin (3)	CD33	Humanized IgG4/toxin conjugate	2000	Acute myeloid leukemia (AML)
Trastuzumab	HER-2	Humanized IgG1	1998	Breast cancer; metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma
Infliximab	TNF α	Chimeric IgG1	1998	Crohn's disease; ulcerative colitis; rheumatoid arthritis; ankylosing spondylitis; psoriatic arthritis; plaque psoriasis
Basiliximab	CD25 (a chain of IL2 receptor)	Chimeric IgG1	1998	Reversal of transplantation rejection
Palivizumab	F-protein of RS virus	Humanized IgG1	1998	Respiratory syncytial virus (RSV)
Necitumumab (4)	CD25 (a chain of IL2 receptor)	Humanized IgG1	1997	Reversal of transplantation rejection
Rituximab	CD20	Chimeric IgG1	1997	Non-Hodgkin's lymphoma; chronic lymphocytic leukemia; rheumatoid arthritis
Votumumab (5)	Cytokeratin tumor-associated antigen		Not approved	Detection of carcinoma of the colon or rectum → nontherapeutic
Sulesomab	NCA90	Murine Fab fragment	Not approved	Diagnostic imaging for osteomyelitis → nontherapeutic
Arcitumomab (6)	Human CEA (carcinoembryonic antigen)	Murine Fab fragment	1996	Detection of colorectal cancer → nontherapeutic
Imicromab (7)	Human cardiac myosin	Murine Fab fragment	1996	Myocardial infarction imaging agent → nontherapeutic
Capromab	Tumor surface antigen	Murine MAb	1996	Detection of prostate adenocarcinoma → nontherapeutic
Nofetumomab	Carcinoma-associated antigen	Murine Fab fragment	1996	Diagnostic imaging of small-cell lung cancer → nontherapeutic
Abciximab (8)	GP1Ib/IIIA	Chimeric IgG1 Fab	1994	High-risk angioplasty (prevention of blood clots)
Satumomab	TAG-72	Murine MAb	1992	Detection of colorectal and ovarian cancers → nontherapeutic
Muromonab-CD3	CD3	Murine IgG2a	1986	Transplantation rejection

(1): Unituxin has been withdrawn from use in the European Union.
 (2): Raptiva® was approved in 2003 by the FDA and in 2004 by the EMA. It was voluntarily withdrawn from the market in EU in 2009 and in US in 2009.
 (3): Mylotarg® was approved in 2000 by the FDA. It was voluntarily withdrawn from the market in US in 2010.
 (4): Zenapax® was approved in 1997 by the FDA and in 1999 by the EMA. It was withdrawn from the market for commercial reasons in EU in 2009 and in US in 2009.
 (5): Humaspect® was approved in 1998 by the EMA. It was withdrawn from the market in EU in 2003.
 (6): CEA-scan was approved in 1996 by the FDA and by the EMA. It was withdrawn from the market in EU in 2005.
 (7): Myoscin® has been discontinued.
 (8): Country-specific approval (prior to EMA Centralized Procedure).
 PD-L1, Programmed death-ligand 1; IgG1, immunoglobulin G, subclass 1; IL-4R α , interleukin 4 receptor alpha; IgG4, immunoglobulin G, subclass 4; CD20, B-lymphocyte antigen CD20; IL-17RA, interleukin 17 receptor A; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-5, interleukin 5; PDGFR- α , platelet-derived growth factor receptor A; PA, protective antigen; CD38, cluster of differentiation 38; SLAMF7, SLAM family member 7; EGFR, epidermal growth factor receptor; PD-1, programmed cell death protein 1; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Fab, fragment antigen-binding; LDL-C, low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; GD2, disialoganglioside; BITES, bi-specific T-cell engagers; VEGF, vascular endothelial growth factor; CD2, cluster of differentiation 2; CD3, cluster of differentiation 3; IgG2a, immunoglobulin G, subclass 2, isotype a; TAG-72, tumor-associated glycoprotein 72; MAb, monoclonal antibody; GP1Ib/IIIA, glycoprotein IIb/IIIa; IgG1, immunoglobulin G, subclass 1; PSMA, prostate-specific membrane antigen; NCA90, membrane glycoprotein p95; CD25, interleukin-2 receptor alpha chain; RS, retinoschisin; IL2, interleukin 2; HER-2, human epidermal growth factor receptor 2; CD33, sialic acid binding Ig-like lectin 3; CD52, cluster of differentiation 52; EGFR, epidermal growth factor receptor; VILA-4, Very Late Antigen-4; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; IL-12, interleukin 12; IL-23, interleukin 23; IL-1 β , interleukin 16; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; BLyS, B lymphocyte stimulator; MMAE, monomethyl auristatin E; LDL-C, low-density lipoprotein; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; SLAMF7, SLAM family member 7; SLAMF7, SLAM family member 7; SRE, skeletal-related events; CLL, chronic lymphocytic leukemia; EMA, European Medicines Agency; FDA, Food and Drug Administration.

They differ by their structure, their specificity for ion, and also their activation mode and mode of action. Indeed, some of them are highly specific for a particular ion, such as calcium for transient receptor potential vanilloid family member 6 (TRPV6), or sodium for Nav1.7, while others allow the flux of all the ions or just cations. Moreover, they can be activated by many stimuli like ligand binding, voltage change, osmotic change, temperature, and so on (Clapham et al., 2001). According to the activation mode and where they are expressed, we can speculate their function in the body. Actually, ion channels participate in lots of cellular process: contraction, secretion, apoptosis, migration, gene transcription, and so forth. Thus, it is not surprising to find them involved in numerous physiopathologies like cancer, pain, autoimmune diseases, and cystic fibrosis (Smani et al., 2015). Moreover, these proteins constitute a preferential target for the development of therapeutic agents since they are present on the surface of the plasma membrane and are potentially accessible by the soluble membrane-impermeable therapeutic drugs such as antibodies.

Several treatments targeting ion channels have been developed but still show a lack of specificity and side effects (Lynch et al., 2017). A novel therapeutic approach to answer this issue is mAb. However, nowadays, only few mAbs have been generated (Wilkinson et al., 2015). In this article, we review the already published mAbs targeting the extracellular region of ion channels classified according to their ion selectivity and highlight their potential application in human therapeutics.

CALCIUM CHANNELS

The voltage-gated calcium channels constitute a wide range of channels that are mostly permeable for calcium and largely expressed in excitable cells such as neurons and muscles. They are activated by a depolarization of the plasma membrane and are involved in a lot of cellular functions like muscular contraction, neuronal excitation, modulation of gene expression, release of hormones or neurotransmitters, and so on. This family is composed of several types of voltage-gated calcium channels (L, P, N, R, and T type) differentiated by voltage, their preferential localization, and subunits composition (Catterall and Swanson, 2015). They are all similar, but display structural and pharmacological differences.

In 2013, a 1B50-1 mAb was reported, which specifically binds to the $\alpha 2\delta 1$ subunit (isoform 5) of voltage-gated calcium channels that is crucial in maintenance of tumor-initiating cell (TIC) properties in the case of hepatocellular carcinoma, which is a common malignancy worldwide, having poor prognosis and limited therapeutic efficacy (Lee et al., 2013). It has been shown that this mAb detects TICs of hepatocellular carcinoma with stem-cell-like properties (Zhao et al., 2013). These $\alpha 2\delta 1$ subunits, *via* modulating calcium oscillation amplitude, allow the impact of L-type and N-type calcium channel-mediated Ca^{2+} -signalization [such as phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)] and thereby maintain the properties of TICs. Interestingly, the use of this mAb, in addition to be a functional liver TIC marker, has therapeutic properties on these cells by eliminating TICs and suppressing sphere (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) formation *in vitro* (a marker of cancer stem cell and aggressivity). In fact, by using terminal deoxynucleotidyl

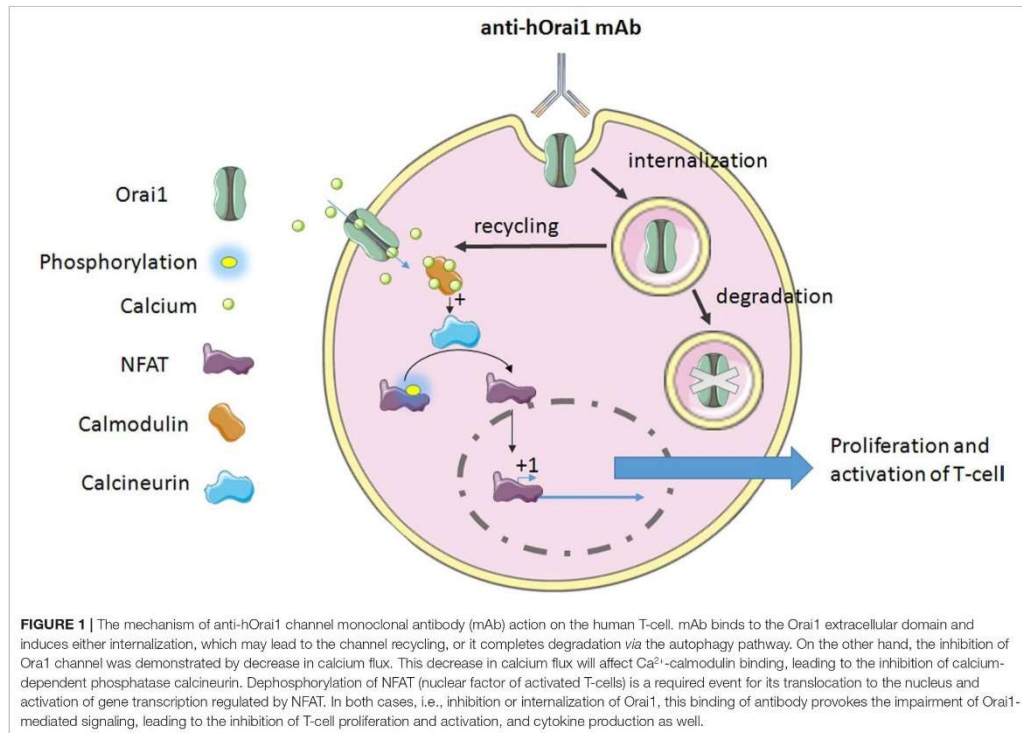
transferase (dUTP) nick-end labeling (TUNEL) assay, they have demonstrated that 1B50-1 treatment induced apoptosis of 1B50-1⁺ cells. Moreover, 1B50-1 treatment by intraperitoneal injection reduced tumor growth and increased TICs death *in vivo*. The data demonstrated that 1B50-1 has a therapeutic effect on hepatocellular carcinoma by targeting TICs, though it is always difficult to obtain complete pharmacokinetic control *in vivo* with an antibody alone, most likely because of inefficient penetration of the antibody to the cells inside the tumor mass and because of the presence of other transit-amplifying tumorigenic cells (Zhao et al., 2013). Thus, this antibody constitutes a promising therapy to target cells involved in the recurrence of hepatocellular carcinoma.

T-cell activation, proliferation, and cytokine production require Orail-mediated calcium signaling (Feske et al., 2006; Gwack et al., 2008). Cox and collaborators have developed a specific anti-human Orail mAb, Orail1, a reactive clone, 10F8, targeting the second extracellular loop of the protein expressed on the lymphocytes (Cox et al., 2013). This mAb leads to the reduction of calcium flux through the internalization of the channel in lymphocytes (Figure 1). Actually, it is the only mechanism of internalization or retrograde trafficking shown so far. This process usually includes a dynein motor, which is strongly implicated in the retrograde trafficking of ion channels in endosomes from the cell surface (Choi et al., 2005), and leads to either degradation or recycling (Balse and Boycott, 2017).

Thus, anti-Orail mAb leads to an inhibition in T-cell proliferation and cytokine production *in vitro*. Orail1 was shown to be overexpressed in rheumatoid arthritis, a long-term autoimmune disease causing inflammation, swelling, and pain in and around the joints and other body organs (Liu et al., 2014), where the suppression of T-cell proliferation and cytokine production could be highly beneficial. This mAb has been tested on the cells isolated from rheumatoid arthritis patients and has shown the same efficacy. The same results were observed following the treatment [intraperitoneal (i.p) injection 10 mg/kg three times per week] *in vivo*, in a human T-cell-mediated graft-versus-host disease (GvHD) mouse model (Cox et al., 2013), suggesting its potential use for the human therapy *in vivo*.

Another team has generated high-affinity 100% human mAbs to human Orail1. This mAb binds to hOrail1 in its native conformation by targeting the extracellular loop 2 [notably, amino acids 210 to 217 of the hOrail1 extracellular loop 2 (ECL2) region] and displays an inhibitory activity (Lin et al., 2013). This leads to the inhibition in a dose-dependent manner of the current mediated by Orail1 and so that of the store-operated Ca^{2+} influx, seen in the whole-cell configuration patch clamp. Hence, the signal that comes out from this current is impaired. Indeed, NFAT transcription, studied by NFAT-Luciferase Reporter Assay, and cytokine release (IL-2 and IFN- γ) are disturbed too (Figure 1). In autoimmune disease, the use of such an mAb could be a novel therapeutic approach to reduce T-cell response and delay the manifestation of the disease.

Anti-Orail1 mAb from Cox and collaborators was used at 2–3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for *in vitro* tests and binding to primary immune cells [cluster differentiation (CD)3+CD4+, CD3+CD8+, and CD19+] from the peripheral blood of a healthy individual using 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antibody. Meanwhile, the *in vivo* dose of the treated humanized NOD/Shi-scid/IL-2R γ null (NOG) mice was 10 mg/kg,



while the antibody from Lin and collaborators was used at ~500 nM (75 µg/ml) and ~0.05 µg/ml for the study of inhibitory concentration 50 (IC₅₀) of anti-Orai1 mAbs in inhibiting interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma (IFN γ) release in human whole blood (corresponding to ~32 µg/kg of the average 60-kg human). These data can be compared to those from the use of anti-tumor necrosis factor alpha (TNF α) mAb, infliximab, which are of 10 or 50 mg/kg in preclinical assays in rodents (Derzi et al., 2016), and later in humans from 3 to 5 mg/kg for rheumatoid and psoriatic arthritis as intravenous (i.v.) injections (www.medscape.com).

NONSELECTIVE CATION CHANNELS

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a nonselective cation channel that is expressed in nerve terminals innervating the skin, and more precisely in neurons of the dorsal root and trigeminal ganglia (Elitt et al., 2006; Obata et al., 2005). This channel is involved in pain. Indeed agonists such as mustard oil drive pain or neurogenic inflammation, both in human and in rodents (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004). Additionally, a gain-of-function mutation in TRPA1 was linked to familial episodic pain syndrome by a human genetics study (Kremeyer et al., 2010).

Familial episodic pain syndrome is a rare, genetic, peripheral neuropathy disorder characterized by recurrent, stereotyped, episodic intense pain, occurring predominantly in either the upper body or lower limbs in several members of a family, which is triggered or exacerbated by fatigue, cold exposure, fasting, weather changes, and/or physical stress (www.orpha.net). This channel was also strongly suspected to play a role in pathophysiology like asthma, itch, and cough (Geppetti et al., 2010; Taylor-Clark et al., 2009; Viana and Ferrer-Montiel, 2009).

TRPA1 antagonist could be considered as potential therapeutics in these pathologies. In this context, mAbs to human TRPA1 have been generated. Of them, mAb 2B10 is the most potent. Like the others, it acts as an antagonist in a concentration-dependent manner of multiple modes of TRPA1 activation [allyl isothiocyanate (AITC), cold, and osmotic change]. For AITC and cold (4°C) TRPA1 activation, IC₅₀ values of approximately 260 and 90 nM for either flow cytometry assay or agonist-induced ⁴⁵Ca²⁺ uptake assays, respectively, are obtained. It also blocked TRPA1 activation by osmotic change *via* hypotonicity with IC₅₀ values of 350 ± 60 nM, as well as activation by an endogenous agonist (4-oxo-2-nonenal). The maximal inhibition observed in the AITC-induced ⁴⁵Ca²⁺ uptake assay of the TRPA1-mediated current was approximately 70%. The well-known antagonist, AMG9090 (acting *via* covalent modification of cysteine residues),

totally blocked it, and thus is more effective than this mAb. The authors state that mAbs were not able to completely abolish AITC-induced TRPA1 activation (70% only), suggesting that 2B10 and 2D1 may only partially stabilize the channel conformation in the closed state, although the possibility that the mAbs act as partial pore blockers of TRPA1 cannot be completely excluded. This fact compromises the possibility to develop it as a therapeutic perspective (Lee et al., 2014b).

The nonselective cation channel TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) has several activation modes. Indeed, it can be activated by chemical ligands (capsaicin, anandamide, and acidity) and heat (>42°C); thus, it plays a role of integrator of multiple noxious stimuli and so is important in nociception (Caterina et al., 1999; Davis et al., 2000). Its role in clinical pain is clearly established, while the use of TRPV1 antagonist inhibits bone cancer pain (Ghilardi et al., 2005), which is common in patients with advanced breast, prostate, and lung cancer (Jimenez-Andrade et al., 2010), as well as in hyperalgesia in models of inflammatory pain (Honore et al., 2005).

In the other study by Klionsky and collaborators, an mAb binding to a small epitope of 39 amino acids, which corresponds to the entire prepore region of human TRPV1 (Thr⁵⁹⁸–Cys⁶³⁶), has been generated (Klionsky et al., 2006). A rabbit anti-rat TRPV1 polyclonal antibody (Ab-156H) acted as a full antagonist of proton activation (IC₅₀ values for pH 5 and 5.5 were 364.68 ± 29.78 and 28.31 ± 6.30 nM, respectively) and as a partial antagonist of capsaicin, heat, and pH 6 potentiated chemical ligand (anandamide and capsaicin) activation (50–79% inhibition). Binding of the mAb to TRPV1 did not block the activation by either capsaicin or protons and, consistently with it, had no consequences on the stability of the channel conformation as shown by agonist-induced ⁴⁵Ca²⁺ uptake assays on Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing TRPV1. On the contrary, rabbit polyclonal antibodies against rat and human TRPV1 prepore region seem to partially lock or stabilize the channel in the closed state (Klionsky et al., 2006).

CONNEXINS

Connexins are proteins consisting of the assembly of six units, which form hemichannels at the cell surface. This structure can itself be active and allow exchanges between cytoplasm and extracellular space such as ion flux or allow the transfer of small molecules lower than 1–2 kDa, or usually form a gap junction by dimerization (Oshima, 2014; Revel et al., 1985). Both play a role in several physiological and pathological responses. The specific targeting of one or the other would allow one to distinguish the specific role of each of them. Indeed, despite the ubiquitous expression of connexins, some subtypes, such as 21 in humans, display changes in their expression in some tissues or tumors (Saez et al., 2003).

A specific Cx43 antibody [Connexin 43(E2) antibody], has been developed by Baklaushev and collaborators, which targets the second extracellular loop of Cx43 (Baklaushev et al., 2009). Initially, it was used for immunofluorescent analysis using preparations of both fixed and living cultures of rat, human glioma cells, and rat brain with experimental glioma. It was shown to

specifically detect connexin hemichannels on the cell membranes and not dimer connexins, characteristic of gap junctions.

Connexin 43(E2) antibody prevents the opening of Cx43 hemichannels and thus blocks the hemichannels. Moreover, it prevents docking interaction, inhibits N-cadherin interaction, and reduces gap junction plaque size (Bao et al., 2011). The authors found that treatment with anti-Cx43 E2 (112 µg/ml), which suppresses Cx43 docking, significantly inhibited the kinetics of human KGN granulosa cells and normal human fibroblast self-assembly compared to the preimmune sera control (41.1 ± 4.5% and 24.5 ± 10.4% at 8 h, respectively).

Additionally, while blocking Cx43 hemichannels, it disturbed cell–cell communication, and could, by this way, prevent the release of small molecules such as prostaglandins and thus impair cell function (Siller-Jackson et al., 2008). Moreover, this mAb could be labeled with the fluorescent molecules and used for detection and staining of tumor cells highly expressing Cx43 on the cell surface, such as glioma cells. Recent findings demonstrate that connexins play an important role in the microenvironment of malignant glioma and that Cx43 is capable of conferring chemotherapeutic resistance to glioblastoma cells (Grek et al., 2018).

P2XR RECEPTOR CATION CHANNEL FAMILY

The P2X receptor family, also named adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X receptor cation channel family, is composed of monovalent cation-permeable ligand-gated ion channels to be activated by extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Valera et al., 1994). This family is encoded by seven genes in vertebrates, and they are largely distributed in the body. Some of them are implicated in pain feeling owing to the fact that they are predominantly expressed in nociceptive sensory neurons (Chen et al., 1995). Indeed, under pathological conditions, an increase in extracellular ATP leads to P2X receptor (P2XR) activation and pain signaling initiation (North, 2002). Thus, they constitute selective targets in some disorders such as neuropathic pain, which is pain caused by the damage or disease affecting the somatosensory nervous system and are usually associated with the abnormal sensations called dysesthesia or pain from normally nonpainful stimuli, i.e., allodynia.

mAbs against several isoforms of P2X receptor were developed. In their study, Shcherbatko and collaborators generated several mAbs directed against human P2X3. Depending on the homomeric or heteromeric composition of receptor (homomeric P2X3 or heteromeric P2X2/P2X3 receptors), as well as on its kinetic state and the duration of mAb action, different functional effects were observed (Shcherbatko et al., 2016). For example, 12D4 antibody had an IC₅₀ of 16 nM while acting on an hP2X3 receptor for up to 18 min, while monoclonal hP2X3 antibodies inhibited recombinant rat P2X3 receptors, giving an IC₅₀ of 185.5 ± 41.7. In such a way, mAb binds to the hP2X3 channel in its inactivated state and inhibits its activity. Surprisingly, with the same short-term exposure, this antibody potentiated the slow inactivated current mediated by the heteromeric human P2X2/P2X3 channel. Positive effects of mAb12D4 in a rat model of inflammatory pain suggest that mAb

against P2X3 would be a prospective therapy in visceral pain symptoms, where pain occurs when pain receptors in the pelvis, abdomen, chest, or intestines are activated and may be accompanied by symptoms such as nausea, vomiting, changes in vital signs, as well as emotional manifestations (Sikandar and Dickenson, 2012).

An mAb against P2X4 receptor was also generated (Igawa et al., 2013). P2X4 receptor is known to be involved in neuropathic pain and notably in the allodynia after peripheral nerve injury (Nasu-Tada et al., 2006). This antibody has a strict recognition for P2X4 receptor including S-S formation in the extracellular domain. This was proved while detecting and immunoprecipitating rat P2X4 receptors in cultured cells. Such an mAb can be used as a tool in order to detect an increasing expression of P2X4 receptors related to increasing intensity of neuropathic pain (Igawa et al., 2013).

Finally, a 150-kDa specific mAb for human P2X7 receptor was generated (Buell et al., 1998). Its specificity of binding has been assessed in immunohistochemical studies on human lymphoid tissue by both immunoprecipitation and also by flow cytometry using XS63-transfected cells and human-blood-derived macrophage cells such as monocytes, known to express natively P2X7 receptors. The analysis of binding to HEK293 cells expressing other P2Xs such as P2X1 allows one to demonstrate the high specificity of the binding for the P2X7 receptor. This antibody acts as a selective antagonist of this receptor as shown by reduced response to a brief application of 2',3'-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP in cells expressing human P2X7 demonstrated in whole-cell configuration of the patch clamp. Indeed, a significantly reduced release of interleukin-1 β was observed in THP-1 cells. In addition, this mAb successfully detects endogenous receptor with a high specificity (the estimated IC₅₀ value was about 5 nmol/L) and can be used for the detection in Western blotting. The data also suggested that the antibody recognizes a specific conformational epitope (Buell et al., 1998).

Recently, another mAb named BPM09 was shown as specifically targeting the E-200 epitope of nP2X7, a nonpore functional form of P2X7 (Gilbert et al., 2017). Interestingly, this epitope is found only in cancerous cells (those from prostate, neuroblastoma, melanoma, breast, stomach, pancreas, colorectal, bladder, renal, etc.), not in normal cells, and this form is essential for cancer cell viability. This fact constitutes an advantage in terms of therapeutic perspective. Indeed, this receptor was shown to be upregulated in several cancers such as breast cancer, the third cause of mortality due to cancer in humans, and allows enhanced tumor growth (Gilbert et al., 2019). In the latter studies, a phase I clinical trial was conducted, yielding promising results using sheep polyclonal antibody against nP2X7 (BIL010t)-based ointment as a therapeutic for basal cell carcinoma, which is an abnormal, uncontrolled growth or lesion arising in the skin's basal cells; there are more than 4 million cases of basal cell carcinoma diagnosed in the U.S. each year (www.skincancer.org). Independent preclinical toxicology studies were performed in minipigs. These studies, conducted for 28-day and 90-day periods, demonstrated that the ointment was well tolerated (data not available). In addition, nanobodies against mouse P2X7 have been generated and characterized, which effectively blocked (13A7) or potentiated (14D5) gating of the channel in addition to nanobody Dano1, which specifically inhibited human P2X7

(Danquah et al., 2016). Indeed, nanobodies from six distinct families either blocked or enhanced both ATP-mediated and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-mediated activation of P2X7. The most potent blocker, nanobody 13A7 (IC₅₀ = 12 nM), and the most potent enhancer, nanobody 14D5 (EC₅₀ = 6 nM), were used in the study. However, all these studies were conducted using mouse models so far and further studies are needed to prove their efficiency in humans.

POTASSIUM CHANNELS

The human Eag1 (hEag1), is a voltage-gated potassium channel named K_v10.1 (Eag1) specifically expressed in the brain and in myoblasts (Gutman et al., 2005). This plasma membrane channel, encoded by the *kcnh1* gene, is modulated during the cell cycle (Brüggemann et al., 1997; Pardo et al., 1998). It is involved in several cellular processes such as cell excitability, memory processes, and cell proliferation (Saganich et al., 1999; Ufartes et al., 2013). In pathophysiology, it is overexpressed in more than 70% of tumors of several origin and so was suggested to be involved in tumorigenesis (Hemmerlein et al., 2006; Ouadid-Ahidouch et al., 2016). Thus, it constitutes a promising molecular target in cancer therapies or diagnostics.

In such a way, an anti-Kv10.1 mAb (mAb62) was used to target tumor cells *in vitro* using the human breast MDA-MB-435S cell line and *in vivo* on tumor models of nude mice (Napp et al., 2016). The authors demonstrated the specific binding and accumulation of the mAb62 in the tumors *in vivo* for at least 1 week due to the labeling with Cy5.5 fluorophore.

Another interesting mAb against hEag1 is mAb56. It recognizes two domains including E3 segment (residues 374 to 452) and tetramerizing coiled-coil domain (residues 872 to 932) (Ju and Wray, 2002; Schönherr et al., 2002). The latter allows specific binding to hEag1 and not to its closest homologue, hEag2 (73% amino acid sequence identity). The distinctive feature of this antibody is its antagonist effect on this channel, giving an IC₅₀ value of mAb56 in HEK293 cells of 73 \pm 47 nmol/L. Indeed, it selectively blocks hEag1 function. Inhibition of the potassium current mediated by hEag1 leads not only to a clear anti-proliferative activity *in vitro* but also to a decrease in tumor cell growth *in vivo* (ovarian, breast, cervical, colon, pancreas carcinoma, melanoma, and fibrosarcoma) (Gómez-Varela et al., 2007). Another antibody directed against the carboxyl (COOH)-terminal region of Eag1 (mAb33) had no effect on tumor growth compared to mAb56. Thus, the therapeutic potential of this mAb is very high.

N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTOR

The N-methyl-D-aspartate receptor, also named NMDA receptor (NMDAR), is an ionotropic glutamate receptor found in nerve cells in which it acts as an ion channel protein that is nonselective to cations (Luini et al., 1981). It plays an essential role in the control of synaptic plasticity and memory function (Morris et al., 1990). Indeed Ca²⁺ flux through NMDARs is essential for

long-term potentiation (LTP), which is a cellular mechanism for learning and memory (Furukawa et al., 2005; Li and Tsien, 2009). The modulation of such receptor affects persistent neuronal plasticity requiring *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated transmission. It is well known that NMDAR antagonist impaired hippocampus-dependent learning (Morris et al., 2013).

Thomson and collaborators have developed an mAb, B6B21 (IC₅₀ values of 1.6 μM), about 150 kDa, which targets NMDAR and acts as an enhancer of the receptor (Thompson et al., 1992). Actually, it enhances the opening of its ionic channel in a glycine-like fashion in displacing glycine. Because of this, it also improved LTP in hippocampal slices. Moreover, intraventricular infusions of this mAb in rabbit enhances acquisition in hippocampus-dependent tasks (Haring et al., 1991), such as hippocampus-related memory and cognitive function. B6B21 treatment resulted in a 45% reduction in the number of trials required to reach 80% conditioned responses and reductions in other operational measures of learning.

The development of peptide mimetics, derived from B6B21, may be potentially used as cognitive enhancers and protectors from hypoxic and ischemic insults exerted onto the neurons caused by stroke and epilepsy and also in cognitive disorder therapies. However, these peptide mimetics would likely exacerbate issues relating to hypoxia and ischemic insults. It should be taken into consideration that overstimulation of NMDAR known to impair early brain development *in vivo* observable in schizophrenia (Aida et al., 2012) is also involved in neuronal death hypoxia, ischemic injury, and stroke, due to inward calcium flux (Choi and Rothman, 1990). Hence, the use of such mAb could be have some deleterious side effects and have to be taken into account. On the other hand, Rapastinel (GLYX-13), a tetrapeptide derived from B6B21, displayed long-lasting antidepressant effects demonstrated in the human clinical trial (Moskal et al., 2017). Its clearance was rapid in normal human volunteers following *i.v.* administration *via* the antecubital vein over the dose range 0.5–25 mg/kg, and the plasma half-life was short, approximately 10 min. Thus, GLYX-13 appears to be promising because it seems to act rapidly with antidepressant effects that persist for approximately a week in humans and show no psychotomimetic side effects.

Another mAb that specially binds amino acids 657–678 of the extracellular domain of NR1 subunit has been developed (Amrutkar et al., 2012). Using resin-bound peptides, the authors identified a peptide sequence RNPSDK (amino acids 673–678 for the epitope) where the N-terminal arginine residue is essential for reactivity. It is situated in the extracellular S2 domain of the NR1 subunit. They showed that the antibody reactivity was dependent on a positively charged amino acid in addition to noncovalent backbone interactions (Amrutkar et al., 2012). However, neither further investigations nor characterization of this antibody was reported since then.

SODIUM CHANNELS

In humans, the family of voltage-gated sodium (NaV) channels is composed of nine highly homologous NaV channels

(NaV1.1–NaV1.9). They were shown to control the upstroke of the action potentials in excitable cells, whereas the NaV1.7 encoded by the *scn9a* gene seems to be involved in pain and itch modulation (Snyder et al., 2014). Indeed, it has been reported that a loss-of-function mutation in *scn9a* genes drive congenital inability to sense pain and anosmia, the inability to perceive odor or a lack of functioning olfaction (Cox et al., 2006; Weiss et al., 2011). On the contrary, gain-of-function mutations were shown to lead to episodic pain (Fertleman et al., 2006).

Moreover Lee and collaborators revealed that a mAb targeting the S3–S4 loop of domain II of NaV1.7, *i.e.*, the voltage-sensor paddle, inhibits this channel with high selectivity (IC₅₀ values of 30.7 nM). This mechanism lies in the stabilization of a closed state in a state-dependent manner (Lee et al., 2014a). That phenomenon was demonstrated by patch-clamp recordings using the whole-cell voltage clamp configuration on hNaV1.7 channels expressed in a transient manner in HEK293 cells. Using this mAb has allowed one to abolish inflammatory and neuropathic pain passing by central and peripheral mechanisms (intrathecal and systemic routes, respectively). Also, this antibody was shown to suppress nociceptive synaptic transmission in pinal cord dorsal horn as well as to reduce acute and chronic itch in mice (including chronic itch-potentiated synaptic transmission). All these effects are channel activity-dependent, as shown by the absence of effect of the control mAb that targets the S1–S2 loop of the channel. Thus, this mAb possesses considerable analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain including acute and chronic itch mouse models. This mAb could be employed in therapy for suppressing pain and itch (Lee et al., 2014a).

However, Liu et al. also showed that this antibody is not more efficient than the isotype-matched control antibody, IgG1 (Liu et al., 2016). In this study, they generated a recombinant SVmab1 (rSVmab1), using publicly available sequence information and the peptide VELFLADVEG, corresponding to a peptide loop between DII S3 and S4, as an antigen. This purified antibody did not specifically bind the S3–S4 loop and did not specifically inhibit the NaV1.7 current (Liu et al., 2016). Reductions in the NaV1.7 current were comparable when using an isotype control IgG1 or recombinant SVmab1 at 500 nM. These contradictory data could be due to the purification of the recombinant mAb from HEK293 6E cells that could induce differences in chain antibody sequences. Moreover, different glycosylation levels of the channel according to cell lines can lead to variable epitope accessibility.

CONCLUDING REMARKS

Ion channels represent important therapeutic targets being mainly targeted by small molecules so far, which are always a compromise regarding their multispecificity and IC₅₀'s. Antibodies are a growing alternative of important protein therapeutic drugs that can be employed as effective treatment alternatives for diseases and disorders such as cancer, inflammation, pain, impaired memory, and autoimmunity.

Antibodies, especially mAbs, constitute significant advantages because of their protein structure and biochemical properties that

can be conventionally modified. Those are affinity, avidity, paratop 3D structure improvement, as well as Fc structure to engage complement reaction, all *via* antibody engineering and affinity maturation procedures. On the other hand, some disadvantages of using mAbs as therapeutics, such as their cost (high cost for production and low storage life), route of administration (only intraperitoneal or intravenous), and inability to cross the blood-brain barrier, can be impediments to antibody use.

Moreover, it has been demonstrated that mAbs can be used as experimental tools to study ion channel impact on the cell phenotype. Unfortunately, no antibody against ion channel to be used for therapeutic applications has been developed so far, which makes this approach continuously challenging. It can be explained that ion channels are actually quite difficult to target with Abs because their extracellular domains are very conservative among various species and thus are not antigenic. Another point other than peptide antigen is the case where conformational epitope is needed, which requires a significant quantity of the whole protein in its native conformation. Data summary on the already developed mAbs against ion channels and their prospective therapeutic applications is included in **Table 2**.

mAbs can also be used as conjugates, i.e., conjugated to toxic compounds or radioisotopes, or linked to the T-cell receptor

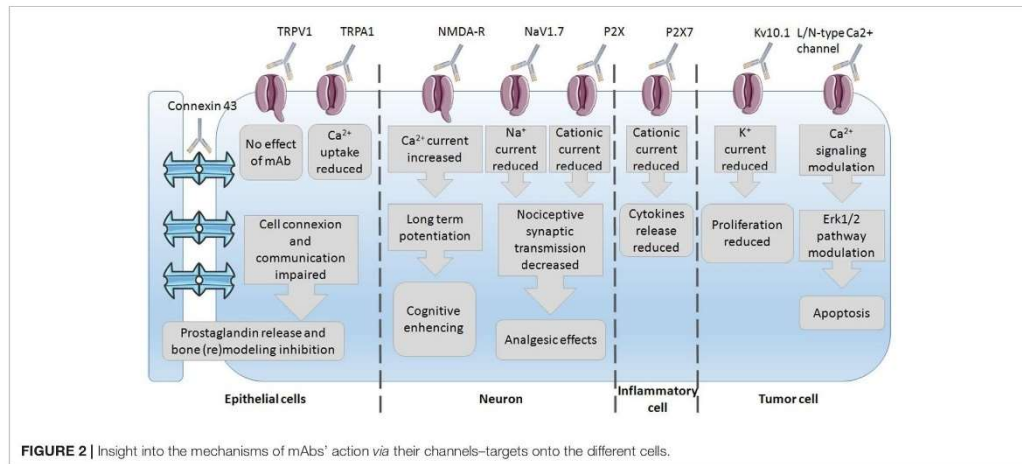
[so-called chimeric antigen receptor T-cell therapy (CAR-T) technology] to directly kill tumors or induce T-cell-mediated tumor cell destruction. They can be covalently linked to potent cytotoxic or cytostatic agents, including small-molecule drugs or inactive forms of a biological toxin. The antibody can deliver the toxin to the tumor cell that will endocytose the antibody-toxin complex and induce enzymatic cleavage and the release of the drug, yielding an active cytotoxic form and thus killing the tumor cell.

Since mAbs have been used as experimental tools to study ion channel impact on the cell phenotype, several studies have already been conducted on the discovery of the underlying mechanisms of mAb action. The most common mechanisms of action observed are the reduction in ion current and thus modulation of the underlying pathways (**Figure 2**). These were mostly studied in epithelial, neuron, immune, and tumor cells with subsequent phenotype changes such as bone (re)modeling inhibition, cognitive enhancing, analgesic effects, reduction in proliferation, and induction of apoptosis. This wide variety of effects again highlights the importance of ion channels and their regulation of the phenotype control *via* mAbs. Little is known on mAb binding to any ion channel, and unfortunately, no crystal structure of antibody-channel complexes formed

TABLE 2 | Summarizing data on the developed mAbs against ion channels and their therapeutic potential.

Target	Channel type	Antigen	mAb function	Therapeutic potential	References
L- and N-type calcium channel	Voltage-gated calcium channel	Isoform 5 of $\alpha 2\delta 1$ subunits	Inhibitor used at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>in vitro</i>)	Hepatocellular carcinoma	(Zhao et al., 2013)
Orai1	Calcium release activated channel	Extracellular loop 2	Inhibitor (induces internalization) used at 10 mg/kg in mice three times per week in i.p. IC50 value: 90 nM	Autoimmune disease	(Cox et al., 2013; Lin et al., 2013)
TRPA1	Transient receptor potential channel	Epitope unknown		Inflammatory and neuropathic pain	(Lee et al., 2014b)
TRPV1	Transient receptor potential channel	Prepore region	Antagonist used at 88.5–266.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Thermal hyperalgesia in diabetic pain	(Klionsky et al., 2006)
Connexin 43	Nonselective	Second extracellular loop	Inhibitor used at 56–112 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>in vitro</i>)	Detection of glioma cells in breast cancer	(Bao et al., 2011)
P2X3	Ligand-gated ion channel	Exact epitope unknown	Inhibitor used at 30 mg/kg in i.v.	Visceral pain	(Shcherbatko et al., 2016)
P2X4	Ligand-gated ion channel	Between 100 and 180 residue of the protein	Detection only	Neuropathic pain (allodynia)	(Iigawa et al., 2013)
P2X7	Ligand-gated ion channel	Extracellular loop of the native protein	Antagonist 0.01–1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for <i>in vitro</i> studies	Data nonavailable	(Buell et al., 1998)
Kv10.1	Voltage-gated potassium channel	E3 domain of the channel	Used at $\approx 833 \mu\text{g}/\text{kg}$ in mice in i.v.	Labeling cancer cells (showed in breast cancer)	(Napp et al., 2016)
Kv10.1	Voltage-gated potassium channel	E3 segment and tetramerizing coiled coil	Antagonist used at 25 mg/kg in mice in i.p. weekly	Pancreas and breast cancer	(Gómez-Varela et al., 2007; Ju and Wray, 2002; Schönherr et al., 2002)
NMDA receptor	Ligand-gated ion channel	Epitope not disclosed (dentate gyrus used as immunogen)	Enhancer	Cognitive disorder	(Haring et al., 1991; Thompson et al., 1992)
NMDA receptor	Ligand-gated ion channel	Amino acids 657–678 in the extracellular S2 domain of NR1 subunit	Recognition only	Autoimmune disease	(Amrutkar et al., 2012)
Nav1.7	Voltage-gated sodium channel	S3–S4 loop of domain II	Antagonist used at 10–50 mg/kg (i.v.), 50 μg (intraplantar) and 1–10 μg (intrathecal) in mice	Inflammatory and neuropathic pain	(Lee et al., 2014a)

NMDA, *N*-methyl-*D*-aspartate; TRPA1, transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1; TRPV1, transient receptor potential; vanilloid subfamily, member 1; i.p., intraperitoneal; and i.v. intravenous.



is available so far. For example, the mechanism of action of infliximab, a TNF- α inhibitor, primarily involves Fab-mediated antigen neutralization (Lee et al., 2017). The mechanism of infliximab action was shown to be the destruction of TNF- α producing cells through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The Fc region of the infliximab immune complex binds to the Fc γ receptor (Fc γ R) on immune cells, leading to the lysis of target cells bound by the antibody Fab region, i.e., *via* ADCC.

Finally, 3D modeling of proteins for which X-ray crystallography is not available yet or computational approaches for protein function prediction using a combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening are of particular importance (Pierri et al., 2010). In the case of antibodies, molecular modeling is primarily employed for improving antibody-antigen affinity (or affinity maturation) using mutagenesis of antibody complementarity-determining regions (CDR) through *in silico* mutagenesis and the following assays on the bench (Hou et al., 2008; Pierri et al., 2016). Due to the available crystallization of three antibodies, the possibility of reconstructing a complete mAb sequence

model based on the available templates I1GT (Harris et al., 1997), I1GY (Harris et al., 1998), and 1HZH (Saphire et al., 2001) is open to date for studying both antibody-channel interactions. Thus, the positive dynamics of anti-ion channel mAb research domains is likely to become exponential in the foreseeable future.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AH—writing of the basic version and preparing figures and tables. AH—doing all the revision amendments of the manuscript. NP—revising of the basic version and advices. VL—concept, supervision, and final version.

FUNDING

This work was supported by Association de Recherche pour le Cancer, ARC (n°PJA 20161204599).

REFERENCES

- Aida, T., Ito, Y., Takahashi, Y. K., and Tanaka, K. (2012). Overstimulation of NMDA receptors impairs early brain development *in vivo*. *PLoS One* 7, e36853. doi: 10.1371/journal.pone.0036853
- Amrutkar, S. D., Trier, N. H., Hansen, P. R., and Houen, G. (2012). Fine mapping of a monoclonal antibody to the N-methyl d-aspartate receptor reveals a short linear epitope. *Biopolymers* 98, 567–575. doi: 10.1002/bip.22165
- Bagal, S. K., Brown, A. D., Cox, P. J., Omoto, K., Owen, R. M., Pryde, D. C., et al. (2013). Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. *J. Med. Chem.* 56, 593–624. doi: 10.1021/jm3011433
- Baklaushev, V. P., Gurina, O. I., Yusubaliev, G. M., Grinenko, N. F., Cytrin, E. B., Victorov, I. V., et al. (2009). Immunofluorescent analysis of connexin-43 using monoclonal antibodies to its extracellular domain. *Bull. Exp. Biol. Med.* 148, 725–730. doi: 10.1007/s10517-010-0802-x
- Balse, E., and Boycott, H. E. (2017). Ion channel trafficking: control of ion channel density as a target for arrhythmias? *Front. Physiol.* 8, 808. doi: 10.3389/fphys.2017.00808
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., et al. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41, 849–857. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00150-3
- Bao, B., Jiang, J., Yanase, T., Nishi, Y., and Morgan, J. R. (2011). Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB J.* 25, 255–264. doi: 10.1096/fj.10-155291
- Brüggemann, A., Stühmer, W., and Pardo, L. A. (1997). Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel

- expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 537–542. doi: 10.1073/pnas.94.2.537
- Buell, G., Chessell, I. P., Michel, A. D., Collo, G., Salazzo, M., Herren, S., et al. (1998). Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. *Blood* 92, 3521–3528.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436–441. doi: 10.1038/18906
- Catterall, W. A., and Swanson, T. M. (2015). Structural basis for pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Mol. Pharmacol.* 88, 141–150. doi: 10.1124/mol.114.097659
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., and Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377, 428–431. doi: 10.1038/377428a0
- Choi, D. W., and Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* 13, 171–182. doi: 10.1146/annurev.ne.13.030190.001131
- Choi, W. S., Khurana, A., Mathur, R., Viswanathan, V., Steele, D. F., and Fedida, D. (2005). Kv1.5 surface expression is modulated by retrograde trafficking of newly endocytosed channels by the dynein motor. *Circ. Res.* 97, 363–371. doi: 10.1161/01.RES.0000179535.06458.f8
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., and Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 387–396. doi: 10.1038/35077544
- Cox, J. H., Hussell, S., Sondergaard, H., Roepstorff, K., Bui, J. V., Deer, J. R., et al. (2013). Antibody-mediated targeting of the Orai1 calcium channel inhibits T cell function. *PLoS One* 8, e82944. doi: 10.1371/journal.pone.0082944
- Cox, J. J., Reimann, F., Nicholas, A. K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., et al. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444, 894–898. doi: 10.1038/nature05413
- Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., et al. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci. Transl. Med.* 8, 366ra162. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8463
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183–187. doi: 10.1038/35012076
- Derzi, M., Johnson, T. R., Shieib, A. M., Conlon, H. D., Sharpe, P., Saati, A., et al. (2016). Nonclinical evaluation of PF-06438179: a potential biosimilar to Remicade® (Infliximab). *Adv. Ther.* 33, 1964–1982. doi: 10.1007/s12325-016-0403-9
- Ecker, D. M., Jones, S. D., and Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *Mabs* 7, 9–14. doi: 10.4161/19420862.2015.989042
- Elitt, C. M., McIlwraith, S. L., Lawson, J. J., Malin, S. A., Molliver, D. C., Cornuet, P. K., et al. (2006). Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *J. Neurosci.* 26, 8578–8587. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2185-06.2006
- Fertleman, C. R., Baker, M. D., Parker, K. A., Moffatt, S., Elmslie, F. V., Abrahamsen, B., et al. (2006). SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron* 52, 767–774. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.006
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., et al. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179–185. doi: 10.1038/nature04702
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., and Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438, 185–192. doi: 10.1038/nature04089
- Geppetti, P., Patacchini, R., Nassini, R., and Materazzi, S. (2010). Cough: the emerging role of the TRPA1 channel. *Lung* 188 Suppl 1, S63–8. doi: 10.1007/s00408-009-9201-3
- Ghilardi, J. R., Röhrich, H., Lindsay, T. H., Sevcik, M. A., Schwei, M. J., Kubota, K., et al. (2005). Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J. Neurosci.* 25, 3126–3131. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3815-04.2005
- Gilbert, S., Oliphant, C., Hassan, S., Peille, A., Bronsert, P., Falzoni, S., et al. (2019). ATP in the tumour microenvironment drives expression of nP2X7, a key mediator of cancer cell survival. *Oncogene* 38, 194–208. doi: 10.1038/s41388-018-0426-6
- Gilbert, S. M., Gidley Baird, A., Glazer, S., Barden, J. A., Glazer, A., Teh, L. C., et al. (2017). A phase I clinical trial demonstrates that nP2X7₊-targeted antibodies provide a novel, safe and tolerable topical therapy for basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 177, 117–124. doi: 10.1111/bjd.15364
- Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., et al. (2007). Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res.* 67, 7343–7349. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0107
- Grek, C. L., Sheng, Z., Naus, C. C., Sin, W. C., Gourdie, R. G., and Ghatnekar, G. G. (2018). Novel approach to temozolomide resistance in malignant glioma: connexin43-directed therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 41, 79–88. doi: 10.1016/j.coph.2018.05.002
- Gutman, G. A., Chandry, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., et al. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 473–508. doi: 10.1124/pr.57.4.10
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P. G., Lamperti, E. D., Yamashita, M., et al. (2008). Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol. Cell Biol.* 28, 5209–5222. doi: 10.1128/MCB.00360-08
- Haring, R., Stanton, P. K., Scheidele, M. A., and Moskal, J. R. (1991). Glycine-like modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by a monoclonal antibody that enhances long-term potentiation. *J. Neurochem.* 57, 323–332. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb02131.x
- Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., and McPherson, A. (1997). Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36, 1581–1597. doi: 10.1021/bi962514+
- Harris, L. J., Skaletsky, E., and McPherson, A. (1998). Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.* 275, 861–872. doi: 10.1006/jmbi.1997.1508
- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Mello de Queiroz, F., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., et al. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol. Cancer* 5, 41. doi: 10.1186/1476-4598-5-41
- Honore, P., Wismer, C. T., Mikusa, J., Zhu, C. Z., Zhong, C., Gauvin, D. M., et al. (2005). A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 410–421. doi: 10.1124/jpet.105.083915
- Hou, S., Li, B., Wang, L., Qian, W., Zhang, D., Hong, X., et al. (2008). Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modelling. *J. Biochem.* 144, 115–120. doi: 10.1093/jb/mvn052
- Igawa, T., Higashi, S., Abe, Y., Ohkuri, T., Tanaka, H., Morimoto, S., et al. (2013). Preparation and characterization of a monoclonal antibody against the refolded and functional extracellular domain of rat P2X4 receptor. *J. Biochem.* 153, 275–282. doi: 10.1093/jb/mvs143
- Jimenez-Andrade, J. M., Mantyh, W. G., Bloom, A. P., Ferng, A. S., Geffre, C. P., and Mantyh, P. W. (2010). Bone cancer pain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1198, 173–181. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05429.x
- Jordt, S. E., Bautista, D. M., Chuang, H. H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., et al. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265. doi: 10.1038/nature02282
- Ju, M., and Wray, D. (2002). Molecular identification and characterisation of the human eag2 potassium channel. *FEBS Lett.* 524, 204–210. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03055-7
- Klionsky, L., Tamir, R., Holzinger, B., Bi, X., Talvenheimo, J., Kim, H., et al. (2006). A polyclonal antibody to the prepore loop of transient receptor potential vanilloid type 1 blocks channel activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 192–198. doi: 10.1124/jpet.106.108092
- Kremeyer, B., Lopera, F., Cox, J. J., Momin, A., Rugiero, F., Marsh, S., et al. (2010). A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66, 671–680. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.030
- Lee, C., Jeong, M., Lee, J. J., Seo, S., Cho, S. C., Zhang, W., et al. (2017). Glycosylation profile and biological activity of Remicade® compared with Flixabi® and Remsima®. *Mabs* 9, 968–977. doi: 10.1080/19420862.2017.1337620
- Lee, J. H., Park, C. K., Chen, G., Han, Q., Xie, R. G., Liu, T., et al. (2014a). A monoclonal antibody that targets a NaV1.7 channel voltage sensor for pain and itch relief. *Cell* 157, 1393–1404. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.064
- Lee, K. J., Wang, W., Padaki, R., Bi, V., Plewa, C. A., and Gavva, N. R. (2014b). Mouse monoclonal antibodies to transient receptor potential ankyrin 1 act as antagonists of multiple modes of channel activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 350, 223–231. doi: 10.1124/jpet.114.215574

- Lee, T. K. W., Cheung, V. C. H., and Ng, I. O. L. (2013). Liver tumor-initiating cells as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 338, 101–109. doi: 10.1016/j.canlet.2012.05.001
- Li, F., and Tsien, J. Z. (2009). Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* 361, 302–303. doi: 10.1056/NEJMcibr0902052
- Lin, F. F., Elliott, R., Colombero, A., Gaida, K., Kelley, L., Moksa, A., et al. (2013). Generation and characterization of fully human monoclonal antibodies against human Orai1 for autoimmune disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 345, 225–238. doi: 10.1124/jpet.112.202788
- Liu, D., Tseng, M., Epstein, L. F., Green, L., Chan, B., Soriano, B., et al. (2016). Evaluation of recombinant monoclonal antibody SVMab1 binding to Nav1.7 target sequences and block of human Nav1.7 currents. *F1000Res.* 5, 2764. doi: 10.12688/f1000research.9918.1
- Liu, S., Watanabe, S., Shudou, M., Kuno, M., Miura, H., and Maeyama, K. (2014). Upregulation of store-operated Ca(2+) entry in the naïve CD4(+) T cells with aberrant cytokine releasing in active rheumatoid arthritis. *Immunol. Cell. Biol.* 92, 752–760. doi: 10.1038/icc.2014.45
- Luini, A., Goldberg, O., and Teichberg, V. I. (1981). Distinct pharmacological properties of excitatory amino acid receptors in the rat striatum: study by Na+ efflux assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 3250–3254. doi: 10.1073/pnas.78.5.3250
- Lynch, J. J., Van Vleet, T. R., Mittelstadt, S. W., and Blomme, E. A. G. (2017). Potential functional and pathological side effects related to off-target pharmacological activity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 87, 108–126. doi: 10.1016/j.vascn.2017.02.020
- Morris, R. G., Davis, S., and Butcher, S. P. (1990). Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 329, 187–204. doi: 10.1098/rstb.1990.0164
- Morris, R. G., Steele, R. J., Bell, J. E., and Martin, S. J. (2013). N-methyl-D-aspartate receptors, learning and memory: chronic intraventricular infusion of the NMDA receptor antagonist D-AP5 interacts directly with the neural mechanisms of spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 37, 700–717. doi: 10.1111/ejn.12086
- Moskal, J. R., Burgdorf, J. S., Stanton, P. K., Kroes, R. A., Disterhoft, J. F., Burch, R. M., et al. (2017). The development of Rapastinel (formerly GLYX-13): a rapid acting and long lasting antidepressant. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 47–56. doi: 10.2174/1570159X14666160321122703
- Napp, J., Pardo, L. A., Hartung, F., Tietze, L. F., Stühmer, W., and Alves, F. (2016). In vivo imaging of tumour xenografts with an antibody targeting the potassium channel Kv. *Eur. Biophys. J.* 45, 721–733. doi: 10.1007/s00249-016-1152-z
- Nasu-Tada, K., Koizumi, S., Tsuda, M., Kunifusa, E., and Inoue, K. (2006). Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia* 53, 769–775. doi: 10.1002/glia.20339
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067. doi: 10.1152/physrev.00015.2002
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., et al. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest.* 115, 2393–2401. doi: 10.1172/JCI25437
- Oshima, A. (2014). Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Lett.* 588, 1230–1237. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.042
- Ouadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A., and Pardo, L. A. (2016). Kv10.1 K(+) channel: from physiology to cancer. *Pflugers Arch.* 468, 751–762. doi: 10.1007/s00424-015-1784-3
- Pardo, L. A., Brüggemann, A., Camacho, J., and Stühmer, W. (1998). Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K+ channels. *J. Cell Biol.* 143, 767–775. doi: 10.1083/jcb.143.3.767
- Pierri, C. L., Parisi, G., and Porcelli, V. (2010). Computational approaches for protein function prediction: a combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804, 1695–1712. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.04.008
- Pierri, C. L., Bossis, F., Punzi, G., De Grassi, A., Cetrone, M., Parisi, G., et al. (2016). Molecular modeling of antibodies for the treatment of TNFA-related immunological diseases. *Pharmacol. Res. Perspect.* 4, e00197. doi: 10.1002/prp2.197
- Revel, J. P., Nicholson, B. J., and Yancey, S. B. (1985). Chemistry of gap junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 47, 263–279. doi: 10.1146/annurev.ph.47.030185.001403
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., and Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 83, 1359–1400. doi: 10.1152/physrev.00007.2003
- Saganich, M. J., Vega-Saenz de Miera, E., Nadal, M. S., Baker, H., Coetzee, W. A., and Rudy, B. (1999). Cloning of components of a novel subthreshold-activating K(+) channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19, 10789–10802. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-24-10789.1999
- Saphire, E. O., Parren, P. W., Pantophlet, R., Zwick, M. B., Morris, G. M., Rudd, P. M., et al. (2001). Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 293, 1155–1159. doi: 10.1126/science.1061692
- Schönherr, R., Gessner, G., Löber, K., and Heinemann, S. H. (2002). Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Lett.* 514, 204–208. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02365-7
- Shalini Shahani, D. (2017). Global markets for bioengineered protein drugs. <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/bioengineered-protein-drugs-report.html>
- Shcherbatko, A., Foletti, D., Poulsen, K., Strop, P., Zhu, G., Hasa-Moreno, A., et al. (2016). Modulation of P2X3 and P2X2/3 receptors by monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 291, 12254–12270. doi: 10.1074/jbc.M116.722330
- Sikandar, S., and Dickenson, A. H. (2012). Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. *Curr. Opin. Support Palliat Care* 6, 17–26. doi: 10.1097/SPC.0b013e32834f66c9
- Siller-Jackson, A. J., Burra, S., Gu, S., Xia, X., Bonewald, I. F., Sprague, E., et al. (2008). Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *J. Biol. Chem.* 283, 26374–26382. doi: 10.1074/jbc.M803136200
- Smani, T., Shapovalov, G., Skryma, R., Prevarskaya, N., and Rosado, J. A. (2015). Functional and pathophysiological implications of TRP channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1853, 1772–1782. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.04.016
- Snyder, L. M., Ross, S. E., and Belfer, I. (2014). An SCN9A variant, known to cause pain, is now found to cause itch. *Pain* 155, 1677–1678. doi: 10.1016/j.pain.2014.05.028
- Taylor-Clark, T. E., Nassenstein, C., McAlexander, M. A., and Udem, B. J. (2009). TRPA1: a potential target for anti-tussive therapy. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 22, 71–74. doi: 10.1016/j.pupt.2008.12.019
- Thompson, L. T., Moskal, J. R., and Disterhoft, J. F. (1992). Hippocampus-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. *Nature* 359, 638–641. doi: 10.1038/359638a0
- Ufartes, R., Schneider, T., Mortensen, L. S., de Juan Romero, C., Hentrich, K., Knoetgen, H., et al. (2013). Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2247–2262. doi: 10.1093/hmg/ddt076
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adams, N., North, R. A., Surprenant, A., et al. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516–519. doi: 10.1038/371516a0
- Viana, F., and Ferrer-Montiel, A. (2009). TRPA1 modulators in preclinical development. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 19, 1787–1799. doi: 10.1517/1354377093393771
- Weiss, J., Pyrski, M., Jacobi, E., Buße, B., Willnecker, V., Schick, B., et al. (2011). Loss-of-function mutations in sodium channel Nav1.7 cause anosmia. *Nature* 472, 186–190. doi: 10.1038/nature09975
- Wickenden, A., Priest, B., and Erdemli, G. (2012). Ion channel drug discovery: challenges and future directions. *Future Med. Chem.* 4, 661–679. doi: 10.4155/fmc.12.4
- Wilkinson, T. C., Gardener, M. J., and Williams, W. A. (2015). Discovery of functional antibodies targeting ion channels. *J. Biomol. Screen* 20, 454–467. doi: 10.1177/1087057114560698
- Zhao, W., Wang, L., Han, H., Jin, K., Lin, N., Guo, T., et al. (2013). 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel $\alpha 2\delta 1$ subunit. *Cancer Cell* 23, 541–556. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.025

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Hastrate, Hantute-Ghesquier, Prevarskaya and Lehen'kyi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, Monique van, Sylvie Huybers, Joost G. J. Hoenderop, Annemiete W. C. M. van der Kemp, Johannes P. T. M. van Leeuwen, et René J. M. Bindels. 2006. « Age-Dependent Alterations in Ca²⁺ Homeostasis: Role of TRPV5 and TRPV6 ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 291 (6): F1177-1183. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00038.2006>.
- Ammon, J., J. H. Karstens, et P. Rathert. 1977. « [TNM-system orientated radiological therapy in prostatic carcinoma (author's transl)] ». *Der Urologe. Ausg. A* 16 (2): 73-82.
- Barron, David A., et David R. Rowley. 2012. « The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression ». *Endocrine-Related Cancer* 19 (6): R187-204. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0085>.
- Berridge, M. J. 1998. « Neuronal Calcium Signaling ». *Neuron* 21 (1): 13-26. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80510-3).
- Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, et H. Llewelyn Roderick. 2003. « Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 517-29. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>.
- Bidaux, Gabriel, Anne-Sophie Borowiec, Charlotte Dubois, Philippe Delcourt, Céline Schulz, Fabien Vanden Abeele, Gilbert Lepage, et al. 2016. « Targeting of Short TRPM8 Isoforms Induces 4TM-TRPM8-Dependent Apoptosis in Prostate Cancer Cells ». *Oncotarget* 7 (20): 29063-80. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8666>.
- Bill-Axelsson, Anna, Lars Holmberg, Hans Garmo, Jennifer R. Rider, Kimmo Taari, Christer Busch, Stig Nordling, et al. 2014. « Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Early Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 370 (10): 932-42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311593>.
- Bilusic, Marijo, Ravi A. Madan, et James L. Gulley. 2017. « Immunotherapy of Prostate Cancer: Facts and Hopes ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 23 (22): 6764-70. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0019>.
- Bird, Gary S., et James W. Putney. 2018. « Pharmacology of Store-Operated Calcium Entry Channels ». In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*, édité par Juliusz Ashot Kozak et James W. Putney. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531424/>.

- Bödding, Matthias, et Veit Flockerzi. 2004. « Ca²⁺ Dependence of the Ca²⁺-Selective TRPV6 Channel ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (35): 36546-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404679200>.
- Boehning, Darren, Randen L. Patterson, et Solomon H. Snyder. 2004. « Apoptosis and Calcium: New Roles for Cytochrome c and Inositol 1,4,5-Trisphosphate ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3 (3): 252-54.
- Boucher, Jonathan, Arnaud Monvoisin, Justine Vix, Marc Mesnil, Dominique Thuringer, Françoise Debiais, et Laurent Cronier. 2018. « Connexins, Important Players in the Dissemination of Prostate Cancer Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes* 1860 (1): 202-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.020>.
- Bygrave, F. L., et A. Benedetti. 1996. « What Is the Concentration of Calcium Ions in the Endoplasmic Reticulum? ». *Cell Calcium* 19 (6): 547-51. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(96\)90064-0](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(96)90064-0).
- Cao, Chike, Eleonora Zakharian, Istvan Borbiro, et Tibor Rohacs. 2013. « Interplay between Calmodulin and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Ca²⁺-Induced Inactivation of Transient Receptor Potential Vanilloid 6 Channels ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (8): 5278-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409482>.
- Cauvin, C., K. Saida, et C. van Breemen. 1982. « Effects of Ca Antagonists on Ca Fluxes in Resistance Vessels ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 4 Suppl 3: S287-290.
- Chang, Q., S. Hoefs, A. W. van der Kemp, C. N. Topala, R. J. Bindels, et J. G. Hoenderop. 2005. « The Beta-Glucuronidase Klotho Hydrolyzes and Activates the TRPV5 Channel ». *Science (New York, N.Y.)* 310 (5747): 490-93. <https://doi.org/10.1126/science.1114245>.
- Chen, Fangjing, Bin Ni, Yueping Ou Yang, Tianwen Ye, et Aimin Chen. 2014. « Knockout of TRPV6 Causes Osteopenia in Mice by Increasing Osteoclastic Differentiation and Activity ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 33 (3): 796-809. <https://doi.org/10.1159/000358653>.

- Chen, YongMing, XinYu Liu, FaBiao Zhang, ShanFan Liao, XiYuan He, DeXiang Zhuo, HuaiBin Huang, et YongYang Wu. 2018. « Vitamin D Receptor Suppresses Proliferation and Metastasis in Renal Cell Carcinoma Cell Lines via Regulating the Expression of the Epithelial Ca²⁺ Channel TRPV5 ». Édité par Aamir Ahmad. *PLOS ONE* 13 (4): e0195844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195844>.
- Cheng, Xiping, Jie Jin, Lily Hu, Dongbiao Shen, Xian-Ping Dong, Mohammad A. Samie, Jayne Knoff, et al. 2010. « TRP Channel Regulates EGFR Signaling in Hair Morphogenesis and Skin Barrier Formation ». *Cell* 141 (2): 331-43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.013>.
- Chow, Justine, Manith Norng, Jing Zhang, et Jianyuan Chai. 2007. « TRPV6 Mediates Capsaicin-Induced Apoptosis in Gastric Cancer Cells--Mechanisms behind a Possible New “Hot” Cancer Treatment ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1773 (4): 565-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.001>.
- Clapham, D. E. 1995. « Calcium Signaling ». *Cell* 80 (2): 259-68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90408-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90408-5).
- Clapham, David E. 2003. « TRP Channels as Cellular Sensors ». *Nature* 426 (6966): 517-24. <https://doi.org/10.1038/nature02196>.
- . 2007. « Calcium Signaling ». *Cell* 131 (6): 1047-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.
- Cooke, D. B., V. E. Quarmby, D. D. Mickey, J. T. Isaacs, et F. S. French. 1988. « Oncogene Expression in Prostate Cancer: Dunning R3327 Rat Dorsal Prostatic Adenocarcinoma System ». *The Prostate* 13 (4): 263-72. <https://doi.org/10.1002/pros.2990130402>.
- Corbeels, Katrien, Lieve Verlinden, Matthias Lannoo, Caroline Simoens, Christophe Matthys, Annemieke Verstuyf, Ann Meulemans, Geert Carmeliet, et Bart Van der Schueren. 2018. « Thin Bones: Vitamin D and Calcium Handling after Bariatric Surgery ». *Bone Reports* 8 (juin): 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.02.002>.
- Cubillos, Susana, et Johannes Norgauer. 2016. « Low Vitamin D-Modulated Calcium-Regulating Proteins in Psoriasis Vulgaris Plaques: S100A7 Overexpression Depends on Joint Involvement ». *International Journal of Molecular Medicine* 38 (4): 1083-92. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2718>.

- Cui, Chaochu, Robert Merritt, Liwu Fu, et Zui Pan. 2017. « Targeting Calcium Signaling in Cancer Therapy ». *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7 (1): 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.11.001>.
- Cunha, G. R., A. A. Donjacour, P. S. Cooke, S. Mee, R. M. Bigsby, S. J. Higgins, et Y. Sugimura. 1987. « The Endocrinology and Developmental Biology of the Prostate ». *Endocrine Reviews* 8 (3): 338-62. <https://doi.org/10.1210/edrv-8-3-338>.
- Cunha, Gerald R., Simon W. Hayward, et Y. Z. Wang. 2002. « Role of Stroma in Carcinogenesis of the Prostate ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 70 (9-10): 473-85. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700902.x>.
- D'Amico, A. V., A. Desjardin, M. H. Chen, S. Paik, D. Schultz, A. A. Renshaw, K. R. Loughlin, et J. P. Richie. 1998. « Analyzing Outcome-Based Staging for Clinically Localized Adenocarcinoma of the Prostate ». *Cancer* 83 (10): 2172-80. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19981115\)83:10<2172::aid-cncr16>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19981115)83:10<2172::aid-cncr16>3.0.co;2-k).
- Dehm, Scott M., et Donald J. Tindall. 2006. « Molecular Regulation of Androgen Action in Prostate Cancer ». *Journal of Cellular Biochemistry* 99 (2): 333-44. <https://doi.org/10.1002/jcb.20794>.
- Delporte, Gauthier, Arnauld Villers, et Nicolas Penel. 2018. « [Prostate cancer screening: Reasons of controversy] ». *Bulletin Du Cancer* 105 (12): 1111-18. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.09.007>.
- Denmeade, Samuel R., et John T. Isaacs. 2002. « A History of Prostate Cancer Treatment ». *Nature Reviews. Cancer* 2 (5): 389-96. <https://doi.org/10.1038/nrc801>.
- Derler, Isabella, Michael Hofbauer, Heike Kahr, Reinhard Fritsch, Martin Muik, Klaus Kepplinger, Marlene E. Hack, et al. 2006a. « Dynamic but Not Constitutive Association of Calmodulin with Rat TRPV6 Channels Enables Fine Tuning of Ca²⁺-Dependent Inactivation ». *J Physiol* 577 (Pt 1): 31-44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118661>.
- . 2006b. « Dynamic but Not Constitutive Association of Calmodulin with Rat TRPV6 Channels Enables Fine Tuning of Ca²⁺-Dependent Inactivation ». *The*

Journal of Physiology 577 (Pt 1): 31-44.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118661>.

Diver, J. M., S. O. Sage, et J. A. Rosado. 2001. « The Inositol Trisphosphate Receptor Antagonist 2-Aminoethoxydiphenylborate (2-APB) Blocks Ca²⁺ Entry Channels in Human Platelets: Cautions for Its Use in Studying Ca²⁺ Influx ». *Cell Calcium* 30 (5): 323-29. <https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0239>.

Dubois, Charlotte, Natalia Prevarskaya, et Fabien Vanden Abeele. 2016. « The Calcium-Signaling Toolkit: Updates Needed ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (6): 1337-43.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.033>.

Dubois, Charlotte, Fabien Vanden Abeele, V'yacheslav Lehen'kyi, Dimitra Gkika, Basma Guarmit, Gilbert Lepage, Christian Slomianny, et al. 2014. « Remodeling of Channel-Forming ORAI Proteins Determines an Oncogenic Switch in Prostate Cancer ». *Cancer Cell* 26 (1): 19-32.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.025>.

Dubois, Charlotte, Fabien Vanden Abeele, et Natacha Prevarskaya. 2013. « Targeting Apoptosis by the Remodelling of Calcium-Transporting Proteins in Cancerogenesis ». *FEBS Journal* 280 (21): 5500-5510.
<https://doi.org/10.1111/febs.12246>.

Ecker, Dawn M., Susan Dana Jones, et Howard L. Levine. 2015. « The Therapeutic Monoclonal Antibody Market ». *MAbs* 7 (1): 9-14.
<https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>.

English, H. F., N. Kyprianou, et J. T. Isaacs. 1989. « Relationship between DNA Fragmentation and Apoptosis in the Programmed Cell Death in the Rat Prostate Following Castration ». *The Prostate* 15 (3): 233-50.
<https://doi.org/10.1002/pros.2990150304>.

Fan, Hong, Ya-Xing Shen, et Yun-Feng Yuan. 2014. « Expression and Prognostic Roles of TRPV5 and TRPV6 in Non-Small Cell Lung Cancer after Curative Resection ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15 (6): 2559-63.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.6.2559>.

Fecher-Trost, Claudia, Ulrich Wissenbach, Andreas Beck, Pascal Schalkowsky, Christof Stoerger, Janka Doerr, Anna Dembek, et al. 2013a. « The in Vivo TRPV6 Protein Starts at a Non-AUG Triplet, Decoded as Methionine,

- Upstream of Canonical Initiation at AUG ». *J Biol Chem* 288 (23): 16629-44.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469726>.
- . 2013b. « The in Vivo TRPV6 Protein Starts at a Non-AUG Triplet, Decoded as Methionine, Upstream of Canonical Initiation at AUG ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (23): 16629-44.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469726>.
- Feske, Stefan, Yousang Gwack, Murali Prakriya, Sonal Srikanth, Sven-Holger Puppel, Bogdan Tanasa, Patrick G. Hogan, Richard S. Lewis, Mark Daly, et Anjana Rao. 2006. « A Mutation in Orail Causes Immune Deficiency by Abrogating CRAC Channel Function ». *Nature* 441 (7090): 179-85.
<https://doi.org/10.1038/nature04702>.
- Fixemer, Thomas, Ulrich Wissenbach, Veit Flockerzi, et Helmut Bonkhoff. 2003. « Expression of the Ca²⁺-Selective Cation Channel TRPV6 in Human Prostate Cancer: A Novel Prognostic Marker for Tumor Progression ». *Oncogene* 22 (49): 7858-61. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206895>.
- Fu, S., H. Hirte, S. Welch, T. T. Ilenchuk, T. Lutes, C. Rice, N. Fields, et al. 2017a. « First-in-Human Phase I Study of SOR-C13, a TRPV6 Calcium Channel Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors ». *Investigational New Drugs* 35 (3): 324-33. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0438-z>.
- . 2017b. « First-in-Human Phase I Study of SOR-C13, a TRPV6 Calcium Channel Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors ». *Invest New Drugs* 35 (3): 324-33. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0438-z>.
- Gackière, Florian, Marine Warnier, Maria Katsogiannou, Sandra Derouiche, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Christian Slomianny, et al. 2013. « Functional Coupling between Large-Conductance Potassium Channels and Cav3.2 Voltage-Dependent Calcium Channels Participates in Prostate Cancer Cell Growth ». *Biology Open* 2 (9): 941-51. <https://doi.org/10.1242/bio.20135215>.
- Gees, Maarten, Barbara Colsoul, et Bernd Nilius. 2010. « The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (10): a003962.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003962>.

- Genova, Tullio, Guillaume P. Grolez, Chiara Camillo, Michela Bernardini, Alexandre Bokhobza, Elodie Richard, Marco Scianna, et al. 2017. « TRPM8 Inhibits Endothelial Cell Migration via a Non-Channel Function by Trapping the Small GTPase Rap1 ». *The Journal of Cell Biology* 216 (7): 2107-30. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506024>.
- Gkika, D., M. Flourakis, L. Lemonnier, et N. Prevarskaya. 2010. « PSA Reduces Prostate Cancer Cell Motility by Stimulating TRPM8 Activity and Plasma Membrane Expression ». *Oncogene* 29 (32): 4611-16. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.210>.
- Gleason, D. F. 1992. « Histologic Grading of Prostate Cancer: A Perspective ». *Human Pathology* 23 (3): 273-79. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90108-f](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90108-f).
- Graaf, Stan F. J. van de, Qing Chang, Arjen R. Mensenkamp, Joost G. J. Hoenderop, et René J. M. Bindels. 2006. « Direct Interaction with Rab11a Targets the Epithelial Ca²⁺ Channels TRPV5 and TRPV6 to the Plasma Membrane ». *Mol Cell Biol* 26 (1): 303-12. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.1.303-312.2006>.
- Greene, D. R., J. M. Fitzpatrick, et P. T. Scardino. 1995. « Anatomy of the Prostate and Distribution of Early Prostate Cancer ». *Seminars in Surgical Oncology* 11 (1): 9-22. <https://doi.org/10.1002/ssu.2980110104>.
- Haglund, Eva, Stefan Carlsson, Johan Stranne, Anna Wallerstedt, Ulrica Wilderäng, Thordis Thorsteinsdottir, Mikael Lagerkvist, et al. 2015. « Urinary Incontinence and Erectile Dysfunction After Robotic Versus Open Radical Prostatectomy: A Prospective, Controlled, Nonrandomised Trial ». *European Urology* 68 (2): 216-25. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.02.029>.
- Halpern, Joshua A., Clara Oromendia, Jonathan E. Shoag, Sameer Mittal, Michael F. Cosiano, Karla V. Ballman, Andrew J. Vickers, et Jim C. Hu. 2018. « Use of Digital Rectal Examination as an Adjunct to Prostate Specific Antigen in the Detection of Clinically Significant Prostate Cancer ». *The Journal of Urology* 199 (4): 947-53. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.10.021>.
- Hartel, M., F. F. di Mola, F. Selvaggi, G. Mascetta, M. N. Wenthe, K. Felix, N. A. Giese, et al. 2006. « Vanilloids in Pancreatic Cancer: Potential for Chemotherapy and Pain Management ». *Gut* 55 (4): 519-28. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073205>.

- Haustrate, Aurélien, Aline Hantute-Ghesquier, Natalia Prevarskaya, et V'yacheslav Lehen'kyi. 2019. « Monoclonal Antibodies Targeting Ion Channels and Their Therapeutic Potential ». *Frontiers in Pharmacology* 10: 606.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00606>.
- Hoenderop, Joost G. J., Bernd Nilius, et René J. M. Bindels. 2003. « Epithelial Calcium Channels: From Identification to Function and Regulation ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 446 (3): 304-8.
<https://doi.org/10.1007/s00424-003-1045-8>.
- Holowka, David, Nathaniel Calloway, Roy Cohen, Deepti Gadi, Jinmin Lee, Norah L. Smith, et Barbara Baird. 2012. « Roles for ca(2+) Mobilization and Its Regulation in Mast Cell Functions ». *Frontiers in Immunology* 3: 104.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00104>.
- Huggins, M. L. 1941. « A NEW SOCIETY FOR X-RAY AND ELECTRON DIFFRACTION RESEARCH WORKERS ». *Science (New York, N.Y.)* 93 (2421): 489-90. <https://doi.org/10.1126/science.93.2421.489>.
- Ichikawa, Jun, et Ryuji Inoue. 2014. « TRPC6 Regulates Cell Cycle Progression by Modulating Membrane Potential in Bone Marrow Stromal Cells ». *British Journal of Pharmacology* 171 (23): 5280-94.
<https://doi.org/10.1111/bph.12840>.
- Isaacs, J. T., et D. S. Coffey. 1989. « Etiology and Disease Process of Benign Prostatic Hyperplasia ». *The Prostate. Supplement* 2: 33-50.
<https://doi.org/10.1002/pros.2990150506>.
- Isaacs, W. B., et B. S. Carter. 1991. « Genetic Changes Associated with Prostate Cancer in Humans ». *Cancer Surveys* 11: 15-24.
- Jakobovits, A. 2008. « Monoclonal Antibody Therapy for Prostate Cancer ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 181: 237-56.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_11.
- Jarow, Jonathan P., et Barry R. Zirkin. 2005. « The Androgen Microenvironment of the Human Testis and Hormonal Control of Spermatogenesis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1061 (décembre): 208-20.
<https://doi.org/10.1196/annals.1336.023>.

- Kim, Joshua, et Gerhard A. Coetzee. 2004. « Prostate Specific Antigen Gene Regulation by Androgen Receptor ». *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (2): 233-41. <https://doi.org/10.1002/jcb.20228>.
- Kim, Man-Hee, Geun-Shik Lee, Eui-Man Jung, Kyung-Chul Choi, et Eui-Bae Jeung. 2009. « The Negative Effect of Dexamethasone on Calcium-Processing Gene Expressions Is Associated with a Glucocorticoid-Induced Calcium-Absorbing Disorder ». *Life Sciences* 85 (3-4): 146-52. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.05.013>.
- Kovacs, Gergely, Nicolas Montalbetti, Alexandre Simonin, Tamas Danko, Bernadett Balazs, Akos Zsembery, et Matthias A. Hediger. 2012. « Inhibition of the Human Epithelial Calcium Channel TRPV6 by 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) ». *Cell Calcium* 52 (6): 468-80. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.08.005>.
- Krongrad, A., H. Lai, et S. Lai. 1997. « Survival after Radical Prostatectomy ». *JAMA* 278 (1): 44-46.
- Kunzelmann, Karl. 2005. « Ion Channels and Cancer ». *The Journal of Membrane Biology* 205 (3): 159-73. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0781-4>.
- Kuramochi, T., T. Igawa, H. Tsunoda, et K. Hattori. 2014. « Humanization and Simultaneous Optimization of Monoclonal Antibody ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1060: 123-37. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6_7.
- Kuramochi, Taichi, Tomoyuki Igawa, Hiroyuki Tsunoda, et Kunihiro Hattori. 2019. « Humanization and Simultaneous Optimization of Monoclonal Antibody ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1904: 213-30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8958-4_9.
- Lakes, J., et C. Arsov. 2019. « [PSA screening and molecular markers] ». *Der Urologe. Ausg. A* 58 (5): 486-93. <https://doi.org/10.1007/s00120-019-0900-y>.
- Lambers, Tim T., A. Freek Weidema, Bernd Nilius, Joost G. J. Hoenderop, et René J. M. Bindels. 2004. « Regulation of the Mouse Epithelial Ca²⁺(+) Channel TRPV6 by the Ca²⁺-Sensor Calmodulin ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (28): 28855-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313637200>.

- Landowski, Christopher P., Katrin A. Bolanz, Yoshiro Suzuki, et Matthias A. Hediger. 2011. « Chemical Inhibitors of the Calcium Entry Channel TRPV6 ». *Pharmaceutical Research* 28 (2): 322-30. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0249-9>.
- Lee, C. 1981. « Physiology of Castration-Induced Regression in Rat Prostate ». *Progress in Clinical and Biological Research* 75A: 145-59.
- Lee, Geun-Shik, et Eui-Bae Jeung. 2007. « Uterine TRPV6 Expression during the Estrous Cycle and Pregnancy in a Mouse Model ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293 (1): E132-138. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00666.2006>.
- Lehen'kyi, V., M. Flourakis, R. Skryma, et N. Prevarskaya. 2007. « TRPV6 Channel Controls Prostate Cancer Cell Proliferation via Ca(2+)/NFAT-Dependent Pathways ». *Oncogene* 26 (52): 7380-85. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210545>.
- Lehen'kyi, V'yacheslav, et Natalia Prevarskaya. 2011. « Oncogenic TRP Channels ». In *Transient Receptor Potential Channels*, édité par Md. Shahidul Islam, 704:929-45. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_48.
- Lehen'kyi, V'yacheslav, Maylis Raphaël, Agathe Oulidi, Matthieu Flourakis, Sergii Khalimonchuk, Artem Kondratskyi, Dmitri V. Gordienko, et al. 2011. « TRPV6 Determines the Effect of Vitamin D3 on Prostate Cancer Cell Growth ». *PLoS One* 6 (2): e16856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016856>.
- Lehen'kyi, V'yacheslav, Maylis Raphaël, et Natalia Prevarskaya. 2012. « The Role of the TRPV6 Channel in Cancer ». *The Journal of Physiology* 590 (6): 1369-76. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225862>.
- Lewis, Richard S. 2020. « Store-Operated Calcium Channels: From Function to Structure and Back Again ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12 (5): a035055. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035055>.
- Lin, J., R. M. Adam, E. Santiestevan, et M. R. Freeman. 1999. « The Phosphatidylinositol 3'-Kinase Pathway Is a Dominant Growth Factor-Activated Cell Survival Pathway in LNCaP Human Prostate Carcinoma Cells ». *Cancer Research* 59 (12): 2891-97.

- Litwin, Mark S., et Hung-Jui Tan. 2017. « The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review ». *JAMA* 317 (24): 2532-42.
<https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>.
- Livak, K. J., et T. D. Schmittgen. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method ». *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402-8.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lou, Y.-R., S. Qiao, R. Talonpoika, H. Syväla, et P. Tuohimaa. 2004. « The Role of Vitamin D3 Metabolism in Prostate Cancer ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 92 (4): 317-25.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.007>.
- Lu, Peng, Sandor Boros, Qing Chang, René J. Bindels, et Joost G. Hoenderop. 2008. « The Beta-Glucuronidase Klotho Exclusively Activates the Epithelial Ca²⁺ Channels TRPV5 and TRPV6 ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23 (11): 3397-3402.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfn291>.
- Martin, Sarah K., Marisa Kamelgarn, et Natasha Kyprianou. 2014. « Cytoskeleton Targeting Value in Prostate Cancer Treatment ». *American Journal of Clinical and Experimental Urology* 2 (1): 15-26.
- Masamune, Atsushi, Hiroshi Kotani, Franziska Lena Sörgel, Jian-Min Chen, Shin Hamada, Reiko Sakaguchi, Emmanuelle Masson, et al. 2020. « Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis ». *Gastroenterology* 158 (6): 1626-1641.e8.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.005>.
- McNeal, J. E. 1968. « Regional Morphology and Pathology of the Prostate ». *American Journal of Clinical Pathology* 49 (3): 347-57.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/49.3.347>.
- . 1972. « The Prostate and Prostatic Urethra: A Morphologic Synthesis ». *The Journal of Urology* 107 (6): 1008-16. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)61195-9](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)61195-9).
- . 1981. « The Zonal Anatomy of the Prostate ». *The Prostate* 2 (1): 35-49.
<https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>.

- Meldolesi, J., et T. Pozzan. 1987. « Pathways of Ca²⁺ Influx at the Plasma Membrane: Voltage-, Receptor-, and Second Messenger-Operated Channels ». *Experimental Cell Research* 171 (2): 271-83. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90161-3).
- Mikoshiba, Katsuhiko. 2007. « IP₃ Receptor/Ca²⁺ Channel: From Discovery to New Signaling Concepts ». *Journal of Neurochemistry* 102 (5): 1426-46. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04825.x>.
- Monet, Michaël, Dimitra Gkika, V'yacheslav Lehen'kyi, Albin Pourtier, Fabien Vanden Abeele, Gabriel Bidaux, Véronique Juvin, François Rassendren, Sandrine Humez, et Natalia Prevarsakaya. 2009. « Lysophospholipids Stimulate Prostate Cancer Cell Migration via TRPV2 Channel Activation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793 (3): 528-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.003>.
- Moore, S., M. Kuhrik, N. Kuhrik, et L. Shea. 1992. « Screening for Prostate Cancer: PSA Blood Test, Rectal Examination, and Ultrasound ». *Urologic Nursing* 12 (3): 106-7.
- Moreau, Robert, Georges Daoud, Renée Bernatchez, Lucie Simoneau, André Masse, et Julie Lafond. 2002. « Calcium Uptake and Calcium Transporter Expression by Trophoblast Cells from Human Term Placenta ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1564 (2): 325-32. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00466-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00466-2).
- Movassaghi, Miyad, Rainjade Chung, Christopher B. Anderson, Mark Stein, Yvonne Saenger, et Izak Faiena. 2021. « Overcoming Immune Resistance in Prostate Cancer: Challenges and Advances ». *Cancers* 13 (19): 4757. <https://doi.org/10.3390/cancers13194757>.
- Mukherji, Deborah, Andrew Eichholz, et Johann S. De Bono. 2012. « Management of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Recent Advances ». *Drugs* 72 (8): 1011-28. <https://doi.org/10.2165/11633360-000000000-00000>.
- Müller, D., J. G. Hoenderop, G. F. Merckx, C. H. van Os, et R. J. Bindels. 2000. « Gene Structure and Chromosomal Mapping of Human Epithelial Calcium Channel ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275 (1): 47-52. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3227>.

- Munaron, Luca, Susanna Antoniotti, Alessandra Fiorio Pla, et Davide Lovisolo. 2004. « Blocking Ca²⁺ entry: A Way to Control Cell Proliferation ». *Current Medicinal Chemistry* 11 (12): 1533-43. <https://doi.org/10.2174/0929867043365008>.
- Murali, Ramachadran, et Thomas Kieber-Emmons. 2014. « Cancer Immunotherapeutics: Evolution of Monoclonal Antibodies to Peptide Immunogens ». *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 33 (3): 179-82. <https://doi.org/10.1089/mab.2014.0021>.
- Neuberger, Arthur, Kirill D. Nadezhdin, et Alexander I. Sobolevsky. 2021. « Structural Mechanisms of TRPV6 Inhibition by Ruthenium Red and Econazole ». *Nature Communications* 12 (1): 6284. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26608-x>.
- Niemeyer, B. A., C. Bergs, U. Wissenbach, V. Flockerzi, et C. Trost. 2001a. « Competitive Regulation of Ca²⁺-like-Mediated Ca²⁺ Entry by Protein Kinase C and Calmodulin ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6): 3600-3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.051511398>.
- . 2001b. « Competitive Regulation of Ca²⁺-like-Mediated Ca²⁺ Entry by Protein Kinase C and Calmodulin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3600-3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.051511398>.
- Nilius, Bernd, Thomas Voets, et John Peters. 2005. « TRP Channels in Disease ». *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2005 (295): re8. <https://doi.org/10.1126/stke.2952005re8>.
- Oto, Julia, Álvaro Fernández-Pardo, Montserrat Royo, David Hervás, Laura Martos, César D. Vera-Donoso, Manuel Martínez, et al. 2020. « A Predictive Model for Prostate Cancer Incorporating PSA Molecular Forms and Age ». *Scientific Reports* 10 (1): 2463. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58836-4>.
- Özenver, Nadire, et Thomas Efferth. 2020. « Immunotoxicity of Therapeutic Antibodies and Nanoparticles ». *Critical Reviews in Immunology* 40 (1): 53-74. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2020033236>.
- Paller, Channing J., Michael A. Carducci, et George K. Philips. 2012. « Management of Bone Metastases in Refractory Prostate Cancer--Role of Denosumab ». *Clinical Interventions in Aging* 7: 363-72. <https://doi.org/10.2147/CIA.S27930>.

- Parkash, Jai, et Kamlesh Asotra. 2010. « Calcium Wave Signaling in Cancer Cells ». *Life Sciences* 87 (19-22): 587-95. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.09.013>.
- Pedersen, Stine Falsig, Grzegorz Owsianik, et Bernd Nilius. 2005. « TRP Channels: An Overview ». *Cell Calcium* 38 (3-4): 233-52. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.028>.
- Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, E. M. Brown, et M. A. Hediger. 2000a. « A Rat Kidney-Specific Calcium Transporter in the Distal Nephron ». *J Biol Chem* 275 (36): 28186-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909686199>.
- . 2000b. « A Rat Kidney-Specific Calcium Transporter in the Distal Nephron ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 28186-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909686199>.
- Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, H. Tsukaguchi, E. M. Brown, et M. A. Hediger. 1999. « Molecular Cloning and Characterization of a Channel-like Transporter Mediating Intestinal Calcium Absorption ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (32): 22739-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22739>.
- Peng, Ji-Bin, Edward M. Brown, et Matthias A. Hediger. 2003. « Epithelial Ca²⁺ Entry Channels: Transcellular Ca²⁺ Transport and Beyond ». *The Journal of Physiology* 551 (Pt 3): 729-40. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.043349>.
- Peng, Ji-Bin, Yoshiro Suzuki, Gergely Gyimesi, et Matthias A. Hediger. 2018. « TRPV5 and TRPV6 Calcium-Selective Channels ». In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*, édité par Juliusz Ashot Kozak et James W. Putney. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531440/>.
- Prevarskaya, Natalia, Roman Skryma, et Yaroslav Shuba. 2010. « Ion Channels and the Hallmarks of Cancer ». *Trends in Molecular Medicine* 16 (3): 107-21. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.005>.
- Putney, James W. 2011. « Origins of the Concept of Store-Operated Calcium Entry ». *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 3 (juin): 980-84. <https://doi.org/10.2741/202>.

- Qi, Huan, Haiqin Lu, Hua-Ji Qiu, Valery Petrenko, et Aihua Liu. 2012. « Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction ». *Journal of Molecular Biology* 417 (3): 129-43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>.
- Quero, Laurent, Stéphanie Wong-Hee-Kam, Sofia Rivera, et Christophe Hennequin. 2012. « [Association of radiotherapy and hormonotherapy in locally advanced prostate cancer] ». *Bulletin Du Cancer* 99 Suppl 1 (juillet): S30-36. <https://doi.org/10.1684/bdc.2012.1567>.
- Raphaël, Maylis, V'yacheslav Lehen'kyi, Matthieu Vandenberghe, Benjamin Beck, Sergiy Khalimonchuk, Fabien Vanden Abeele, Leonardo Farsetti, et al. 2014a. « TRPV6 Calcium Channel Translocates to the Plasma Membrane via Orail-Mediated Mechanism and Controls Cancer Cell Survival ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (37): E3870-3879. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413409111>.
- . 2014b. « TRPV6 Calcium Channel Translocates to the Plasma Membrane via Orail-Mediated Mechanism and Controls Cancer Cell Survival ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (37): E3870-3879. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413409111>.
- Reader, Rose H., Robert G. Workman, Ben C. Maddison, et Kevin C. Gough. 2019. « Advances in the Production and Batch Reformatting of Phage Antibody Libraries ». *Molecular Biotechnology* 61 (11): 801-15. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00207-0>.
- Roderick, H. Llewelyn, et Simon J. Cook. 2008. « Ca²⁺ Signalling Checkpoints in Cancer: Remodelling Ca²⁺ for Cancer Cell Proliferation and Survival ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (5): 361-75. <https://doi.org/10.1038/nrc2374>.
- Romero-Otero, Javier, Borja García-Gómez, José M. Duarte-Ojeda, Alfredo Rodríguez-Antolín, Antoni Vilaseca, Sigrid V. Carlsson, et Karim A. Touijer. 2016. « Active Surveillance for Prostate Cancer ». *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association* 23 (3): 211-18. <https://doi.org/10.1111/iju.13016>.
- Ross, Jeffrey S., Karen E. Gray, Iain J. Webb, Gary S. Gray, Mark Rolfe, David P. Schenkein, David M. Nanus, Mathew I. Millowsky, et Neil H. Bander. 2005. « Antibody-Based Therapeutics: Focus on Prostate Cancer ». *Cancer Metastasis Reviews* 24 (4): 521-37. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-6194-0>.

- Sakipov, Serzhan, Alexander I. Sobolevsky, et Maria G. Kurnikova. 2018. « Ion Permeation Mechanism in Epithelial Calcium Channel TRVP6 ». *Scientific Reports* 8 (1): 5715. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23972-5>.
- Saotome, Kei, Appu K. Singh, Maria V. Yelshanskaya, et Alexander I. Sobolevsky. 2016. « Crystal Structure of the Epithelial Calcium Channel TRPV6 ». *Nature* 534 (7608): 506-11. <https://doi.org/10.1038/nature17975>.
- Schalken, Jack A., et Geert van Leenders. 2003. « Cellular and Molecular Biology of the Prostate: Stem Cell Biology ». *Urology* 62 (5 Suppl 1): 11-20. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(03\)00758-1](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(03)00758-1).
- Shafi, Ayesha A., Aihua E. Yen, et Nancy L. Weigel. 2013. « Androgen Receptors in Hormone-Dependent and Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Pharmacology & Therapeutics* 140 (3): 223-38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003>.
- Shorning, Boris Y., Manisha S. Dass, Matthew J. Smalley, et Helen B. Pearson. 2020. « The PI3K-AKT-MTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): E4507. <https://doi.org/10.3390/ijms21124507>.
- Singh, Appu K., Luke L. McGoldrick, Edward C. Twomey, et Alexander I. Sobolevsky. 2018a. « Mechanism of Calmodulin Inactivation of the Calcium-Selective TRP Channel TRPV6 ». *Sci Adv* 4 (8): eaau6088. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6088>.
- . 2018b. « Mechanism of Calmodulin Inactivation of the Calcium-Selective TRP Channel TRPV6 ». *Science Advances* 4 (8): eaau6088. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6088>.
- Sobradillo, Diego, Miriam Hernández-Morales, Daniel Ubierna, Mary P. Moyer, Lucía Núñez, et Carlos Villalobos. 2014. « A Reciprocal Shift in Transient Receptor Potential Channel 1 (TRPC1) and Stromal Interaction Molecule 2 (STIM2) Contributes to Ca²⁺ Remodeling and Cancer Hallmarks in Colorectal Carcinoma Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (42): 28765-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581678>.
- Srikanth, Sonal, Kyun-Do Kim, et Yousang Gwack. 2014. « Methods to Measure Cytoplasmic and Mitochondrial Ca(2+) Concentration Using Ca(2+)-Sensitive

- Dyes ». *Methods in Enzymology* 543: 1-20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801329-8.00001-5>.
- Stark, Jennifer R., Sven Perner, Meir J. Stampfer, Jennifer A. Sinnott, Stephen Finn, Anna S. Eisenstein, Jing Ma, et al. 2009. « Gleason Score and Lethal Prostate Cancer: Does $3 + 4 = 4 + 3$? » *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (21): 3459-64. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.4669>.
- Stark, W. S., et G. S. Wasserman. 1972. « Transient and Receptor Potentials in the Electroretinogram of *Drosophila* ». *Vision Research* 12 (10): 1771-75. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(72\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0042-6989(72)90049-1).
- Steers, W. D. 2001. « 5alpha-Reductase Activity in the Prostate ». *Urology* 58 (6 Suppl 1): 17-24; discussion 24. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(01\)01299-7](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01299-7).
- Tannock, Ian F., Ronald de Wit, William R. Berry, Jozsef Horti, Anna Pluzanska, Kim N. Chi, Stephane Oudard, et al. 2004. « Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 351 (15): 1502-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040720>.
- Teo, Min Yuen, et Michael J. Morris. 2016. « Prostate-Specific Membrane Antigen-Directed Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 22 (5): 347-52. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000221>.
- Terrone, Carlo, Massimiliano Poggio, Enrico Bollito, Cecilia Maria Cracco, et Roberto Mario Scarpa. 2005. « [Asymptomatic prostatitis: a frequent cause of raising PSA] ». *Recenti Progressi in Medicina* 96 (7-8): 365-69.
- Ungaro, Antonio, Marcello Tucci, Alessandro Audisio, Lavinia Di Prima, Chiara Pisano, Fabio Turco, Marco Donatello Delcuratolo, Massimo Di Maio, Giorgio Vittorio Scagliotti, et Consuelo Buttigliero. 2022. « Antibody-Drug Conjugates in Urothelial Carcinoma: A New Therapeutic Opportunity Moves from Bench to Bedside ». *Cells* 11 (5): 803. <https://doi.org/10.3390/cells11050803>.
- Valdés-Tresanco, Mario S., Andrea Molina-Zapata, Aláin González Pose, et Ernesto Moreno. 2022. « Structural Insights into the Design of Synthetic Nanobody

- Libraries ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (7): 2198.
<https://doi.org/10.3390/molecules27072198>.
- Villers, A., A. Steg, et L. Boccon-Gibod. 1991. « Anatomy of the Prostate: Review of the Different Models ». *European Urology* 20 (4): 261-68.
<https://doi.org/10.1159/000471714>.
- Vlachostergios, Panagiotis J., Loredana Puca, et Himisha Beltran. 2017. « Emerging Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Current Oncology Reports* 19 (5): 32. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0593-6>.
- Wang, Bo, Sachith Gallolu Kankanamalage, Jianbo Dong, et Yue Liu. 2021. « Optimization of Therapeutic Antibodies ». *Antibody Therapeutics* 4 (1): 45-54. <https://doi.org/10.1093/abt/tbab003>.
- Weber, K., R. G. Erben, A. Rump, et J. Adamski. 2001. « Gene Structure and Regulation of the Murine Epithelial Calcium Channels ECaC1 and 2 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (5): 1287-94.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6121>.
- Weidle, Ulrich H., Fabian Birzele, Gwendlyn Kollmorgen, et Rüdiger Rieger. 2016. « Molecular Mechanisms of Bone Metastasis ». *Cancer Genomics & Proteomics* 13 (1): 1-12.
- Weiner, George J. 2015. « Building Better Monoclonal Antibody-Based Therapeutics ». *Nature Reviews. Cancer* 15 (6): 361-70.
<https://doi.org/10.1038/nrc3930>.
- Wise, Helen M., Miguel A. Hermida, et Nicholas R. Leslie. 2017. « Prostate Cancer, PI3K, PTEN and Prognosis ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 131 (3): 197-210. <https://doi.org/10.1042/CS20160026>.
- Wissenbach, Ulrich, Barbara Niemeyer, Nina Himmerkus, Thomas Fixemer, Helmut Bonkhoff, et Veit Flockerzi. 2004a. « TRPV6 and Prostate Cancer: Cancer Growth beyond the Prostate Correlates with Increased TRPV6 Ca²⁺ Channel Expression ». *Biochem Biophys Res Commun* 322 (4): 1359-63.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.042>.
- . 2004b. « TRPV6 and Prostate Cancer: Cancer Growth beyond the Prostate Correlates with Increased TRPV6 Ca²⁺ Channel Expression ». *Biochemical*

and Biophysical Research Communications 322 (4): 1359-63.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.042>.

Yin, Juan Juan, Claire B. Pollock, et Kathleen Kelly. 2005. « Mechanisms of Cancer Metastasis to the Bone ». *Cell Research* 15 (1): 57-62.
<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290266>.

Zhang, Jianping, Xingjuan Chen, Yucong Xue, Nikita Gamper, et Xuan Zhang. 2018. « Beyond Voltage-Gated Ion Channels: Voltage-Operated Membrane Proteins and Cellular Processes ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (10): 6377-85.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26555>.

Zhang, Shenyuan L., Ying Yu, Jack Roos, J. Ashot Kozak, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, Kenneth A. Stauderman, et Michael D. Cahalan. 2005. « STIM1 Is a Ca²⁺ Sensor That Activates CRAC Channels and Migrates from the Ca²⁺ Store to the Plasma Membrane ». *Nature* 437 (7060): 902-5.
<https://doi.org/10.1038/nature04147>.

Zhang, Xuexin, Ping Xin, Ryan E. Yoast, Scott M. Emrich, Martin T. Johnson, Trayambak Pathak, J. Cory Benson, et al. 2020. « Distinct Pharmacological Profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 Channels ». *Cell Calcium* 91 (novembre): 102281. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102281>.

Zhao, X. Y., et D. Feldman. 2001. « The Role of Vitamin D in Prostate Cancer ». *Steroids* 66 (3-5): 293-300. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(00\)00164-1](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(00)00164-1).

Zhou, Yubin, Paul Meraner, Hyoungh T. Kwon, Danya Machnes, Masatsugu Oh-hora, Jochen Zimmer, Yun Huang, Antonio Stura, Anjana Rao, et Patrick G. Hogan. 2010. « STIM1 Gates the Store-Operated Calcium Channel ORAI1 in Vitro ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (1): 112-16.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1724>.