

Université de Montréal

Rôle des facteurs de croissance dans la régulation des fonctions des cellules
épithéliales prostatiques

par

Isabelle Defoy

Département de médecine

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

Janvier 2002

© Isabelle Defoy, 2002



W
4
U58
2002
v. 030

15 APR 2002

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:
Rôle des facteurs de croissance dans la régulation des fonctions des cellules
épithéliales prostatiques

présentée par:
Isabelle Defoy

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Présidente :	Christiane Malo, Ph.D.
Directrice de recherche :	Simone Chevalier, Ph.D.
Membre du jury :	Martin G. Sirois, Ph.D.
Évaluateur externe :	Jean Charron, Ph.D.

Représentant du doyen:



Thèse acceptée le:

12 février 2002

Sommaire

Le cancer de la prostate est le premier en incidence chez les hommes d'Amérique du Nord. Bien que les causes exactes de son développement soient encore inconnues, sa progression d'un stade d'hormono-dépendance à un stade d'hormono-indépendance est bien documentée. Cette progression amène aussi une récurrence du cancer chez les patients dont le cancer avait été traité alors qu'il était hormono-dépendant. Présentement, aucune thérapie ne semble efficace contre un cancer de la prostate hormono-indépendant.

Cette thèse, intitulée «Rôle des facteurs de croissance dans la régulation des fonctions des cellules épithéliales prostatiques» avait donc pour buts de comprendre davantage l'implication de certains facteurs de croissance, dont le facteur de croissance prostatique (PGF), dans les fonctions des cellules épithéliales prostatiques ainsi que de déterminer si l'effet du PGF, comme c'est le cas de la majorité des facteurs de croissance connus, passait par l'activation de tyrosine kinases.

L'hypothèse proposée qui veut que la prostate soit composée d'une population hétérogène de cellules épithéliales dont les cellules basales sont les cellules souches, ainsi que la mise en évidence d'un facteur de croissance, le PGF, dont l'activité mitogénique sur les cellules épithéliales prostatiques a été démontrée, constituent le point de départ des travaux réalisés et présentés dans cette thèse.

La démonstration que le sérum humain contient une activité mitogénique associée au PGF plus élevée chez les patients atteints de pathologies prolifératives prostatiques permet de renforcer le rôle primordial du PGF dans la prolifération des cellules épithéliales prostatiques. La mise en évidence d'une tyrosine kinase de 50 kDa dont l'activité augmente à la suite du traitement des cellules avec le PGF suggère que l'action du PGF va de pair avec le mécanisme d'action connu des facteurs de croissance. Malgré le fait que l'identité de cette tyrosine kinase soit encore inconnue, les démarches entreprises dans ce but ont permis de révéler

la présence d'une nouvelle forme de Src et d'un des récepteurs du VEGF, Flt-1. La démonstration, pour la première fois, que le VEGF, un facteur de croissance associé aux cellules endothéliales, puisse transmettre un signal dans les cellules épithéliales prostatiques qui implique Fak, la kinase d'adhésion focale, ainsi que les cellules neuroendocrines et leurs divers produits de sécrétion est très prometteuse. L'activation de Fak, par divers produits de sécrétion des cellules neuroendocrines et par le contact avec des protéines de la matrice extracellulaire, place Fak dans une position-clé en ce qui concerne le développement et/ou la progression du cancer de la prostate.

Les travaux présentés dans cette thèse posent plusieurs prémisses dans le contrôle des fonctions (étalement, prolifération, motilité/invasion) des cellules épithéliales prostatiques et ouvrent la voie à de nombreux champs d'études qui devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes menant au développement du cancer de la prostate. Les études qui découleront des travaux présentés ici devraient permettre d'identifier des cibles dans le but de développer des stratégies efficaces de traitement du cancer de la prostate. De telles cibles pourraient être Fak, le PGF, la p50 activée par le PGF, ainsi que le VEGF et son récepteur.

Table des matières

PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY.....	II
SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
LISTE D'ABRÉVIATION DES ACIDES AMINÉS	XX
INTRODUCTION.....	1
1. LA PROSTATE	1
1.1. Anatomie et physiologie.....	1
1.1.1. Localisation.....	1
1.1.2. Fonction	2
1.1.3. Rôle des androgènes	5
1.2 Histologie.....	5
1.2.1. Cellules basales	6
1.2.2. Cellules sécrétrices	6
1.2.3. Cellules neuroendocrines.....	8
1.3. Pathologies prolifératives.....	10
1.3.1. Hyperplasie bénigne prostatique	10
1.3.2. Néoplasie prostatique intraépithéliale (PIN).....	12
1.3.3. Cancer.....	12
1.3.3.1. Incidence et causes.....	13
Âge	13
Causes génétiques.....	14

<i>Causes environnementales et nutritionnelles</i>	15
1.3.3.2. <i>Dépistage</i>	18
<i>Toucher rectal</i>	19
<i>Antigène prostatique spécifique</i>	19
<i>Biopsies</i>	20
1.3.3.3. <i>Évolution</i>	21
<i>Hormono-dépendance et hormono-indépendance</i>	21
<i>Formation de métastases</i>	24
1.3.3.4. <i>Traitements</i>	26
<i>Chirurgical</i>	26
<i>Hormonal</i>	26
2. MODÈLES D'ÉTUDES	28
2.1. <i>In vivo</i>	28
2.1.1 <i>Humain</i>	28
2.1.2. <i>Singe</i>	29
2.1.3. <i>Rongeurs</i>	29
2.1.4. <i>Chien</i>	30
2.2. <i>In vitro</i>	32
2.2.1. <i>Lignées cancéreuses humaines</i>	33
2.2.2. <i>Rongeurs</i>	34
2.2.3. <i>Chien</i>	35
3. SIGNALISATION ET CANCER DE LA PROSTATE.....	37
3.1. <i>Régulation de la prolifération cellulaire</i>	37
3.1.1. <i>Hormones stéroïdiennes</i>	39
3.1.2. <i>Facteurs de croissance</i>	44
3.1.3. <i>Tyrosine kinases</i>	54
3.1.3.1. <i>Tyrosine kinases de type récepteur</i>	55
3.1.3.2. <i>Tyrosine kinases de type non-récepteur</i>	61
<i>Famille de Src</i>	61
<i>Structure de Src</i>	61
<i>Régulation de Src</i>	66

<i>Fonctions de Src</i>	67
<i>Autres motifs</i>	68
<i>Fak</i>	68
<i>Jak</i>	76
3.1.4. <i>Sérine/thréonine kinases</i>	76
3.1.5. <i>Phosphatases</i>	77
3.1.6. <i>Récepteurs couplés aux protéines G</i>	78
3.1.7. <i>Oncogènes</i>	81
3.1.8. <i>Gènes suppresseurs de tumeurs</i>	82
3.2. <i>Apoptose</i>	84
3.3. <i>Angiogénèse</i>	88
3.3.1. <i>Densité des microvaisseaux</i>	88
3.3.2. <i>VEGF et ses récepteurs</i>	89
3.3.3. <i>Autres facteurs et leurs récepteurs</i>	93
3.4. <i>Motilité et invasion</i>	94
3.4.1. <i>Adhésion</i>	95
3.4.1.1. <i>Cytosquelette</i>	95
3.4.1.2. <i>Plaques d'adhésion</i>	97
3.4.1.3. <i>Matrice extracellulaire</i>	97
3.4.1.4. <i>Intégrines (cellule - matrice)</i>	98
3.4.1.5. <i>Cadhérines (cellule - cellule)</i>	102
3.4.2. <i>Enzymes</i>	105
3.4.2.1. <i>Métalloprotéinases</i>	105
3.4.2.2. <i>Urokinase</i>	106
4. HYPOTHÈSES ET BUT	107
MATÉRIELS ET MÉTHODES	110
1. ÉTAPES DE PURIFICATION PARTIELLE DU PGF	110
1.1. <i>Obtention des sérums canins et humains</i>	110
1.2. <i>Acidification, extraction des peptides et délipidation</i>	110
1.3. <i>Filtration sur tamis moléculaire</i>	111
1.3.1. <i>Bio-Gel P-30</i>	112

1.3.2. <i>Bio-Gel P-4</i>	112
1.3.3. <i>Bio-Gel P-2</i>	112
1.4. <i>Ultrafiltration des sérums (humains et canins)</i>	112
1.5. <i>Hydrolyse acide</i>	113
2. <i>CULTURE CELLULAIRE</i>	113
2.1. <i>Isolation des cellules épithéliales de prostates canines</i>	113
2.2. <i>Culture primaire de cellules épithéliales canines</i>	114
2.3. <i>Culture de lignées cellulaires</i>	114
2.4. <i>Préparation de matrice extracellulaire naturelle</i>	115
2.5. <i>Traitement des cellules</i>	115
2.6. <i>Extraction des protéines cellulaires</i>	115
2.7. <i>Préparation d'extrait de protéines membranaires à partir du placenta humain</i>	116
2.8. <i>Marquage métabolique aux acides aminés soufrés-³⁵S</i>	116
2.9. <i>Dosage de protéines et de peptides</i>	117
3. <i>ÉVALUATION DE LA RÉPONSE DES CELLULES</i>	118
3.1. <i>Coloration des cellules au bleu de méthylène</i>	118
3.2. <i>Mesure de la synthèse d'ADN</i>	118
3.2.1. <i>Évaluation de la réponse après trois jours de culture</i>	118
3.2.2. <i>Évaluation de la réponse lorsque les cellules sont cultivées moins de trois jours</i>	119
3.3. <i>Comptage des cellules</i>	119
3.4. <i>MTT</i>	120
3.5. <i>Quantification de l'ADN cellulaire par spectrofluorimétrie</i>	120
3.6. <i>Test d'invasion</i>	121
4. <i>ÉLECTROPHORÈSES</i>	122
4.1. <i>Immunoprécipitation</i>	122
4.2. <i>Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)</i>	123
4.3. <i>Gel de peptides</i>	123
4.4. <i>Électrophorèse en conditions non-dénaturantes (ND-PAGE)</i>	124
4.5. <i>Focalisation isoélectrique</i>	124

4.6. Transfert.....	125
4.7. Immunodétection (Western blot).....	125
4.8. Coloration à l'argent	126
4.9. Renaturation	127
4.10. Analyse des acides aminés phosphorylés.....	128
5. CLONAGE DE KINASES PAR PCR	128
5.1. Isolation de l'ARNm et synthèse de l'ADNc	128
5.2. Réaction de PCR.....	129
5.3. Clonage et transformation des bactéries	130
5.4. Isolation et dénaturation des plasmides	130
5.5. Séquençage	131
6. ANALYSES STATISTIQUES.....	131
RÉSULTATS.....	133
1. ÉTUDES SUR LE PGF	133
1.1. <i>Activité mitogénique du PGF</i>	133
1.1.1. <i>Purification partielle du PGF humain</i>	134
1.1.2. <i>Comparaison de l'activité PGF totale, liée et libre des sérums de chien et d'humain</i>	136
1.2. <i>Mise au point de tests permettant la quantification de l'activité du PGF</i>	142
1.2.1. <i>Effet du PGF canin sur la synthèse d'ADN: optimisation des conditions expérimentales</i>	143
1.2.2. <i>Comparaison de diverses méthodes pour quantifier l'effet mitogénique du PGF</i>	149
1.3. <i>Activité du PGF canin sur des lignées cellulaires prostatiques humaines</i>	154
1.4. <i>Électrophorèse bi-dimensionnelle</i>	155
2. PGF ET TYROSINE KINASE.....	159
3. CARACTÉRISATION DE TYROSINE KINASES IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES.....	167
3.1. <i>Expression de tyrosine kinases présentes dans les cultures primaires</i> 168	

3.2. <i>Études sur Src</i>	173
4. CLONAGE PAR PCR DE KINASES EXPRIMÉES DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE PROSTATE DE CHIEN	178
4.1. <i>Expression et activation de Flt-1</i>	184
5. RÔLE DES CELLULES NEUROENDOCRINES DANS LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE.....	190
5.1. <i>Tests d'invasion</i>	190
5.2. <i>Expression et régulation de l'activation de Fak dans les cellules épithéliales prostatiques</i>	195
DISCUSSION	209
1. ÉTUDES SUR LE PGF	209
2. PGF ET TYROSINE KINASE	216
3. CARACTÉRISATION DE TYROSINE KINASES EXPRIMÉES DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES PROSTATIQUES EN CULTURE PRIMAIRE	220
4. CLONAGE PAR PCR DE KINASES EXPRIMÉES DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE PROSTATE DE CHIEN	230
5. EXPRESSION ET ACTIVATION DE FLT-1 PAR LE VEGF	234
6. RÔLE DES CELLULES NEUROENDOCRINES DANS LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE	240
7. CONCLUSION	248
8. PERSPECTIVES	249
SOURCES DOCUMENTAIRES	254
REMERCIEMENTS	XXI

Liste des tableaux

Tableau 1	Caractéristiques des lignées cellulaires prostatiques humaines	34
Tableau 2	Caractéristiques d'agents fluorescents utilisés pour quantifier l'ADN	121
Tableau 3	Caractéristiques des différents anticorps utilisés pour immunodétection	126
Tableau 4	Détermination de la concentration de protéines par cellule	142
Tableau 5	Récapitulation des résultats (pI) obtenus lors de l'immunodétection de Src suite à la séparation des protéines par focalisation isoélectrique et SDS-PAGE	178
Tableau 6	Résultats du clonage par PCR	179
Tableau 7	Analyse des clones positifs obtenus par clonage par PCR	183
Tableau 8	Homologie de séquence de Flt-1 canin avec les séquences retrouvées chez l'humain et chez les rongeurs	185
Tableau 9	Compilation des résultats d'invasion en présence et en absence de bombésine	193

Liste des figures

Figure 1	Localisation anatomique de la prostate chez l'homme.....	3
Figure 2	Répartition de la prostate humaine en trois zones.....	4
Figure 3	Histologie de la prostate humaine.....	7
Figure 4	Changements histologiques de la prostate humaine survenant avec le développement et la progression du cancer.....	11
Figure 5	Voies de signalisation menant à la prolifération des cellules.....	38
Figure 6	Structure du récepteur des androgènes et voie de signalisation des androgènes.....	40
Figure 7	Structure des récepteurs de facteurs de croissance.....	56
Figure 8	Voie de signalisation des tyrosine kinases.....	57
Figure 9	Voie de signalisation des Jak et des STAT.....	60
Figure 10	Structure de Src.....	62
Figure 11	Activation et inhibition de Src.....	65
Figure 12	Structure de Fak.....	70
Figure 13	Voies de signalisation de Fak.....	75
Figure 14	Voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	80
Figure 15	Famille des récepteurs du VEGF.....	91
Figure 16	Réorganisation du cytosquelette.....	96
Figure 17	Famille des intégrines et voies de signalisation.....	99
Figure 18	Voies de signalisation des cadhérines.....	103
Figure 19	Détermination du poids moléculaire apparent du PGF humain.....	135
Figure 20	Effet des sérums canin et humain.....	137
Figure 21	Fractionnement des sérums par ultrafiltration.....	140
Figure 22	Effet des sérums humains.....	141
Figure 23	Optimisation de l'essai d'incorporation de thymidine- ³ H dans l'ADN des cellules prostatiques canines.....	144
Figure 24	Validation du test d'incorporation de thymidine- ³ H dans l'ADN des cellules prostatiques canines.....	148
Figure 25	Comparaison de diverses méthodes pour quantifier l'effet du	

	sérum sur la prolifération des cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire.....	151
Figure 26	Effet du PGF sur la synthèse d'ADN de lignées cellulaires cancéreuses prostatiques humaines.....	156
Figure 27	Séparation électrophorétique en deux dimensions du PGF canin libre partiellement purifié.....	158
Figure 28	Effet du sérum sur le patron de phosphorylation des protéines sur tyrosine.....	160
Figure 29	Effet du PGF sur le patron de phosphorylation des protéines sur tyrosine.....	161
Figure 30	Activation de kinases par le PGF et analyse des acides aminés phosphorylés.....	163
Figure 31	Activation d'une tyrosine kinase de 50kDa par le PGF.....	165
Figure 32	Comparaison de l'activation de kinases par le PGF et analyse des acides aminés phosphorylés.....	166
Figure 33	Cinétique d'expression des kinases des cellules prostatiques épithéliales canines en culture primaire.....	169
Figure 34	Association de Fak avec différentes kinases.....	172
Figure 35	Expression des Src kinases dans les cellules épithéliales prostatiques.....	174
Figure 36	Séparation par focalisation isoélectrique et SDS-PAGE des diverses isoformes de la protéine Src.....	176
Figure 37	Résultats de PCR.....	180
Figure 38	Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique purifié des clones obtenus par PCR.....	181
Figure 39	Expression de Flt-1.....	188
Figure 40	Activation de Flt-1 par le VEGF dans les cellules PC-3.....	189
Figure 41	Mise au point des tests d'invasion.....	192
Figure 42	Effet de la bombésine sur l'invasion des cellules PC-3.....	194
Figure 43	Expression de Fak dans diverses cellules prostatiques.....	196
Figure 44	Comparaison de protéines complexées à Fak dans les cellules	

	PC-3 et LNCaP marquées à la méthionine- ³⁵ S.....	198
Figure 45	Morphologie des cellules LNCaP.....	200
Figure 46	Expression et activation accrues de Fak dans les cellules LNCaP cultivées sur de la matrice extracellulaire naturelle.....	201
Figure 47	Activation de Fak par la bombésine dans les lignées dérivées des PC-3	203
Figure 48	Activation de Fak par la bombésine dans les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire.....	206
Figure 49	Activation de Fak par différents produits de sécrétion des cellules neuroendocrines dans les cellules PC-3.....	207
Figure 50	Activation de Fak par le VEGF dans les cellules PC-3.....	208

Liste des sigles et abréviations

A:	ampères
aa:	acide aminé
AC:	adénylate cyclase
ACN:	acétonitrile
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP:	adénosine monophosphate
AMPC:	AMP cyclique (adénosine 3,5'-cyclique monophosphate)
APS:	antigène prostatique spécifique
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
c:	centi (10^{-2})
°C:	degré Celsius
CAE:	antigène carcinoembryonnaire
CAM:	molécule d'adhésion cellulaire (cell adhesion molecule)
CaP:	cancer de la prostate
CGP:	produits reliés à la calcitonine
CHAPS:	acide cyclohexylaminopropane sulfonique
Da:	Dalton
DAG:	diacylgcérol
DCC:	gène délété dans le cancer du colon
DHT:	dihydrotestostérone
DMSO:	diméthyl sulfoxyde
DTT:	dithiothréitol
ECM:	matrice extracellulaire
EDTA:	acide éthylènediamine tétraacétique
EGF:	facteur de croissance épidermique
EGTA:	acide éthylènebis(oxyéthylènenitrilo) tétraacétique
ELISA:	essai d'immunosorption enzymatique (enzyme-linked immunosorbent assay)

FACS:	analyse par cytométrie en flux
FC:	facteur de croissance
FGF:	facteur de croissance fibroblastique
g:	accélération gravitationnelle à la surface de la Terre ($9,81\text{m/s}^2$)
GDP:	guanosine diphosphate
GM-CSF:	facteur stimulant de colonies de type granulocyte-macrophage
GMP:	guanosine monophosphate
GMPC:	GMP cyclique (guanosine 3,5'-cyclique monophosphate)
GPI:	glycosylphosphatidylinositol
GRP:	facteur de relâche de la gastrine
GTP:	guanosine triphosphate
h:	heure(s)
HBP:	hyperplasie bénigne prostatique
HBSS:	solution saline ("Hank's balanced salt solution")
HEPES:	acide N-(2-hydroxylméthyl)-1-piperazine éthane sulfonique
HGF:	facteur de croissance hépatocytaire
IC:	intervalle de confiance
ICE:	interleukin-1 β converting enzyme
IEF:	focalisation isoélectrique
IGF:	facteur de croissance similaire à l'insuline
IP3:	inositol triphosphate
IPTG:	isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
k:	kilo
KGF:	facteur de croissance des kératinocytes
λ :	longueur d'onde (lambda)
μ :	micro (10^{-6})
m:	milli (10^{-3})
m:	mètre
M:	molaire (moles/L)
MAPK:	"mitogen associated protein kinase"
MARK:	"microtubule-affinity regulating kinase"

MEM:	milieu minimum essentiel
min:	minute(s)
MMP:	métalloprotéinase
MTT:	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényl-tétrazolium
n:	nano (10^{-9})
ND:	non-dénaturant
NE:	neuroendocrine
NP-40:	nonidet P-40
p:	pico (10^{-12})
p/v:	poids / volume
PAI-1:	inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène
PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAP:	phosphatase acide prostatique
pb:	paire de base
PBS:	tampon phosphate ("phosphate-buffered saline")
PCR:	réaction de polymérase en chaîne
PGF:	facteur de croissance prostatique
pI:	point isoélectrique
PIN:	néoplasie prostatique intraépithéliale
PIP2:	phosphoinositol biphosphate
PKA:	protéine kinase A
PKC:	protéine kinase C
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
PLC:	phospholipase C
PM:	poids moléculaire
PMSF:	fluorure de phénylméthylsulfonyl
poly(Glu, Tyr):	polymère d'acides glutamique et de tyrosine (4:1)
pS:	phosphosérine
PSMA:	antigène membranaire prostatique spécifique
PSP:	phosphosérine phosphatase
pT:	phosphothréonine

PTH:	parathormone
PTHrP:	peptide relié à la parathormone
PTP:	phosphotyrosine phosphatase
pY:	phosphotyrosine
R:	récepteur
Rb:	protéine du rétinoblastome
RIA:	dosage radioimmunologique
RT:	transcriptase réverse
S/TK:	sérine/thréonine kinase
SDS:	sodium dodécyl sulfate
SHBG:	« sex-hormone-binding globulin »
TCA:	acide trichloroacétique
TEMED:	tétraméthyléthylènediamine
TFA:	acide trifluoroacétique
TIMP:	inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TK:	tyrosine kinase
Tris:	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TSH:	hormone thyroïdienne (thyrotropine)
TTBS:	tampon Tris additionné de Tween-20 (“Tris-buffered saline”)
uPA:	activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR:	récepteur de l’activateur du plasminogène de type urokinase
UV:	ultra-violet
V:	volts
VEGF:	facteur de croissance vasculaire
VIP:	peptide vasoactif intestinal
X-gal:	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside

Bases azotées: A:	adénine
C:	cytosine
G:	guanine
T:	thymine
U:	uracile
K:	G ou T
M:	A ou C
N:	A, C, G ou T
R:	A ou G
S:	G ou C
W:	A ou T
Y:	C ou T

Liste d'abréviation des acides aminés

- A: Alanine (Ala)
- B: Asparagine ou acide aspartique (Asx)
- C: Cystéine (Cys)
- D: Acide aspartique (Asp)
- E: Acide glutamique (Glu)
- F: Phénylalanine (Phe)
- G: Glycine (Gly)
- H: Histidine (His)
- I: Isoleucine (Ile)
- K: Lysine (Lys)
- L: Leucine (Leu)
- M: Méthionine (Met)
- N: Asparagine (Asn)
- P: Proline (Pro)
- Q: Glutamine (Gln)
- R: Arginine (Arg)
- S: Sérine (Ser)
- T: Thréonine (Thr)
- V: Valine (Val)
- W: Tryptophane (Trp)
- Y: Tyrosine (Tyr)
- Z: Glutamine ou acide glutamique (Glx)

Remerciements

Je voudrais remercier ma directrice de thèse, Simone Chevalier, pour m'avoir pris sous son aile et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Elle a aussi su me transmettre une partie de ses nombreuses connaissances. Au fil des ans, elle a su renforcer ma soif de savoir, ma discipline personnelle et ma rigueur. Je lui suis grée de tout l'apprentissage que j'ai fait au cours de ces nombreuses années passées dans son laboratoire, tout d'abord à titre de stagiaire, puis à titre d'étudiante graduée.

Je voudrais aussi remercier tout le personnel du laboratoire, étudiants et employés, avec qui j'ai pu interagir et enrichir mes connaissances au cours des ans. Je voudrais remercier particulièrement Manon Dorval et Sylvain Tessier pour m'avoir transmis les rudiments «du métier» et pour avoir partagé leur savoir avec moi. Merci à Armen G. Aprikian qui a cru en moi et m'a permis de renouveler ma confiance en moi-même et d'entrevoir d'autres aspects de la recherche. Merci pour m'avoir permis de continuer les travaux sur Fak. Merci à Laurent Guy, qui a partagé avec moi les premiers pas du VEGF dans la prostate. Merci aussi à Marc Bélisle pour son aide précieuse au niveau des statistiques.

Enfin, je voudrais remercier mon père et mon frère pour leur support constant et leur présence tout au long de cette importante étape parsemée d'embûches.

Introduction

L'introduction est divisée en quatre grandes sections, elles-même divisées en sous-sections. Dans la première section, il est question de la prostate en général: sa physiologie (incluant anatomie et histologie) et les pathologies prolifératives qui l'affectent. La seconde section présente les modèles permettant l'étude de la régulation des fonctions des cellules de la prostate. Dans la troisième section, les différents aspects de la signalisation intracellulaire sont décrits et pour chacun d'eux, les connaissances au niveau de la prostate sont détaillées. Les sujets abordés sont: la régulation de la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogénèse et finalement, la motilité et l'invasion. Enfin, la quatrième section regroupe les hypothèses et but de cette thèse.

1. La prostate

L'information présentée ici sur les différentes caractéristiques de la prostate est celle qui est jugée pertinente à la compréhension des résultats obtenus. De nombreux autres aspects auraient pu faire l'objet de sous-divisions mais l'espace restreint oblige à faire certains choix.

1.1. Anatomie et physiologie

L'information présentée ici porte sur les caractéristiques anatomiques et physiologiques, ainsi qu'histologiques.

1.1.1. Localisation

Ainsi qu'il est possible de le constater à la figure 1, la prostate est située directement sous la vessie. Elle est traversée par l'urètre et les canaux déférents rejoignent l'urètre dans la prostate. La prostate, d'un poids d'environ 20g chez l'adulte, peut être séparée en trois zones (transition, centrale et périphérique) et en un stroma fibromusculaire antérieur (Lalani *et al.*, 1997; Oesterling *et al.*, 1997).

La répartition de ces zones est illustrée à la figure 2. Il est à noter qu'il est impossible de distinguer ces zones sur la seule base anatomique.

1.1.2. Fonction

La prostate est une glande exocrine. Ses produits de sécrétion se mélangent à ceux des glandes annexes du système urogénital mâle. Le rôle de ces produits de sécrétion est principalement au niveau de la reproduction. Ainsi, parmi les différents produits libérés par les cellules sécrétrices se retrouve l'antigène prostatique spécifique (APS) qui est une protéase à sérine de la famille des kallikréines. L'APS sert à liquéfier le plasma séminal lors de l'éjaculation (Wang *et al.*, 1979, Riegman *et al.*, 1989). L'APS est aussi exprimé par les cellules neuroendocrines (NE) de la prostate (voir section 1.2.3.). Lors de certaines pathologies, l'APS se retrouve anormalement dans le sang et il peut alors servir de marqueur, notamment pour la progression du cancer de la prostate (CaP) (voir section 1.3.3.2.). Contrairement à la croyance initiale, l'APS n'est pas spécifique à la prostate. On peut le retrouver, bien qu'en quantités beaucoup plus faibles, dans les glandes salivaires (Van Krieken, 1993) et chez la femme dans les tumeurs mammaires, le lait maternel et le liquide amniotique (Yu *et al.*, 1994a). La prostate sécrète aussi la phosphatase acide prostatique (PAP), dont le rôle n'est pas vraiment connu (Lin et Clinton, 1987). Cette protéine est aussi un marqueur de différenciation des cellules sécrétrices, qui a déjà servi de marqueur du CaP avant l'avènement de l'APS. Certaines études suggèrent que la PAP, en tant que phosphatase, régule de façon négative la prolifération des cellules prostatiques (Nguyen *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1994).

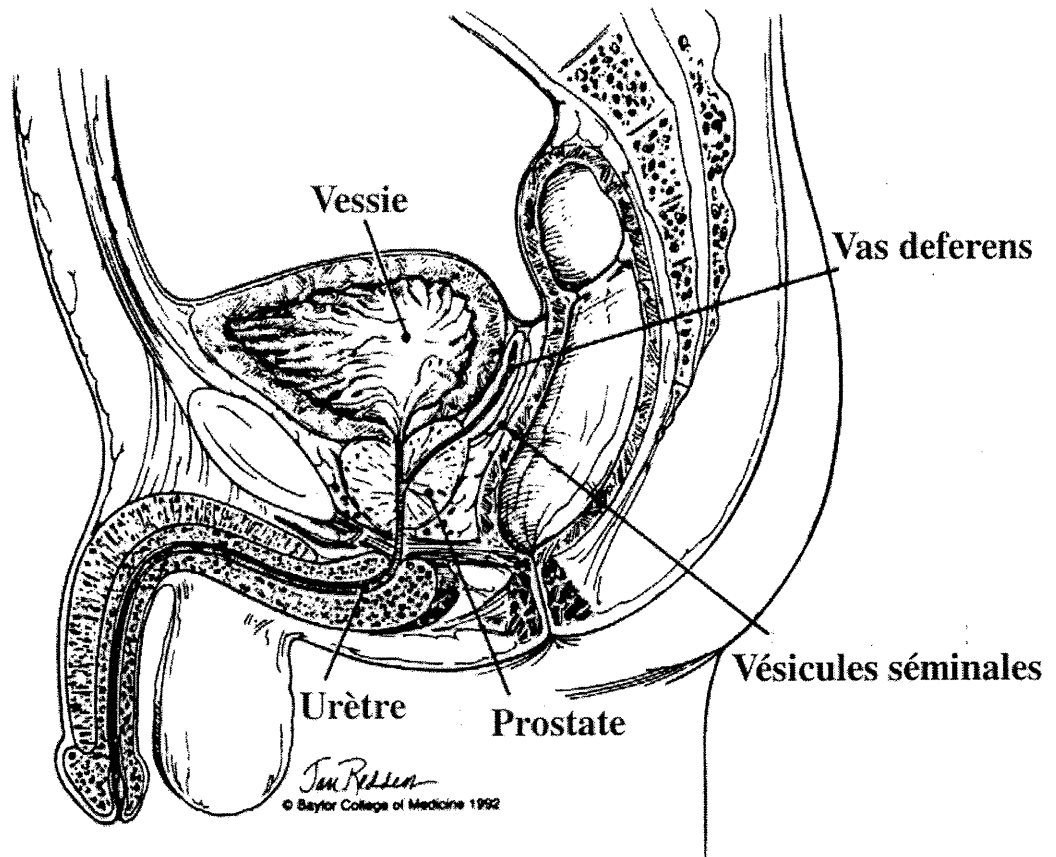


Figure 1 Localisation anatomique de la prostate chez l'homme

La prostate est située sous la vessie et elle est traversée par l'urètre.

La prostate est palpable par le rectum (toucher rectal). Tiré de: Oesterling *et al.* (1997).

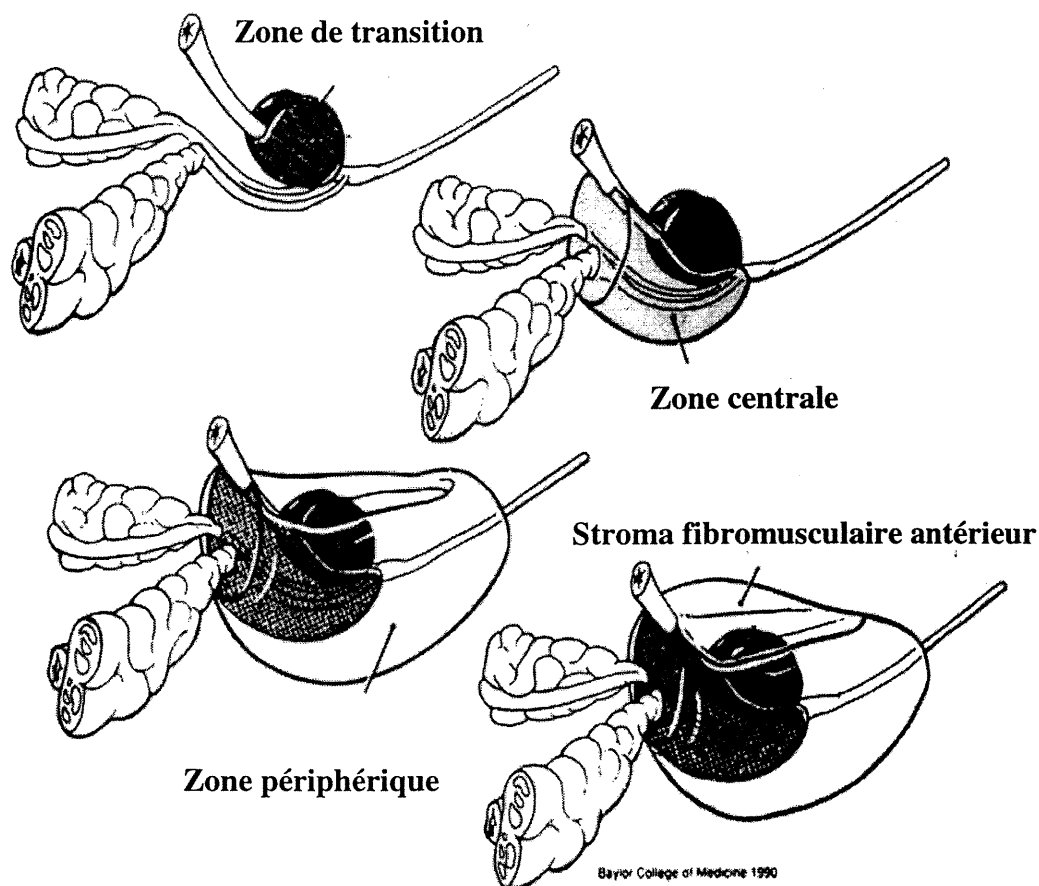


Figure 2 Répartition de la prostate humaine en trois zones

La prostate est répartie en trois zones anatomiques distinctes, ainsi qu'en un stroma fibromusculaire antérieur. Chez l'adulte (prostate normale), la zone de transition occupe 10% du volume de la prostate, la zone centrale occupe 25% du volume de la prostate et la zone périphérique occupe 65% du volume de la prostate. Tiré de: Oesterling *et al.* (1997).

1.1.3. Rôle des androgènes

Le métabolite de la testostérone actif dans la prostate est la dihydrotestostérone ou DHT. La testostérone est convertie en DHT par la 5α -réductase dans la prostate et certains organes périphériques (Oesterling *et al.*, 1997). Les récepteurs des androgènes sont surtout présents dans les cellules épithéliales sécrétrices mais on peut en retrouver quelques fois dans les cellules basales. Ils sont cependant absents des cellules NE (Lalani *et al.*, 1997). Le récepteur des androgènes a aussi été identifié dans les fibroblastes et dans les cellules musculaires lisses qui composent le stroma prostatique (Toney et Danzo, 1988). Les androgènes, en particulier la DHT, sont essentiels au développement, à la croissance, à la différenciation et au maintien de la morphologie et de la fonction sécrétrice de la prostate (Aumüller, 1983; Davies et Eaton, 1991). De la naissance à la puberté, la prostate est à peine plus grosse qu'une noix. Puis, à la puberté, sous l'action des androgènes, la prostate grossit rapidement pour augmenter de volume et de poids jusqu'à la deuxième décennie où elle pèse environ 20g. Elle croît ensuite très lentement jusqu'à la cinquième décennie et le développement de l'hyperplasie bénigne (HBP) ou du cancer. Le rôle des androgènes a notamment été démontré grâce aux eunuques, chez qui la prostate ne se développe pas (Coffey, 1993). Dans les années 1940, il a été démontré que la castration d'un sujet adulte (homme, chien, rat) provoque une atrophie de la prostate (Huggins et Hodges, 1941). Cette atrophie est le résultat de l'apoptose (mort cellulaire programmée) des cellules sécrétrices sensibles aux androgènes (Bui et Reiter, 1999).

1.2 Histologie

La prostate est recouverte d'une capsule fibreuse (Ayala *et al.*, 1989) à l'intérieur de laquelle se retrouvent de nombreuses glandes, ou acinis, composées d'épithélium et séparées par du stroma (figure 3). Ce dernier contient des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, parmi lesquels sont dispersés les vaisseaux sanguins et le complexe de neurones innervant la prostate. L'épithélium est

constitué des trois types de cellules: les cellules basales, les cellules sécrétrices (aussi nommées luminales) et les cellules NE.

1.2.1. Cellules basales

Il est de plus en plus reconnu que les cellules basales sont en fait des cellules souches qui se divisent et se différencient en cellules luminales (Chevalier *et al.*, 1980, 1981). En ce sens, les cellules basales donneraient naissance aux deux autres types de cellules: les cellules sécrétrices et les cellules NE (Noordzij *et al.*, 1995; Bonkhoff et Remberger, 1996; Xue *et al.*, 1998). Les cellules basales sont les seules cellules ayant un index de prolifération, ce qui donne du poids à cette hypothèse encore controversée. Les cellules basales sont caractérisées par l'expression spécifique de cytokératines de haut poids moléculaire (Wernert *et al.*, 1987; Sherwood *et al.*, 1991). Les cellules basales présentent un aspect plutôt arrondi et elles reposent sur une membrane basale. C'est dans cette dernière que l'on retrouve les protéines caractéristiques de la matrice extracellulaire (ECM), par exemple: le collagène de type IV, la laminine, l'entactine et la fibronectine (Nagle *et al.*, 1994). En général, les cellules basales ne forment qu'une seule couche, surmontée des cellules sécrétrices. Récemment, un antigène des cellules souches prostatiques a été identifié comme pouvant jouer un rôle dans le renouvellement des cellules souches ou dans leur prolifération (Reiter *et al.*, 1998). Il s'agit d'une protéine fortement glycosylée, possédant une séquence permettant l'ancrage à la membrane par des groupements glycosylphosphatidylinositol (GPI) et dont l'expression est augmentée dans le CaP (Reiter *et al.*, 1998).

1.2.2. Cellules sécrétrices

Les cellules sécrétrices sont différenciées et elles ne se divisent plus. Elles ont un aspect plutôt cylindrique ou cuboïdal, avec un noyau décentré situé à leur base. Elles sécrètent leurs produits, dont l'APS, dans la lumière des acinis qu'elles bordent. Il est aussi possible de distinguer les cellules sécrétrices par leurs cytokératines qui sont différentes de celles produites par les cellules basales (Wernert *et al.*, 1987; Sherwood *et al.*, 1991).

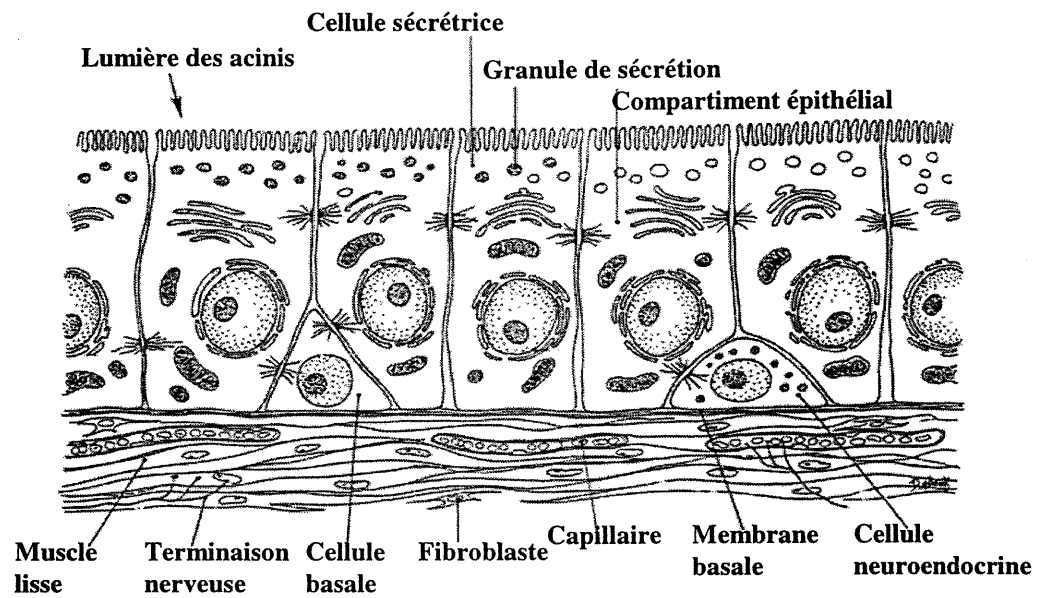


Figure 3 Histologie de la prostate humaine

Représentation des différentes composantes cellulaires de la prostate humaine normale. Tiré de: Oesterling *et al.* (1997).

Si l'hypothèse voulant que les cellules sécrétrices soient issues des cellules basales ne fait presque aucun doute, leur rôle dans le cancer est encore controversé. Certains ont cru que lors du processus de transformation conduisant au CaP, les cellules sécrétrices se différenciaient pour devenir les cellules cancéreuses qui prolifèrent (Bonkhoff et Remberger, 1996). Mais Bonkhoff a lui-même récemment rejeté cette hypothèse et préconise, comme plusieurs autres, l'aspect terminal de la différenciation des cellules sécrétrices ne pouvant mener qu'à leur mort (Bonkhoff, 1998). Ceci est en accord avec le schéma proposé dans les années 1980 par le groupe de Chevalier (Chevalier *et al.*, 1981).

1.2.3. Cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines (NE) sont peu nombreuses dans la prostate. On compte en moyenne une cellule NE par acinus, intercalées aléatoirement dans l'acinus. Les cellules NE ont une forme un peu triangulaire et possèdent des extensions de type dendritique. À leur surface, il y a des granules de sécrétion qui renferment plusieurs produits de sécrétion caractéristiques. Les plus fréquents sont: l'hormone thyroïdienne (TSH), la chromogranine A, la sérotonine, le facteur de relâche de la gastrine (GRP) et l'énolase spécifique neuronale (neuron-specific enolase) (Aprikian *et al.*, 1993). La calcitonine, le peptide relié au gène de la calcitonine, la katacalcine, la somatostatine, ainsi que la parathormone (PTH) et son peptide (PTHrP) font aussi partie des produits sécrétés par les cellules NE (Noordzij *et al.*, 1995). L'hétérogénéité des cellules NE qui se reflète par des patrons d'expression distincts de leurs produits de sécrétion suggère que ces cellules puissent jouer plusieurs rôles, encore inconnus. Tel que mentionné précédemment, les cellules NE sécrètent aussi de l'APS (Noordzij *et al.*, 1995), mais ne possèdent pas de récepteurs androgéniques (Krijnen *et al.*, 1993; Bonkhoff, 1998). L'origine, neurale vs prostatique, des cellules NE a récemment été remise en question (Aumüller *et al.*, 1999). Bien que cette étude ait été basée sur des observations histologiques sur des tissus de fœtus et de nouveaux-nés, Aumüller et ses collègues ont tout récemment montré que très tôt dans la

différenciation, les cellules d'origine neurale responsables de la présence de cellules NE sont impossibles à distinguer du sinus urogénital donnant naissance aux cellules sécrétrices (Aumüller *et al.*, 2001). Cependant, étant donné que plusieurs de ces cellules expriment de l'APS (Aprikian *et al.*, 1993; Bonkhoff *et al.*, 1994), un produit vraisemblablement d'origine prostatique, l'origine neurale des cellules NE demeure questionnable. De plus, des cytokératines spécifiques aux cellules basales ont été retrouvées dans les cellules NE (Aprikian *et al.*, 1993), appuyant leur différenciation à partir des cellules souches prostatiques. Enfin, il a récemment été démontré que les cellules NE peuvent être détectées dans la prostate humaine dès la 13^e semaine de gestation (Xue *et al.*, 2000). Les cellules NE n'ont pas d'index de prolifération (Bonkhoff, 1998) et elles sont habituellement situées près de cellules épithéliales ayant un index de prolifération élevé et ce, dans la prostate normale, hyperplasique et cancéreuse (Bonkhoff *et al.*, 1991).

Il est possible de distinguer deux types de cellules NE prostatiques: le type ouvert et le type fermé, selon qu'elles touchent la lumière des acinis, ou qu'elles demeurent circonscrites par d'autres cellules (Di Sant'Agnese *et al.*, 1985). Les extensions de type dendritique s'intercalant entre les autres cellules sont plutôt retrouvées dans les cellules NE de type fermé (Di Sant'Agnese *et al.*, 1985). Il semble que le nombre de cellules NE augmente avec la progression du cancer (Cohen *et al.*, 1991; Weinstein *et al.*, 1996; Theodorescu *et al.*, 1997; Krijnen *et al.*, 1997). Plus de 70% des tumeurs prostatiques contiennent des cellules NE (Chevalier *et al.*, 1996). Elles seraient donc un indice d'un mauvais pronostic. Cependant, cette interprétation varie selon les études, notamment en raison de l'ampleur de l'échantillonnage. Le phénotype extrême est un cancer formé presque entièrement de cellules NE, nommé à petites cellules ou carcinoïde, dont la progression est extrêmement rapide (Tetu *et al.*, 1987). Il survient à un âge précoce et compte pour environ 10% des cas de CaP (Tetu *et al.*, 1987).

1.3. Pathologies prolifératives

Il est paradoxal que les pathologies prolifératives de la prostate, soient l'hyperplasie bénigne et le cancer, surviennent alors que le taux d'androgènes circulants est à la baisse. L'hypothèse de Davies et Eaton (1991) veut que le développement de ces pathologies mette en cause des cellules de phénotype différent quant à leur dépendance aux androgènes. Selon cette hypothèse, il existerait quatre types de dépendance: des cellules qui ont absolument besoin des androgènes; des cellules qui survivent en l'absence d'androgènes mais qui prolifèrent plus rapidement en leur présence; des cellules qui dépendent indirectement des androgènes dans le sens où elles requièrent des facteurs produits de façon paracrine par des cellules androgéno-dépendantes; et finalement, des cellules totalement indépendantes des androgènes.

1.3.1. Hyperplasie bénigne prostatique

L'hyperplasie bénigne prostatique (HBP) est la pathologie de la prostate qui touche le plus grand nombre d'hommes à travers le monde. En Amérique du Nord, il est estimé que jusqu'à 80% des hommes en seront affecté au cours de leur vie, la probabilité de développer l'HBP augmentant avec l'âge. D'un point de vue histologique, le tissu hyperplasique est nodulaire et composé de proportion variée d'épithélium, de stroma et de muscle lisse (Sagalowsky et Wilson, 1998). Le tissu hyperplasique comprime et obstrue l'urètre, d'où la nécessité d'interventions médicales. L'HBP n'est pas reliée au CaP bien que dans la plupart des cas, le cancer se développe dans une prostate déjà hyperplasique (Lalani *et al.*, 1997). L'HBP se développe dans la zone de transition de la prostate (Kamoi et Babaian, 1999). Les causes exactes du développement de l'HBP ne sont pas encore connues, mais la présence des testicules et le vieillissement sont essentiels (Sagalowsky et Wilson, 1998).

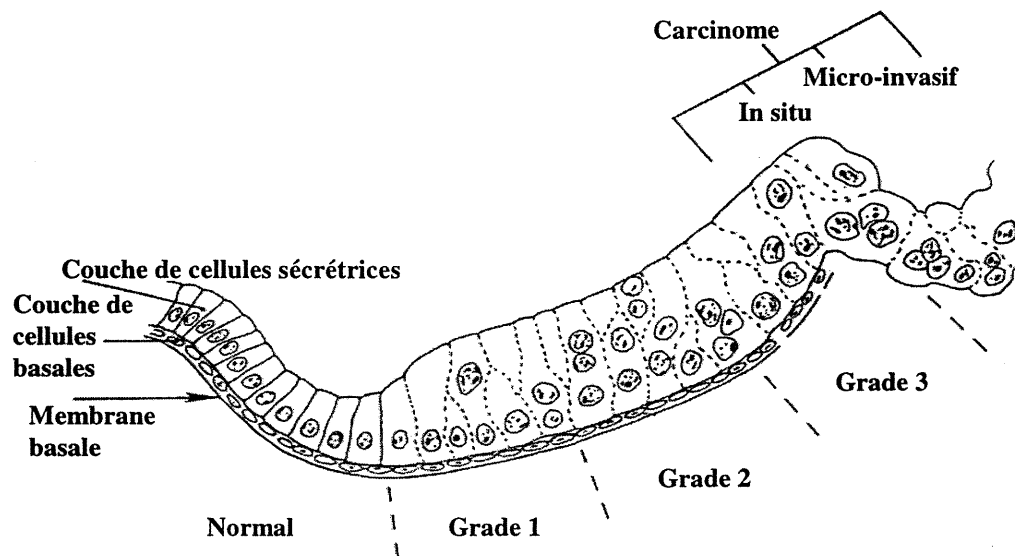


Figure 4 Changements histologiques de la prostate humaine survenant avec le développement et la progression du cancer

Représentation des changements phénotypiques associés avec le développement du cancer de la prostate. La membrane basale est interrompue puis inexistante, la distribution des cellules sécrétrices est perturbée, les cellules cancéreuses deviennent des cellules hybrides et l'organisation de la structure en acinis est perdue. Tiré de: Oesterling *et al.* (1997).

1.3.2. Néoplasie prostatique intraépithéliale (PIN)

On peut distinguer deux types de lésions pré-cancéreuses (PIN): de grade bas ou de grade élevé (Bostwick et Brawer, 1987). Cette néoplasie est caractérisée par une prolifération accrue des cellules épithéliales et une discontinuité de la couche de cellules basales (immunoréactivité des cytokératines de poids moléculaire élevé), permettant ainsi de distinguer PIN et cancer (Foster et Ke, 1997). Des cas de PIN de grade élevé ont aussi été rapportés dans la prostate canine (Waters et Bostwick, 1997a, 1997b).

1.3.3. Cancer

Le cancer de la prostate (CaP) est caractérisé par une croissance incontrôlée des cellules épithéliales transformées par rapport au stroma (figure 4). En fait, il s'agit d'un déséquilibre de la balance entre apoptose (mort cellulaire programmée) et prolifération, résultant soit d'une augmentation de la prolifération ou encore d'une diminution du taux d'apoptose. Selon les méthodes actuelles de détection des cytokératines spécifiques aux cellules basales, la disparition de la couche de cellules basales est typique du cancer. Cependant, certains auteurs pensent que les cellules basales ne disparaissent pas, mais perdent plutôt l'expression de certains marqueurs spécifiques, telles les cytokératines (Xue *et al.*, 1998). Une hypothèse qui gagne de plus en plus de terrain veut que les cellules cancéreuses soient en fait des cellules hybrides qui possèdent à la fois des caractéristiques des cellules basales et des cellules sécrétrices (Chevalier *et al.*, 1996; Bonkhoff et Remberger, 1996; Xue *et al.*, 1998). En ce sens, il est possible de distinguer morphologiquement des CaP bien différenciés, moyennement différenciés et peu différenciés (figure 4). Ces derniers sont généralement les plus agressifs, ayant perdu la structure d'une prostate normale. Ils sont plutôt caractérisés par un amoncellement désordonné de cellules cancéreuses, sans vraiment former d'acini. La forme la plus agressive du CaP est nommée à petites cellules et est identifiable par le nombre extrêmement élevé de cellules NE (Tetu *et al.*, 1987). Le CaP peut aussi être localisé ou avancé et est ainsi distingué par les cellules qui ont ou non migré hors de la prostate. L'examen histopathologique des biopsies indique l'état

du cancer. De nombreuses protéines ainsi que de nombreux gènes voient leur expression augmentée ou diminuée avec la progression du cancer (voir différentes sections plus loin dans le texte).

1.3.3.1. Incidence et causes

Le CaP occupe maintenant le premier rang quant au nombre de nouveaux cas de cancer identifiés et le second rang en ce qui a trait aux décès dus au cancer. Pour l'année 1999, au Canada seulement, il était estimé que le quart des nouveaux cas de cancers qui seront diagnostiqués chez l'homme, soit 16 600 sur 66 500, seront des CaP (Société Canadienne du Cancer). Il était aussi prévu qu'environ un homme sur huit (4 100 sur 33 600), parmi ceux atteints du cancer, décèdera des suites d'un CaP (Société Canadienne du Cancer). De plus, à l'autopsie, 30% des hommes âgés de plus de 50 ans décédés de causes autres que le CaP, ont des foyers de CaP latents, et cette proportion peut atteindre 80% lorsque ceux-ci sont âgés de plus de 80 ans (Ruijter *et al.*, 1999). Au cours de deux années consécutives (1996 et 1997), la mortalité causée par le CaP a diminué de 23% (Meyer *et al.*, 1999a). Ce déclin ne fait pas suite à une baisse de l'incidence, mais s'explique probablement par une meilleure intervention au niveau des traitements ou encore par des interventions à un stade précoce.

Bien que les causes de la plupart des cancers soient encore inconnues, il est possible de distinguer certains facteurs influençant le développement du cancer de la prostate. Il existe trois facteurs de risques majeurs: l'âge, la race (causes génétiques) et la situation géographique (causes environnementales et nutritionnelles). Les niveaux sériques de testostérone et de prolactine pourraient aussi affecter le risque de développer un CaP (Carter *et al.*, 1990).

Âge

L'âge est le facteur de risque le plus important (Oesterling *et al.*, 1997). Les hommes dans la trentaine et la quarantaine ont une incidence élevée de PIN ou de petits foyers de cancer, alors que les hommes plus âgés ont des lésions plus

importantes, ce qui implique une progression graduelle avec le vieillissement (Oesterling *et al.*, 1997). En fait, il est estimé que plus de 80% des cas de CaP sont retrouvés chez des hommes âgés de plus de 65 ans (Schwartz et Hulka, 1990). Tous les cancers ne progressent pas vers un stade clinique et plusieurs hommes âgés meurent en ayant un CaP et non pas du CaP (Oesterling *et al.*, 1997).

Causes génétiques

Les cas de CaP familial sont assez fréquents. Il est estimé que si un homme développe un CaP, son frère (ou son fils) a entre 1,5 à 2,0 fois plus de probabilité de développer un CaP (Ekman *et al.*, 1997). Cependant, aussi peu que 9% des CaP sont d'origine héréditaire (Ekman *et al.*, 1997) et suivent le patron établi par Mendel.

Le CaP se développe selon un long processus comprenant plusieurs étapes, impliquant des gènes contrôlant le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la réparation de l'ADN, la protéolyse, l'adhésion cellulaire et la motilité (Lalani *et al.*, 1997). Ces différents gènes sont souvent des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Il en sera question dans la section 3. En somme, la formation d'une tumeur prostatique et sa dissémination dans l'organisme (métastases) font probablement suite à une accumulation d'altérations génétiques spécifiques et consécutives qui s'accumulent au fil des années, mais qui sont encore peu connues et caractérisées (Lalani *et al.*, 1997).

La race peut aussi être classée comme un facteur génétique. Certains groupes tentent d'identifier un gène responsable de l'aspect héréditaire du CaP. C'est le cas des locus HPC1 et 2, situés respectivement sur le chromosome 1 (Smith *et al.*, 1996; Cooney *et al.*, 1997; Gronberg *et al.*, 1997) et sur le chromosome X (Xu *et al.*, 1998b). Cependant, ces sites sont similaires chez les Afro-Américains et les Caucasiens-Américains (Cooney, 1998), suggérant que d'autres facteurs seraient en cause pour expliquer la différence d'incidence raciale. Il a été démontré que des Afro-Américains et des Américains caucasiens vivant dans une même ville

(sans aucun apport environnemental) possèdent des incidences différentes du CaP, l'incidence des Afro-Américains étant la plus élevée (Wu *et al.*, 1998). Ces différences pourraient s'expliquer en partie par des différences au niveau de la biosynthèse et du métabolisme des androgènes (Fleshner et Klotz, 1999). Par exemple, les Afro-Américains ont des taux de testostérone sérique plus élevés que les blancs américains (Ross *et al.*, 1998). De même, une étude précédente a montré que les niveaux sanguins de testostérone sont plus élevés chez les Afro-Américains que chez les Américains Caucasiens (Ross *et al.*, 1986). Il a aussi été rapporté que l'activité de la 5 α -réductase, l'enzyme qui convertit la testostérone en DHT était plus faible chez les Japonais et, de façon concomitante, que le ratio de DHT par rapport à la testostérone était plus élevé chez les Afro-Américains que chez les Japonais (Ross *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1995). Un autre exemple de différences raciales concerne les Asiatiques et les Américains. Très peu d'Asiatiques vivant toujours en Asie semblent affectés par un CaP clinique (Ruijter *et al.*, 1999). Cependant, la prévalence d'un CaP latent est la même chez les Américains que chez les Japonais (Takahashi *et al.*, 1995).

Causes environnementales et nutritionnelles

Des facteurs environnementaux et/ou nutritionnels ont été invoqués pour expliquer les différences d'incidence du CaP. En effet, comment expliquer le fait que les Asiatiques qui immigreront en Amérique du Nord voient leur incidence du CaP augmenter et rejoindre celle qui prévaut dans ce pays, sinon par des facteurs liés à l'environnement (Haenszel et Kurihara, 1968). De même, les hommes des pays Scandinaves ont un taux de mortalité dû au CaP plus élevé que celui des autres Européens tandis que les Africains et les Sud-Américains ont un taux de mortalité dû au CaP qui est assez faible (Hanchette et Schwartz, 1992). De tels changements d'incidence avec l'immigration suggèrent que la diète et les habitudes de vie plutôt que la race soient des facteurs de risque. Ainsi, chez les Asiatiques, le soya, qui occupe une grande partie de l'alimentation quotidienne, aurait un effet bénéfique en raison des isoflavones qui y sont abondantes, parmi lesquelles se retrouve la génistéine, un inhibiteur des tyrosine kinases (TK)

(Akiyama *et al.*, 1987). Plusieurs essais cliniques tentent de vérifier l'effet d'une diète riche en soya sur le développement du cancer en général. En fait, à l'autopsie, les Japonais présentent, dans les mêmes proportions que les Occidentaux (soit 30% à 80% des cas, selon l'âge), un CaP latent, mais qui ne s'est pas manifesté cliniquement (Takahashi *et al.*, 1995). D'autre part, une proportion importante d'Asiatiques vivant en Amérique du Nord conserve leurs habitudes alimentaires mais développe un CaP. Il est possible que le soya, et la génistéine qu'il contient, ne puisse vraisemblablement pas empêcher l'apparition du cancer, mais sert plutôt à freiner son développement (Fair *et al.*, 1997). La diète des Asiatiques vivant dans les pays occidentaux serait aussi changée par rapport à leur consommation d'huile provenant des poissons, qui est une source riche en vitamine D (Schwartz et Hulka, 1990), expliquant possiblement l'augmentation de l'incidence du CaP chez les immigrants.

Depuis quelques années, l'aspect nutritionnel est devenu une préoccupation des chercheurs oeuvrant dans le domaine du CaP. Les facteurs nutritifs semblent reliés au développement de 30 à 50% de tous les cancers humains (Fair *et al.*, 1997). Parmi les catégories d'aliments étudiés, notons l'apport des lipides, des vitamines (D et E) et du carotène.

La consommation accrue de lipides chez l'homme est reliée à une augmentation du risque de CaP (Fleshner et Klotz, 1999). De plus, des études chez des souris athymiques porteuses de xénogreffe de cellules LNCaP ont montré qu'en réduisant la quantité de gras dans leur diète, il y avait une diminution parallèle de la croissance des tumeurs (Wang *et al.*, 1995).

Les niveaux d'androgènes peuvent être augmentés par une diète riche en gras (Fleshner et Klotz, 1999). Le stress oxydatif, qui résulte de cette augmentation, peut causer des dommages à l'ADN dans certains tissus, dont la prostate (Fleshner et Klotz, 1999).

Les agents antioxydants retrouvés dans la diète ou consommés en tant que supplément alimentaire prennent alors toute une importance. C'est le cas de la vitamine E, du sélénium et du lycopène, un carotène. La vitamine E est le principal antioxydant dans la membrane cellulaire. Il a été démontré qu'en donnant des suppléments de vitamine E aux souris athymiques porteuses de xénogreffes de LNCaP et recevant une diète riche en gras, il y avait une inhibition de la progression des tumeurs (Fleshner *et al.*, 1999). De plus, il semble que la vitamine E soit capable d'empêcher la prolifération *in vitro* de diverses lignées cellulaires de CaP, induisant même leur apoptose (Fleshner et Klotz, 1999).

La prise à long terme de sélénium agirait pour prévenir la progression du CaP. En effet, des niveaux élevés de sélénium sont associés à un risque réduit de CaP avancé (Yoshizawa *et al.*, 1998). Le sélénium contrôle l'activité enzymatique de la glutathione peroxydase, une enzyme qui protège les cellules du stress oxydatif (El-Bayoumy, 1991).

Le lycopène est un carotène qui est retrouvé dans certains fruits, dont principalement la tomate. Différentes études ont montré que les niveaux sériques et tissulaires (prostate) de lycopène sont peu élevés chez les hommes ayant un CaP avancé (Fleshner et Klotz, 1999), suggérant un rôle protecteur du lycopène dans la progression du CaP.

Une étude épidémiologique datant de 1990 a établi une corrélation inverse et statistiquement significative entre l'exposition aux rayons UV et la mortalité causée par le CaP (Schwartz et Hulka, 1990). Ceci peut paraître paradoxal étant donné que les Noirs ont un taux élevé de CaP, mais ils ont aussi un taux très faible de vitamine D puisqu'une grande quantité de mélanine réduit l'efficacité de la synthèse de la pré-vitamine D₃ (Clemens *et al.*, 1982; Matusoka *et al.*, 1991). Subséquemment, des données géographiques sont venues corroborer les premiers résultats, indiquant qu'une forte radiation d'UV protégeait d'un CaP cliniquement détectable (Hanchette et Schwartz, 1992). De plus, les personnes âgées s'exposent

moins aux rayons UV, ont généralement des taux de vitamine D plus faibles que les jeunes et leur capacité à synthétiser la pré-vitamine D chute alors que l'incidence du CaP augmente (Blutt et Weigel, 1999).

Le polymorphisme du récepteur de la vitamine D est aussi associé à un risque plus élevé de CaP (Miller, 1999). *In vitro*, la vitamine D cause un arrêt de la prolifération de différentes lignées de CaP humain et induit la sécrétion de l'APS, marqueur de différenciation (Miller *et al.*, 1995).

1.3.3.2. Dépistage

Le dépistage précoce permet actuellement de traiter le cancer alors qu'il est encore localisé, augmentant considérablement les chances de survie des hommes qui en sont atteints. Malheureusement, le CaP est souvent détecté alors que les cellules tumorales ont déjà envahi et traversé la capsule prostatique. Il est alors impossible de les traiter de façon efficace. Le dépistage précoce du CaP est controversé. En effet, le dépistage précoce a conduit à une forte augmentation de l'incidence du CaP puisque des foyers latents, qui ne se développeront peut-être pas, sont détectés. Le dépistage précoce amène aussi une augmentation non-négligeable des frais de santé et soins occasionnés pour le dépistage et le traitement des cas ainsi détectés. Parmi les différentes méthodes qui sont présentement utilisées, notons le toucher rectal, la mesure sérique de l'APS et les biopsies. Dans une étude comparative de la chromogranine A, la PTHrP et des produits liés à la calcitonine (CGP) mesurés dans les sérums et dans les tissus prostatiques de patients, il s'est avéré que ces trois marqueurs pourraient servir d'outils de diagnostic et de pronostic pour le CaP (Deftos, 1998). Les techniques actuelles de dépistage ne permettent pas de distinguer un cancer qui demeurera latent d'un cancer qui progressera. Il est donc impératif de découvrir de nouveaux marqueurs qui permettront de faire une telle distinction.

Toucher rectal

Le toucher rectal permet de palper la prostate afin de déceler la présence de masses anormales en évaluant la texture de la surface prostatique. Utilisée seule, cette méthode est cependant peu efficace (51% de positifs) pour détecter le CaP de façon précoce. Combiné à la mesure du taux sérique d'APS, le toucher rectal permet de détecter environ 75% des cancers (Kamoi et Babaian, 1999).

Antigène prostatique spécifique

L'APS est une glycoprotéine sécrétée dans la lumière des acinis par les cellules sécrétrices. Il est aussi possible de le détecter dans le sang par dosage radioimmunologique (RIA). Cette mesure sert alors au dépistage précoce du CaP, une augmentation de l'APS étant parallèle à la progression du cancer (Papsidero *et al.*, 1980). L'APS est présent sous deux formes, libre ou lié à la macroglobuline α_2 ou à l'anti-chymotrypsine α_1 (Lilja, 1993). En général, les tests RIA détectent la forme liée, celle-ci représentant la plus grande proportion. La concentration d'APS sérique qui sert d'indice de pathologie possible de la prostate est de 4 ng/mL (Osterling *et al.*, 1997). Plus le taux d'APS est élevé, plus la probabilité d'un CaP est augmentée. Selon la société Américaine du cancer, des valeurs au-dessus de 10 ng/mL sont considérées comme étant élevées, alors que des valeurs se situant entre 4 et 10 ng/mL sont considérées comme limites ou nécessitant une investigation plus poussée. Le volume de la tumeur, le volume de la prostate occupé par l'HBP, ainsi que la différenciation histologique de la tumeur peuvent affecter le taux d'APS chez les hommes atteints d'un CaP (Osterling *et al.*, 1997). De nombreux facteurs provoquent aussi une augmentation passagère du taux d'APS sérique (tels l'exercice, la prostatite et le massage prostatique) (Oesterling *et al.*, 1997). Il faut noter que des taux d'APS normaux sont retrouvés chez environ le tiers des hommes atteints d'un CaP localisé et que plusieurs hommes atteints de pathologies non-cancéreuses (telle l'HBP) présentent des taux d'APS élevés (Osterling *et al.*, 1997). Afin de palier à ces problèmes, d'autres paramètres ont été ajoutés à la valeur de l'APS sérique, tels le ratio d'APS libre comparativement au lié, l'âge, le volume de la prostate et la densité d'APS (Kamoi

et Babaian, 1999). Cependant, l'apport positif de ces nouvelles méthodes n'est pas encore démontré. Ainsi, la détermination du taux d'APS sérique (des valeurs entre 4 et 10 ng/mL) combinée au toucher rectal, devient un outil de diagnostic fiable permettant, tel que mentionné précédemment, de dépister près de 75% des cas de CaP (Kamoi et Babaian, 1999).

Chez les patients traités, l'APS est très utile pour suivre l'évolution de la réponse des cellules tumorales en cours de traitement dont l'efficacité est usuellement reflétée par un taux d'APS sérique nul. À ce moment-ci, des valeurs en-dessous de 4 ng/mL deviennent significatives puisque des valeurs consécutives variant de 0,1 à 1 ng/mL laissent souvent présager une rechute. Toutefois, l'APS ne peut servir à évaluer le potentiel des tumeurs à former des métastases, ni leur état de différenciation (Banyard et Zetter, 1999).

Un antigène membranaire prostatique spécifique (PSMA) a été identifié dans les membranes de cellules de la lignée prostatique cancéreuse humaine LNCaP, sous la forme d'une glycoprotéine de 100 kDa (Israeli *et al.*, 1993, 1994). Cette glycoprotéine a une activité folate hydroxylase et est produite par l'épithélium prostatique (Silver *et al.*, 1997). Les niveaux de PSMA dans la prostate semblent diminuer avec la progression du cancer (Silver *et al.*, 1997) alors que son niveau sérique augmente. Le PSMA pourrait donc servir de marqueur de progression du CaP (Murphy *et al.*, 1998).

Biopsies

Le soupçon d'un CaP est confirmé par des biopsies, dans la région périphérique postérieure de la prostate, qui sont réalisées en parallèle avec une ultrasonographie transrectale. En prélevant des biopsies, il devient possible de poser un diagnostic à la suite d'un examen histopathologique. Le pathologiste précise alors le grade, ou la morphologie, selon le score de Gleason qui se base sur deux critères (l'aspect glandulaire et le degré de différenciation) évalués chacun de 1 à 5, puis additionnés afin de donner un score final qui se situe entre 6 et 10, ce

dernier étant de type le plus avancé. Le stade du cancer (pénétration capsulaire, présence de métastases dans les ganglions lymphatiques et implication des vésicules séminales) est déterminé lors de la prostatectomie. D'autres tests sont requis pour la localisation de métastases à distance.

1.3.3.3. Évolution

En plus de la dépendance et l'indépendance aux hormones, l'évolution du CaP est caractérisée par l'apparition de métastases.

Hormono-dépendance et hormono-indépendance

La progression du CaP vers l'hormono-indépendance est encore mal comprise. Chez certains patients, le CaP se présente déjà sous sa forme hormono-indépendante au moment du diagnostic. Chez la majorité des patients, le CaP est détecté alors qu'il est hormono-dépendant. Dès le début des années 1940, Huggins et Hodges ont été des pionniers de la notion d'hormono-dépendance (Huggins et Hodges, 1941). Ils ont démontré, en plus du rôle essentiel des androgènes dans le maintien de la fonction sécrétrice de la prostate, l'effet bénéfique de la castration sur des sujets ayant une prostate cancéreuse. Soixante ans plus tard, la castration (chimique ou chirurgicale) demeure un traitement de choix.

Les causes exactes de la progression d'un CaP hormono-dépendant vers l'hormono-indépendance ne sont pas encore connues. Les recherches n'en sont encore qu'à la consolidation d'hypothèses.

Des recherches ont démontré que lors de la castration, toutes les cellules cancéreuses qui dépendent des androgènes meurent par apoptose, laissant ainsi la place aux cellules transformées (basales et NE) androgéno-indépendantes, qui peuvent alors proliférer librement (Bui et Reiter, 1999). D'autres chercheurs proposent que ce sont plutôt des cellules sécrétrices différenciées de façon non terminale, et qui ont gardé une certaine capacité de proliférer, qui sont responsables de la progression hormono-indépendante du CaP (De Marzo *et al.*,

1998). Enfin, Bonkhoff a proposé que les cellules cancéreuses soient en fait de type intermédiaire (Bonkhoff, 1998). Cette proposition est reprise par quelques autres groupes qui démontrent que les cellules cancéreuses possèdent en fait des caractéristiques propres aux cellules basales et aux cellules sécrétrices (Chevalier *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1996a et 1996b; Foster et Ke, 1997; Xue *et al.*, 1998; Bui et Reiter, 1999).

D'autres hypothèses veulent que des changements surviennent au niveau du récepteur des androgènes ou de son signal lors de la progression vers l'hormono-indépendance (Klocker *et al.*, 1998). Plutôt qu'une perte d'expression du récepteur des androgènes, des mutations surviendraient au niveau du domaine de liaison du ligand (Klocker *et al.*, 1998). Des mutations au niveau du récepteur des androgènes ont été retrouvées dans 44% des tumeurs androgéno-indépendantes (Tilley *et al.*, 1996). Ces mutations, dont la présence a déjà été démontrée dans la lignée LNCaP, modifient surtout la liaison du ligand et rendent le récepteur sensible à d'autres hormones non androgéniques (Veldsholte *et al.*, 1990). Au niveau de sa signalisation, d'autres voies de signalisation peuvent interagir avec celle du récepteur des androgènes. Par exemple, il a été démontré que l'interleukine-6, *via* la voie des protéines kinases A et C, pouvait agir en synergie avec de faibles quantités d'androgènes afin de stimuler le signal émis par le récepteur des androgènes (Hobisch *et al.*, 1998). Dans le même ordre d'idée, certains facteurs de croissance, tels l'IGF-1, le KGF et l'EGF, peuvent, en l'absence d'androgènes, activer le récepteur des androgènes dans les lignées cellulaires DU-145 (transfection du gène du récepteur) et LNCaP (expression endogène du récepteur) (Culig *et al.*, 1994).

Enfin, une autre hypothèse veut que la progression vers l'hormono-indépendance résulte de la surexpression de gènes contrôlant la prolifération des cellules ou l'inhibition de leur mort cellulaire programmée. Il est alors possible de parler d'un déséquilibre entre les taux de prolifération et de mort cellulaire, normalement en équilibre, penchant vers une prolifération accrue et une

diminution du taux d'apoptose et menant à la progression vers l'hormono-indépendance (Koivisto *et al.*, 1997a). En ce sens, la présence de divers récepteurs de facteurs de croissance (FC) a été rapportée dans les cellules épithéliales prostatiques normales, hyperplasiques ou cancéreuses (McKeehan, 1991; Ware, 1993; Story, 1994; Steiner, 1995; Chevalier *et al.*, 1996; Culig *et al.*, 1996). Ces données viennent appuyer les résultats démontrant une présence augmentée de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, dans les cellules tumorales de la prostate et son association avec l'émergence de l'androgéno-indépendance (McDonnell *et al.*, 1992; Colombel *et al.*, 1993). Le rôle de Bcl-2 sera plus amplement décrit dans la section 3.2.

La disparition ou l'augmentation de l'expression de certains gènes peut aussi contribuer à l'hormono-indépendance ou à la progression vers l'hormono-indépendance. Lors d'une étude visant à comparer l'expression des gènes dans les cellules LNCaP (lignée cancéreuse prostatique humaine, sensible aux androgènes) parentales et des LNCaP rendues insensibles aux androgènes, Stubbs et ses collègues ont identifié trois gènes dont l'expression est diminuée dans les LNCaP insensibles aux androgènes: un variant inactif de l'ubiquitine E2, une nouvelle métalloprotéinase, PM5, et un gène suppresseur de tumeur, BBC1, initialement identifié dans le cancer du sein (Stubbs *et al.*, 1999).

La perte d'expression de l'endopeptidase neutre 24.11, une enzyme qui inactive une variété de peptides en les clivant, serait induite par la diminution des androgènes, ce qui permettrait alors aux différents peptides d'agir sur les cellules cancéreuses, favorisant la progression du CaP (Papandreou *et al.*, 1998).

La télomérase confère l'immortalité des cellules en empêchant le raccourcissement des chromosomes par leurs extrémités, les télomères, et prévient ainsi la perte de matériel génétique (Morin, 1989; Zakian, 1989). La télomérase n'est pas active dans la prostate normale mais elle est surexprimée dans 89% des

tumeurs prostatiques (Sommerfeld *et al.*, 1996). La détection de l'activité de la télomérase pourrait servir de marqueur du CaP (Scates *et al.*, 1997).

Une autre protéine qui pourrait potentiellement servir de marqueur de la progression du cancer vers l'hormono-indépendance est l'antigène des cellules souches prostatiques (PSCA). Cet antigène est présent dans les cellules basales de la prostate normale et son transcrite (ARNm) est exprimé dans les cellules cancéreuses. Cela ajoute du poids à l'hypothèse voulant que le cancer survienne à la suite de la transformation des cellules basales (Chevalier *et al.*, 1996; Bui et Reiter, 1999). De plus, le gène codant pour le PSCA est situé sur le chromosome 8 (Reiter *et al.*, 1998), dans une région qui est souvent amplifiée dans le CaP (Isaacs *et al.*, 1994).

Formation de métastases

La formation de métastases est un processus complexe et plusieurs informations pertinentes seront décrites plus amplement à la section 3. De façon générale, des cellules cancéreuses s'échappent de la tumeur primaire, gagnent la circulation sanguine, adhèrent aux parois des vaisseaux sanguins, sortent des vaisseaux sanguins pour s'implanter dans un organe-cible, où elles adhèrent et croissent (Lange et Vessella, 1999). Dans le cas du cancer de la prostate, une des premières évidences de la présence possible de métastases chez les patients, est la rupture de la capsule prostatique, révélée lors de la prostatectomie radicale (voir section 1.3.3.4.). Dans un tel cas, il y a un risque que des cellules aient traversé cette capsule et se soient implantées dans la région péri-prostatique, notamment au niveau des ganglions lymphatiques situés aux abords de la prostate et des vésicules séminales. Toutefois, les os constituent le site préférentiel de métastases prostatiques (Lange et Vessella, 1999). À cet égard, il a été proposé que les tissus osseux sécrètent des agents qui attireraient les cellules prostatiques cancéreuses afin d'y favoriser leur implantation. Une autre hypothèse veut que le constant renouvellement des cellules osseuses crée des cavités dans la matrice osseuse qui permettraient l'ancrage des cellules prostatiques (Koutsilieris, 1993; Reyes-

Moreno et Koutsilieris, 1997; Lange et Vessella, 1999). Un tel renouvellement des cellules osseuses favoriserait la sécrétion importante de FC qui pourraient favoriser la prolifération des cellules prostatiques à l'intérieur de l'os. Les mécanismes responsables de cette sélectivité quant au site d'implantation des métastases aux os plutôt que dans d'autres organes (foie, poumon, *etc.*) sont encore peu élucidés, mais impliqueraient la participation de protéases de type sérine tels l'APS, la kallikréine hK2, et l'urokinase, de protéines de la matrice extracellulaire et leurs récepteurs, les intégrines (Lange et Vessella, 1999).

La mortalité due au CaP résulte souvent de la dissémination accrue des métastases osseuses et des phénomènes de cachexie qui y sont associés (Chou et Simons, 1997). Par ailleurs, il semble que la dissémination de cellules cancéreuses hétérogènes (c'est-à-dire qui expriment ou qui n'expriment pas l'APS) dans la moëlle osseuse soit un événement qui survient, chez une majorité des hommes, avant le diagnostic du CaP (Lange et Vessella, 1999). La dissémination de cellules prostatiques cancéreuses dans la moëlle osseuse pourrait être un facteur permettant de distinguer les patients qui développeront des métastases osseuses de ceux qui n'en développeront pas.

L'expression ou l'absence de certains gènes et protéines peut aussi contribuer au développement de métastases. À partir de travaux récents, il a été démontré que la cavéoline-1 est surexprimée dans les CaP présentant des métastases. Sa suppression rend de nouveau les cellules sensibles aux androgènes tandis que sa présence favorise la survie des cellules cancéreuses (Nasu *et al.*, 1998, Thompson, 1999; Thompsom *et al.*, 1999). La disparition de *KAI1*, un gène suppresseur de métastases, est associée à la progression du CaP. En réintroduisant ce gène dans les cellules tumorales prostatiques de rat, il y a disparition des métastases (Dong *et al.*, 1995). PTEN, une phosphatase, est aussi décrit comme un gène suppresseur de métastases, dont les altérations sont fréquentes dans le CaP (voir section 3.1.8.).

1.3.3.4. Traitements

À l'heure actuelle, les principaux types de traitements pour le cancer de la prostate sont la chirurgie, la radiothérapie et l'hormono-thérapie. La chimiothérapie est considérée comme palliative. Le choix entre la chirurgie et l'hormono-thérapie est dicté par le stade du cancer (classification TNM où T représente l'aspect de la tumeur, N l'atteinte des ganglions lymphatiques et M la présence de métastases), le grade (score de Gleason) et l'état de santé général du patient.

Chirurgical

Si le cancer est encore confiné à la glande, le traitement de choix est la prostatectomie radicale, qui consiste à enlever complètement la prostate. Par contre, à la suite de cette chirurgie, 50% des hommes seront temporairement incontinents et un même pourcentage seront impuissants (Sagalowsky et Wilson, 1998). De nouvelles procédures devraient permettre de réduire les pourcentages d'incontinence et d'impuissance. Le pourcentage d'échec dans le traitement du CaP, suite à une prostatectomie radicale, varie de 15 à 57%, sur une période de cinq ans, indiquant ainsi la présence non-soupçonnée de métastases (Lange et Vessella, 1999; Thompson, 1999). Si la capsule prostatique est atteinte ou si des évidences de dissémination péri-prostatique sont observées lors de la chirurgie, la radiothérapie est utilisée en complément à la chirurgie.

Hormonal

Si le cancer présente des signes d'invasion ou de métastases, la prostatectomie radicale n'est plus indiquée et le traitement appliqué consiste en un blocage complet des androgènes. Ce traitement bloque la production et l'action des androgènes et peut se faire de quatre façons différentes: 1- chirurgie (castration ou orchietomie, ablation des surrénales); 2- inhibition des gonadotropines synthétisées par l'hypothalamus; 3- inhibition de la synthèse d'androgènes par les testicules et les surrénales; 4- inhibition de la liaison des androgènes à leur récepteur (Sagalowsky et Wilson, 1998). La castration chirurgicale provoque une

diminution d'environ 90% du niveau de testostérone sanguine et est souvent couplée à un traitement visant à baisser davantage les niveaux sanguins de testostérone. La production de testostérone au niveau des cellules de Leydig est régulée par l'hormone lutéinisante (LH) produite au niveau de l'hypophyse. Des oestrogènes, notamment le diéthylstilbestrol ou DES, ont longtemps été utilisés afin d'enrayer la production d'androgènes. En effet, de fortes concentrations d'oestrogènes peuvent bloquer la relâche de la LH, provoquant ainsi une chute des niveaux sanguins de testostérone. Cependant, le fort taux de complications cardiovasculaires a contribué à la réduction de l'utilisation d'oestrogènes. Ceux-ci ont été remplacés par des analogues de la LHRH (hormone de relâche de l'hormone lutéinisante). Ces analogues, tel le Leuprolide, inhibent la sécrétion de LH et causent une diminution des niveaux sanguins de testostérone. Ces analogues, ainsi que les oestrogènes, ne peuvent toutefois prévenir l'apport des androgènes par les surrénales (Sagalowsky et Wilson, 1998). C'est pourquoi, en plus, l'action des androgènes est souvent bloquée par l'ablation des surrénales ou par un traitement médical. Ce traitement consiste à inhiber la synthèse des androgènes surrénaux (par des glucocorticoïdes exogènes) ou à empêcher les androgènes de se lier à leur récepteur (par des antiandrogènes tels le Flutamide, le Casodex ou le cyprotérone acétate).

Les diverses combinaisons de ces traitements permettent d'améliorer les conditions de vie des patients. Chez la majorité (60 à 80%) des patients, il y a une diminution notable du volume de la tumeur et de la glande ainsi qu'une baisse du taux d'APS sanguin. Ceci s'explique par l'apoptose des cellules qui dépendent des androgènes (Bui et Reiter, 1999). Malheureusement le bénéfice de ces traitements est souvent temporaire, car le cancer réapparaît inévitablement chez la presque totalité des patients, et cette fois, sous une forme androgéno-indépendante. Quoique variable, l'effet bénéfique du blocage des androgènes dure environ 20 mois, et à partir du moment où le cancer réapparaît, les patients décèdent dans les mois suivants (Oesterling *et al.*, 1997). Une thérapie anti-androgènes intermittente est aussi à l'étude, laissant les androgènes agir pendant quelques mois avant de les

inhiber de nouveau (Oesterling *et al.*, 1997). Ce traitement intermittent, développé au Canada (Goldenberg *et al.*, 1995), permet, lorsque les androgènes sont présents, à certaines cellules de se différencier et de ralentir leur taux de prolifération. Cette thérapie est basée sur le fait que les cancers bien différenciés sont beaucoup moins agressifs que les cancers peu différenciés. Dans un cancer avancé (hormono-indépendant), la chimiothérapie est utilisée, mais les résultats obtenus sont peu concluants.

2. Modèles d'études

Cette section, portant sur les différents modèles disponibles pour étudier les pathologies prolifératives prostatiques, sera divisée en deux parties: les modèles permettant des études *in vivo* et ceux utilisés *in vitro*. Le meilleur modèle *in vivo* demeure l'homme. Malheureusement, le peu de sensibilisation de la population à la recherche, la lourdeur administrative et l'éthique limitent souvent l'accès au matériel d'origine humaine (sang et prostates provenant d'autopsie ou de chirurgie).

2.1. In vivo

Différents modèles animaux existent pour combler plus ou moins efficacement l'étude *in vivo* du CaP. Cependant, aucun ne peut reproduire entièrement ce qui se passe chez l'homme.

2.1.1 Humain

Des spécimens d'autopsie et de chirurgie pour prostatectomie radicale ou résection transurétrale peuvent servir pour diverses études d'immunohistochimie, d'hybridation *in situ*, d'extraction des protéines ou des ARNm et de l'ADN, ou encore pour isoler les cellules par action enzymatique et les étudier en culture (*in vitro*). Différentes lignées cellulaires prostatiques humaines, formant des tumeurs chez la souris sous forme de xénogreffes sous-cutanées ou de métastases à divers sites, servent aussi de modèles *in vivo*. Ces lignées ont pour origine des métastases

prostatiques localisées dans les ganglions lymphatiques, le foie, la peau, les surrénales, le cerveau et les os et sont utiles afin d'étudier la régulation de leurs fonctions (prolifération et différenciation) par les androgènes, la progression du CaP et les essais pré-cliniques (Navone *et al.*, 1999).

2.1.2. Singe

Des cas d'HBP et de CaP ont été rapportés chez les singes depuis les années 1940. Cependant, il semble que ces cas sporadiques ne sont détectés qu'à l'autopsie (Waters *et al.*, 1998). Cette faible incidence, couplée au coût d'achat élevé et à la grande taille des singes, en font un modèle comportant des désavantages importants pour l'étude des pathologies prolifératives prostatiques.

2.1.3. Rongeurs

Les rongeurs, notamment la souris et le rat, malgré les différences considérables d'étiologie et d'histologie, demeurent les animaux privilégiés dans le cadre d'études sur la prostate. Contrairement à la prostate humaine qui est un organe unique, la prostate des rongeurs est formée de lobes: ventral, dorsal, latéral et antérieur, chacun ayant des caractéristiques qui lui sont propres (Bosland, 1992).

La souris peut servir à créer des modèles transgéniques. Les souris athymiques peuvent aussi être utilisées pour vérifier la capacité de différentes lignées cellulaires prostatiques humaines à former des tumeurs et/ou des métastases à la suite d'injections sous-cutanées ou orthotopiques (dans la prostate). De plus, ce modèle permet d'étudier la réponse des tumeurs à divers agents ou drogues. Un modèle de reconstitution de la prostate chez la souris a été développé à partir de tissu urogénital foetal (composé de mésenchyme et d'épithélium) qui se différencie pour former une prostate grâce à l'apport des oncogènes *ras* et *myc* (Thompson *et al.*, 1991; 1993). Dans ce système, lorsque *p53* est absent ou muté, tous les animaux développent des tumeurs et 95% d'entre eux forment des métastases (Thompson *et al.*, 1995).

Quant aux rats, seules certaines souches (ACI/Seg, Lobund-Wistar et Dunning) développent spontanément des tumeurs prostatiques (Lucia *et al.*, 1998). Il faut généralement des agents chimiques ou cancérigènes pour induire des tumeurs dans la prostate des autres modèles (Fischer F344, Noble et Wistar) (Lucia *et al.*, 1998). Certaines de ces tumeurs sont dès le départ androgéno-indépendantes ou le deviennent avec le temps (Dunning, Wistar, Lobund-Wistar). Aucun de ces modèles ne produit de métastases aux os, mais des métastases sont plutôt retrouvées au niveau pulmonaire ou dans la cavité péritonéale et les ganglions lymphatiques. Des cellules prostatiques cancéreuses de rat Dunning ont été isolées et mises en culture, donnant naissance à une panoplie de lignées cellulaires représentant à divers degrés une dépendance ou une indépendance aux androgènes. Généralement utilisée pour les études sur la prostate, la prostate ventrale de rat a néanmoins une faible homologie avec la prostate humaine, ce qui soulève des doutes quant à l'interprétation des résultats des études réalisées avec le rat comme modèle de la situation retrouvée chez l'humain (Bosland, 1992).

2.1.4. Chien

Le chien est un modèle utilisé depuis le tout début de la recherche sur l'HBP et le CaP. La différence majeure entre la prostate humaine et la prostate canine réside dans les proportions de stroma et de cellules épithéliales. En effet, la prostate canine contient beaucoup moins de stroma, et par le fait même, plus de cellules épithéliales que la prostate humaine. Tout comme la prostate humaine, la prostate canine devient hyperplasique avec l'âge (Huggins et Clark, 1940; Chevalier *et al.*, 1980; Juniewicz *et al.*, 1994). De même, des cas de PIN et de cancer ont été signalés chez le chien, indépendamment de l'espèce (Huggins et Hodges, 1941; Eaton et Pierrepoint, 1988; Waters et Bostwick, 1997a; 1997b). L'âge moyen des chiens lors du diagnostic du CaP est de 10 ans, correspondant à 67 ans chez l'homme, soit un âge voisin de l'âge moyen (70 ans) où se développe le CaP chez l'homme (Waters *et al.*, 1996). De plus, chez le chien, tout comme chez l'humain, les métastases prostatiques se retrouvent de façon préférentielle au niveau des os (Waters *et al.*, 1998). Les travaux de Huggins et de ses collègues

ont montré que chez le chien, et de manière analogue à l'humain, la castration chirurgicale provoque une atrophie de la prostate (Huggins et Clark, 1940; Huggins et Hodges, 1941). L'administration subséquente d'androgènes régénère l'épithélium différencié, tandis que les oestrogènes induisent une métaplasie des cellules épithéliales basales (Huggins et Clark, 1940; Merk *et al.*, 1986). Ceci se traduit par une prolifération accrue des cellules basales, contrairement à la prostate normale où il y a peu de prolifération cellulaire (Merk *et al.*, 1986; Barrack et Berry, 1987). Ce modèle *in vivo* est donc utilisé pour étudier l'effet des hormones sur la prostate ou encore l'effet de la chimiothérapie. Le laboratoire d'accueil a ainsi démontré que les protéines phosphorylées sur tyrosine sont principalement localisées dans les cellules basales et les niveaux de phosphorylation augmentent de pair avec la prolifération de ces cellules, notamment dans la prostate métaplasique. Viennent ensuite les cellules basales de la prostate de chien castré et supplémenté en androgènes, celles de la prostate hyperplasique et enfin celles de la prostate normale (Landry *et al.*, 1996). Lorsque les niveaux et l'activité de la kinase d'adhésion focale (Fak) sont comparés dans les différents types de prostate canine, la prostate métaplasique est celle qui mime le plus la situation retrouvée dans le cas des cancers avancés chez l'humain (Tremblay *et al.*, 1996a, 1996b). Il en est de même pour Fer (Allard *et al.*, 2000a), c-TAK1 (en préparation) et p110 (Allard *et al.*, 2000b). Ce qui valide l'hypothèse de la contribution des cellules basales à la progression du CaP humain et l'utilisation d'un tel modèle.

Une étude récente d'Angelsen et ses collègues, sur les cellules NE stipule que la prostate normale des chiens et des rongeurs ne possède pas de telles cellules, disqualifiant ainsi le modèle canin (Angelsen *et al.*, 1997). Or, en utilisant la sérotonine comme marqueur des cellules NE, il est possible de clairement démontrer que la prostate canine contient bel et bien des cellules NE (Ismail *et al.*, sous presse), qui sont par ailleurs aussi positives pour la chromogranine A (résultats non publiés). Le chien est considéré par certains comme étant le meilleur modèle disponible. Selon les conclusions d'un groupe de travail (Waters *et al.*, 1998) qui s'est penché sur les modèles de CaP chez les animaux, le chien

comporte de nombreuses autres similitudes au CaP humain: les facteurs environnementaux exercent une certaine influence sur l'incidence du CaP, à l'autopsie des changements comme le PIN ou le cancer sont fréquemment observés, le cancer est souvent de grade élevé (score de Gleason), et les chiens qui meurent du CaP présentent un cancer androgéno-indépendant. Les principaux désavantages sont les coûts élevés reliés à sa disponibilité et la variation génétique qui pourrait poser des problèmes de reproductibilité des résultats (Waters et Bostwick, 1997b).

2.2. In vitro

Les modèles *in vitro* sont très utilisés dans les études sur la régulation des fonctions des cellules épithéliales (prolifération, apoptose, différenciation, adhésion/motilité) par différents facteurs externes. Dans le cas du CaP, les systèmes couramment utilisés sont les lignées cancéreuses humaines (voir section 2.2.1.) et les lignées isolées de prostate de rat (voir section 2.2.2.). Le chien (voir section 2.2.3.) est aussi utilisé, notamment par le laboratoire d'accueil pour étudier les mécanismes d'adhésion et de prolifération des cellules basales normales. Quant au singe, une étude récente sur les cellules épithéliales isolées de prostate de singe Rhésus en culture primaire a démontré que la DHT seule ou avec les IGF-I et -II, augmentait la prolifération et l'activité sécrétrice de ces cellules lorsque cultivées sur du collagène ou de la laminine (Udayakumar *et al.*, 1999). Des cultures primaires de cellules épithéliales dérivées de prostates humaines ont aussi été établies, mais nécessitent l'ajout de plusieurs facteurs (Chapdelaine et Chevalier, 1985; Peehl, 1992), ce qui peut causer des réactions croisées ou de la synergie entre les facteurs testés et ceux déjà présents dans le milieu de culture. Les cultures primaires de cellules stromales isolées de prostates humaines hyperplasiques sont composées de cellules musculaires lisses et de fibroblastes et répondent à la DHT, au FGFb et au TGF- β (Kassen *et al.*, 1996). Cependant, puisque les cellules épithéliales sont impliquées dans la progression du CaP, le sujet des cellules stromales ne sera pas abordé davantage.

2.2.1. Lignées cancéreuses humaines

Différentes lignées prostatiques cancéreuses humaines ont été établies à partir de métastases d'un CaP qui se sont propagées dans divers organes. Les lignées les plus utilisées sont les PC-3 (Kaighn *et al.*, 1979), les DU145 (Stone *et al.*, 1978) et les LNCaP (Horoszewicz *et al.*, 1983). Elles sont dérivées de métastases aux os, au cerveau et aux ganglions lymphatiques, respectivement. Des sous-lignées ont été établies par divers laboratoires. À partir des PC-3 injectées dans la prostate, les PC-3M, qui forment plus de métastases ont été obtenues, puis les PC-3M-LN4 et PC-3M-Pro4 (Stephenson *et al.*, 1992; Pettaway *et al.*, 1996), isolées de clones dans les ganglions lymphatiques et dans la prostate, respectivement. Quant aux sous-lignées des LNCaP (C4 et C4-2), elles ont été obtenues suite à leur co-injection avec des fibroblastes osseux. Elles sont particulièrement utiles car leur degré de dépendance aux androgènes varie (dépendant à indépendant). Un avantage majeur de ces sous-lignées est leur parenté génétique avec la lignée dont elles sont issues (Wu *et al.*, 1994; Zhau *et al.*, 1994). Des cellules qui sont réprimées par les androgènes ont aussi été isolées de liquide d'ascite d'un patient porteur d'un CaP (Zhau *et al.*, 1996). Les TSU-Pr1 proviennent d'une métastase au niveau des ganglions lymphatiques cervicaux d'un Japonais (Iizumi *et al.*, 1987). Ces cellules sont androgéno-indépendantes et ne possèdent pas de récepteurs androgéniques (Iizumi *et al.*, 1987). Les principales caractéristiques de ces différentes lignées sont présentées dans le tableau 1. D'autres lignées sont connues mais peu utilisées, telles les ALVA 101, ainsi que celles développées par certains groupes comme celui du M.D. Anderson Cancer Center aux États-Unis (Webber *et al.*, 1997; Navone *et al.*, 1999).

Tableau 1 Caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques humaines

Nom	Origine	Expression APS	Récepteur androgènes	Réponse aux androgènes	Temps de doublement (h)	Tumorigéni- cité dans souris nue
LNCaP	ganglion	+	+	+	60-72	+/-
LNCaP-C4		+	+	+	?	+
LNCaP-C4-2		+	+	-	?	+
DU145	CSN	-	-	-	34	+
PC-3	vertèbre	-	-	-	32	+
PC-3M		-	-	-	?	+
PC-3M-Pro4		-	-	-	?	+
PC-3M-LN4		-	-	-	?	+
TSU-Pr1	ganglion	-	-	-	36	+

+: positif; -: négatif; +/-: résultats positifs et négatifs rapportés; ?: non déterminé; CSN: système nerveux central

Parmi ces lignées, les LNCaP représentent un CaP à un stade métastatique peu avancé. Elles ont conservé les propriétés de l'épithélium relativement différencié, elles ont un taux de prolifération assez lent, elles expriment l'APS et elles répondent aux androgènes. Les PC-3 représentent un CaP à un stade métastatique avancé peu différencié, proliférant rapidement et insensible aux androgènes (Lalani *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1999). Quant aux DU145, elles représentent un niveau intermédiaire entre les LNCaP et les PC-3. Les TSU-Pr1 sont encore plus agressives que les PC-3 (Iizumi *et al.*, 1987). Les PC-3M sont dérivées des PC-3 et forment plus de métastases lorsqu'elles sont injectées dans les souris nues. Les Pro4 et LN4 sont dérivées des PC-3M et les LN4 prolifèrent plus rapidement que les Pro4. Les LN4 représentent la forme la plus agressive présentement disponible.

2.2.2. Rongeurs

Il n'existe aucun modèle de CaP pour utilisation *in vitro* développé chez la souris. Seules quelques lignées proviennent du rat. La plus connue est dérivée d'une tumeur spontanée chez le rat, que Dunning (1963) a propagé et à partir de laquelle différentes sous-lignées (R-3327) ont été produites. La plus utilisée est la

lignée Dunning R-3327 MATLyLu qui forme des métastases aux ganglions lymphatiques et aux poumons (Isaacs, 1996). Ces sous-lignées diffèrent au niveau de leur histopathologie, de leur réponse aux androgènes, de leur taux de prolifération et de leur capacité à former des métastases. Cependant, elles présentent une certaine progression à l'intérieur de la série (au niveau de leur dépendance aux androgènes et de leur capacité à former des métastases). Ce modèle peut s'avérer très pratique s'il est utilisé dans son ensemble en comparant les réponses des sous-lignées entre elles (Navone *et al.*, 1999). L'origine prostatique de la lignée Dunning R-3327 MATLyLu est toutefois remise en question (Webber *et al.*, 1997). Des lignées épithéliales (NbE-1) et fibroblastiques (NbF-1 et PS-1) ont été établies à partir de la prostate ventrale de rats normaux et permettent d'étudier les interactions mésenchyme et épithélium de même que l'apport des androgènes dans ces interactions (Navone *et al.*, 1999).

2.2.3. Chien

De rares équipes utilisent la prostate canine comme modèle *in vitro*, principalement en culture primaire. Mis à part les résultats du laboratoire d'accueil, cette limite peut être levée par une lignée cellulaire établie à partir d'adénocarcinomes canins, CPA1 (Eaton et Pierrepoint, 1988) et DCP1 (Anidjar *et al.*, 2001), ainsi que par l'immortalisation des cellules épithéliales à l'aide de l'antigène du grand T du virus SV-40 (Lehr *et al.*, 1998). Les principales caractéristiques des cellules immortalisées par le virus SV-40, sont un temps de doublement rapide, leur androgéno-indépendance, l'expression de cytokératines spécifiques aux cellules épithéliales basales et l'expression de la PAP (un marqueur de différenciation). Finalement, ces cellules ne forment pas de colonies en agar mou ni de tumeurs ou de métastases chez la souris nue ou immunodéficiente. Quant aux cellules isolées d'adénocarcinomes prostatiques canins peu différenciés, il a été démontré que ces cellules ont aussi un temps de doublement rapide, qu'elles prolifèrent de façon androgéno-indépendante et enfin qu'elles sont fortement tumorigéniques, chez les souris nues (Eaton et Pierrepoint, 1988; Anidjar *et al.*, 2001) et chez le chien immunodéficient (Anidjar *et al.*, 2001).

Les résultats du laboratoire d'accueil sur la prostate canine montrent que seules les cellules basales prolifèrent en culture primaire (Chevalier *et al.*, 1980; 1981) et elles sont hormono-indépendantes (Chevalier *et al.*, 1984) même si elles expriment le récepteur des androgènes (Turcotte *et al.*, 1988). De plus, ces cellules requièrent la vitronectine contenue dans le sérum de veau foetal dialysé afin d'adhérer au substratum de polystyrène (Chevalier et Chapdelaine, 1988; 1991). Elles prolifèrent activement en réponse à un FC de nature peptidique contenu dans les sérums canin et humain (Chapdelaine et Chevalier, 1985; Chevalier *et al.*, 1991; 1993). Ainsi, ce modèle s'apparente aux cellules prostatiques cancéreuses humaines à un stade avancé: androgéno-indépendance et dépendance aux FC. Ce modèle a été utilisé pour caractériser l'activité kinasique (Tessier *et al.*, 1989*b*; Bourassa *et al.*, 1991*a*; 1991*b*; Nguyen *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1996*a*; Allard *et al.*, 1997; 2000*a*; Chevalier *et al.*, sous presse), les phosphatases (PAP et PTP) (Tessier *et al.*, 1989*a*; Nguyen *et al.*, 1990; Boissonneault *et al.*, 1995), la liaison des androgènes (Turcotte *et al.*, 1988) et la production de matrice extracellulaire (Chevalier et Chapdelaine, 1988; 1991; Tremblay *et al.*, 1996*a*), toutes associées à la prolifération et la différenciation des cellules prostatiques.

Les sections précédentes ont dressé un portrait d'ensemble des principales connaissances de base, quoiqu'encore incomplètes, au sujet de la prostate et des pathologies prolifératives qui touchent l'homme avec l'âge. Il est maintenant possible de s'attaquer aux mécanismes contrôlant la régulation des cellules épithéliales normales et cancéreuses pour approfondir la connaissance des événements menant au développement et à la progression du cancer.

3. Signalisation et cancer de la prostate

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une prolifération incontrôlée qui excède leur taux d'apoptose. De même, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de se déplacer, d'envahir la circulation et les autres tissus afin de former des métastases. La croissance des tumeurs requiert aussi l'apport accru de substances nutritives transportées par le sang et qui atteignent les cellules cancéreuses grâce à la formation de nouveaux vaisseaux. L'angiogénèse est donc essentielle à la survie des cellules cancéreuses. Ces mécanismes doivent être envisagés dans leur ensemble, chacun ayant un apport propre menant au développement et à la progression du cancer.

Dans les sections suivantes, une description générale du sujet est présentée et elle est suivie de l'état des connaissances actuelles en ce qui a trait à la prostate.

3.1. Régulation de la prolifération cellulaire

Différentes composantes ont des rôles importants à jouer dans le contrôle de la prolifération, que ce soit au niveau de sa stimulation ou de son inhibition. Les éléments clés présentés ici ont été choisis en fonction des études réalisées et des résultats présentés. Ainsi, il sera question: des hormones stéroïdiennes et de leurs récepteurs, compte tenu de leur apport important dans le développement de la prostate et des pathologies prolifératives ainsi que le maintien de l'épithélium de sécrétion; de divers facteurs de croissance et leurs récepteurs selon qu'ils augmentent ou diminuent la prolifération cellulaire; des tyrosine kinases et des sérine/thréonine kinases associées à l'action des FC et impliquées dans la cascade de signalisation; des phosphatases, en raison du contrôle qu'elles exercent sur les kinases; des récepteurs couplés aux protéines G, à titre de médiateurs de l'action des neuropeptides sécrétés par les cellules NE de la prostate et étudiés ici; et finalement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs qui sont, dans bien des cas, en partie responsable du développement du cancer. La figure 5 schématise les différentes voies de signalisation menant à la prolifération des cellules (en excluant toutefois le cycle cellulaire).

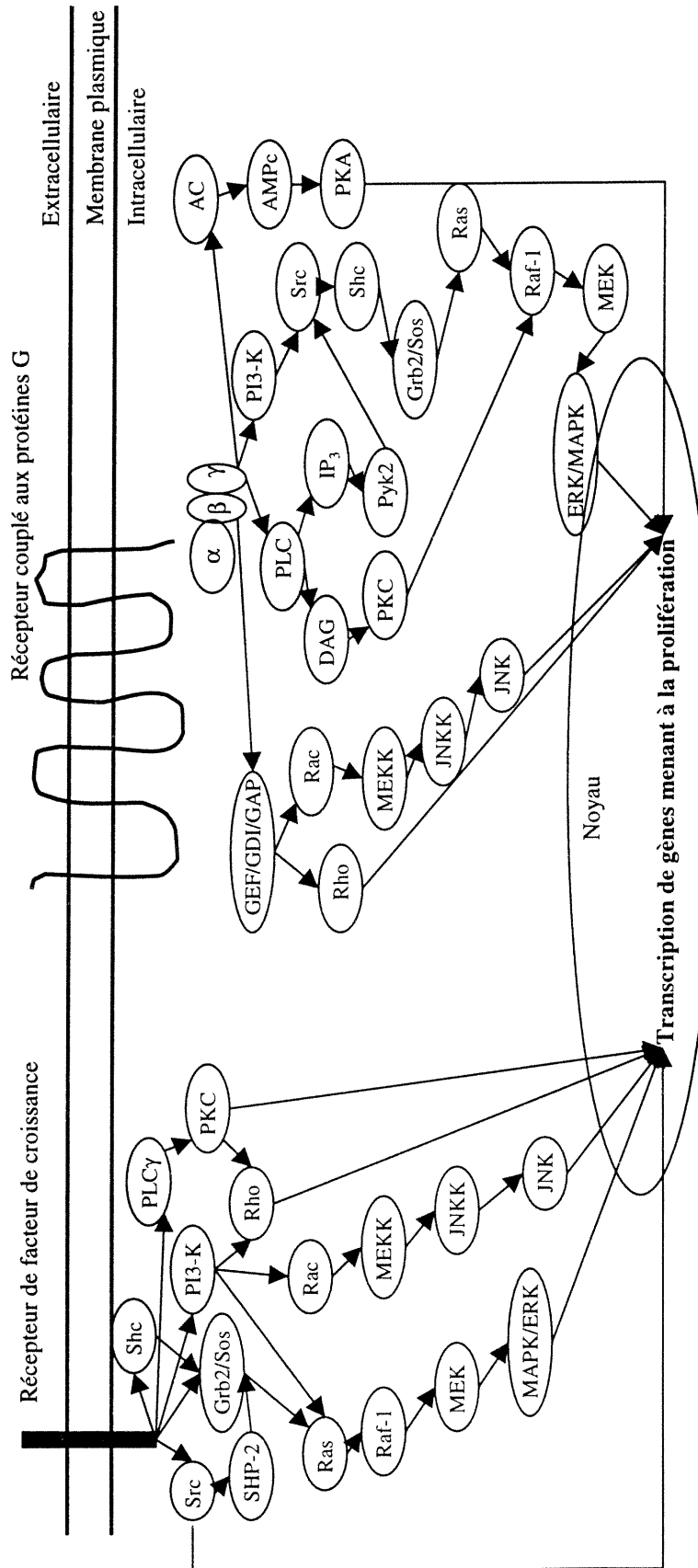


Figure 5 Voies de signalisation menant à la prolifération des cellules

Schéma des voies de signalisation et des principaux intermédiaires impliqués dans ces voies qui mènent à la prolifération des cellules. Les interactions entre ces molécules sont souvent régulées par des cascades de phosphorylation/déphosphorylation. PLC: phospholipase C; PI3-K: phosphatidylinositol 3-kinase; PKA: protéine kinase A; PKC: protéine kinase C; IP₃: inositol 1,4,5 triphosphate; DAG: diacylglycerol; AC: adénylate cyclase; AMPc: adénosine monophosphate cyclique; GEF: «guanine nucleotide exchange factor»; GDI: «guanine nucleotide dissociation inhibitor»; GAP: «GTPase-activating protein»; JNK: «Jun N-terminal kinase»; JNKK: «mitogen-activated extracellular-signal regulated kinase»; MEK: «mitogen-activated extracellular-signal regulated kinase kinase»; MEKK: «mitogen-activated protein kinase»; MAPK: «mitogen-activated protein kinase». Adapté de: Dhanasekaran *et al.* (1998); Heldin *et al.* (1998); Kumar (1998).

Tel qu'il est possible de l'observer sur cette figure, les différentes voies s'entrecroisent et certaines protéines-clés sont même impliquées dans plusieurs de ces voies. Les différentes composantes des voies de signalisation menant à la prolifération sont présentées séparément afin d'en faciliter la compréhension.

3.1.1. Hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes font partie d'une super-famille comprenant aussi l'acide rétinoïque, la vitamine D et l'hormone thyroïdienne. Les androgènes, les oestrogènes, les progestines, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes représentent les différentes familles d'hormones stéroïdiennes. Elles sont toutes dérivées du cholestérol et elles circulent dans le sang majoritairement sous une forme liée à la "sex-hormone-binding globulin" (SHBG). Ces hormones sont synthétisées par différents tissus ayant une fonction endocrine. Les androgènes proviennent principalement, mais non exclusivement, des testicules (cellules de Leydig) et des surrénales chez l'homme tandis que chez la femme, ils proviennent des ovaires, source prépondérante des oestrogènes et des progestines. Les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes sont surtout produits par les surrénales tant chez l'homme que chez la femme. La sécrétion des hormones gonadiques est sous le contrôle des hormones protéiques de l'hypophyse (LH et FSH) et des facteurs de relâche de l'hypothalamus (LHRH) (Sutherland et Mobbs, 1992).

En raison du sujet de cette thèse, le mécanisme d'action des hormones stéroïdiennes sera principalement décrit en fonction des androgènes. Néanmoins, ces mêmes mécanismes prévalent aussi pour les autres hormones stéroïdiennes.

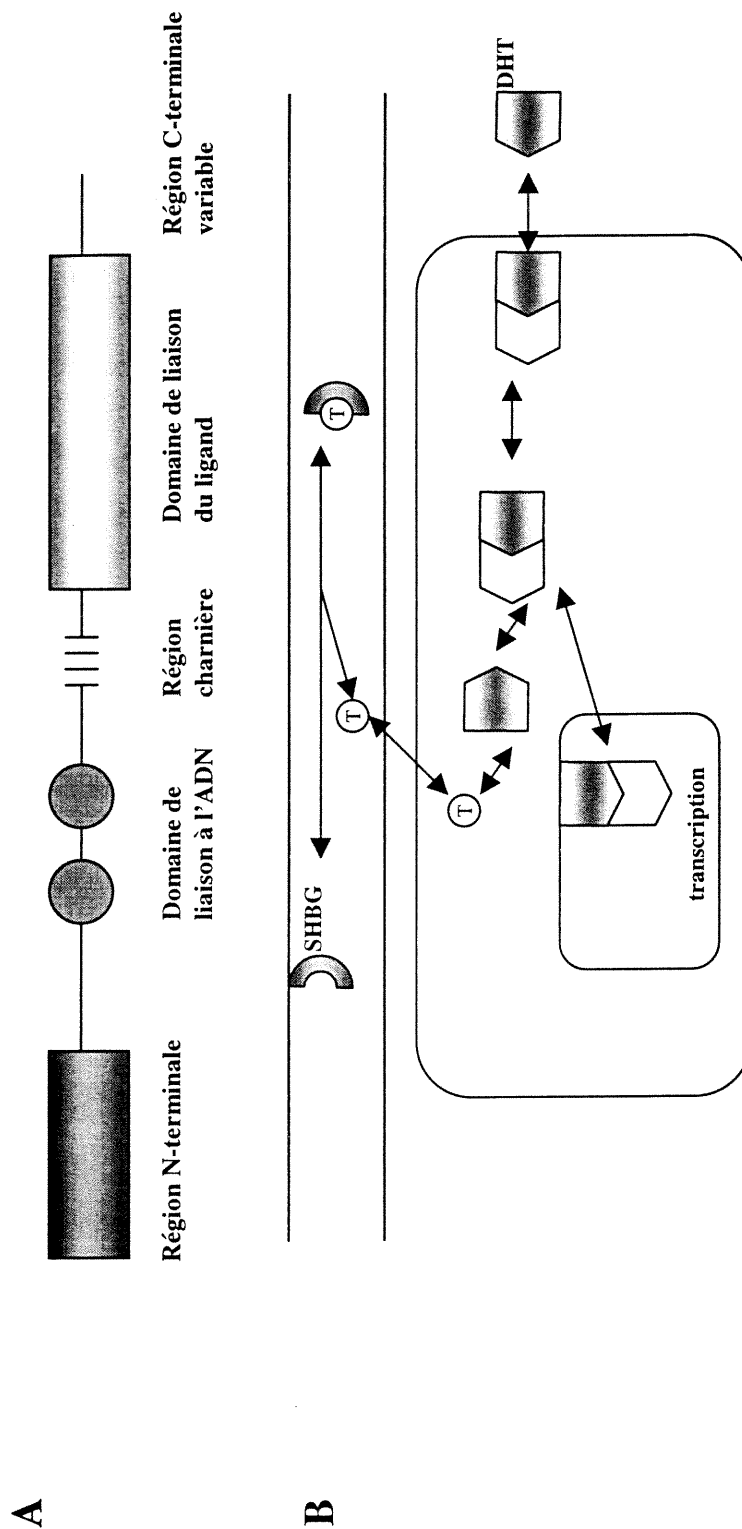


Figure 6 Structure du récepteur des androgènes et voie de signalisation des androgènes

A: Représentation schématique de la structure du récepteur des androgènes. **B:** Voie de signalisation des androgènes: la testostérone (T) peut être liée à la «sex hormone binding globulin» (SHBG), une protéine de transport. La T et la dihydrotestostérone (DHT) diffusent passivement à travers les membranes pour rejoindre le cytosol. La T est convertie en DHT et celle-ci peut alors lier le récepteur des androgènes (RA). Lorsque le RA est activé, il se transloque dans le noyau où il se lie à l'ADN et active la transcription génique. Adapté de Oesterling *et al.* (1997).

Les androgènes se lient à un récepteur spécifique qui possède des caractéristiques communes à tous les membres de cette famille de récepteurs nucléaires. Leur structure (figure 6A) comprend: une région N-terminale de composition et de longueur variables, suivie d'un domaine de liaison à l'ADN très conservé, d'une région charnière ("hinge domain"), d'un domaine de liaison du ligand hautement conservé et enfin, d'une région C-terminale variable sans rôle connu jusqu'à présent (Landers et Spelsberg, 1992).

La région N-terminale est aussi nommée domaine de régulation en raison de son implication au niveau de la régulation de la transcription des gènes (domaine AF-1), de la formation de dimères de récepteurs et de la liaison avec d'autres protéines (Landers et Spelsberg, 1992). Le domaine de liaison à l'ADN (ou DBD pour "DNA binding domain") adopte une conformation en doigts de zinc ("zinc fingers") lui permettant de lier l'ADN dans son sillon majeur et ainsi induire la transcription de certains gènes. Cette région, composée majoritairement d'acides aminés basiques se lie à des sites spécifiques, nommés "steroid/androgen responsive elements" (SRE/ARE), situés dans les promoteurs des gènes-cibles. La région charnière contient le signal de localisation nucléaire, qui active aussi la transcription, lie d'autres protéines et est responsable de la formation d'homodimères (Landers et Spelsberg, 1992). Enfin, la région de liaison du ligand (SBD pour "steroid binding domain") lie le ligand et est responsable de la spécificité de ces récepteurs. Il semblerait que ce soit elle aussi qui lie les protéines de choc thermique ("heat shock proteins" ou hsp). De plus, elle contiendrait un signal de localisation nucléaire et elle jouerait un rôle dans la transactivation génique (domaine AF-2) (Beato, 1989; Landers et Spelsberg, 1992; Beato *et al.*, 1996).

Il existe encore une controverse à savoir si les récepteurs des stéroïdes non occupés par leur ligand se retrouvent uniquement dans le noyau des cellules ou bien s'ils sont localisés dans le cytoplasme jusqu'à leur activation par les stéroïdes. Le mécanisme généralement accepté (figure 6B) veut que les stéroïdes diffusent

passivement à travers la membrane cytoplasmique et/ou la membrane nucléaire en raison de leurs propriétés lipophiles. Sous leur forme inactive, c'est-à-dire non occupés par leurs ligands, les récepteurs stéroïdiens sont complexés avec deux molécules d'hsp90 et probablement d'autres protéines (Beato, 1989). La raison exacte de l'association avec les hsp90 dans le cytoplasme n'est pas encore très bien comprise. Celles-ci pourraient simplement assurer une meilleure conformation du récepteur pour favoriser une liaison de haute affinité avec les stéroïdes (Beato *et al.*, 1996). La liaison du stéroïde à son récepteur provoque la dissociation des hsp90 et l'homodimérisation des récepteurs activés. Chaque dimère peut alors se lier aux SRE spécifiques par des interactions électro-statiques et des ponts hydrogènes, ainsi qu'à d'autres protéines afin d'activer ou de réprimer certains gènes connus sous le nom "immediate early genes" (Beato, 1989; Landers et Spelsberg, 1992). Les récepteurs agissent alors en tant que facteurs de transcription.

Les récepteurs stéroïdiens interagissent avec l'ADN par le biais de leur DBD qui reconnaît une séquence palindromique de 15 (élément de réponse des glucocorticoïdes) ou de 13 (élément de réponse des oestrogènes) nucléotides. Il est paradoxal que la même séquence soit reconnue par les récepteurs des glucocorticoïdes, des androgènes, des progestines et des minéralocorticoïdes, mais il semblerait qu'il doive exister un mécanisme permettant une reconnaissance spécifique, notamment par la différence dans la séquence des récepteurs et leur expression tissulaire. Les détails de ces mécanismes sont encore inconnus (Beato *et al.*, 1996). La spécificité des messages transmis par les divers récepteurs ayant un SRE commun vient peut-être de tels mécanismes.

La phosphorylation de presque tous les facteurs de transcription est un élément essentiel de leur régulation (Hunter et Karin, 1992). Il en va de même pour les récepteurs des stéroïdes (Kato *et al.*, 1995; Beato *et al.*, 1996). De façon générale, les acides aminés phosphorylés qui ont été trouvés sur tous les récepteurs stéroïdiens étudiés sont les sérines et les thréonines. La phosphorylation du

récepteur des oestrogènes a été relativement bien documentée. Non seulement ce récepteur doit-il être phosphorylé pour permettre au ligand de s'y lier, mais la phosphorylation d'une sérine particulière, la sérine 118 dans le domaine N-terminal, est requise pour permettre l'activation de la transcription par le domaine AF-1. De plus, il a été démontré que la phosphorylation de cette sérine est induite par les MAP kinases, suite à leur activation par les facteurs de croissance (Kato *et al.*, 1995), tel l'EGF (Bunone *et al.*, 1996). La fonction AF-2 du récepteur des oestrogènes est quant à elle induite par les oestrogènes (Kato *et al.*, 1995). Ceci suggère que tous les récepteurs stéroïdiens, en raison de leur grande homologie, puissent agir en tant que molécule de signalisation dans la transmission d'un signal généré par des facteurs de croissance à la membrane plasmique.

Dans la prostate, les récepteurs des androgènes sont présents à tous les stades du cancer (Klocker *et al.*, 1998). Cependant, la progression du CaP vers l'hormono-indépendance peut s'accompagner de la perte d'expression du récepteur androgénique, de changements au niveau de sa structure, ou encore de l'amplification de son gène (Lalani *et al.*, 1997). Des études réalisées sur des tissus cancéreux ont révélé une certaine hétérogénéité des cellules exprimant ou non le récepteur androgénique. La présence de ce récepteur dans ces cellules serait inversement proportionnelle au score de Gleason (Masai *et al.*, 1990). De plus, chez les patients qui ont vu leur CaP réapparaître, il y a une diminution significative du nombre de cellules exprimant le récepteur des androgènes (Masai *et al.*, 1990).

Des modifications au niveau de l'activation du récepteur des androgènes, telles l'hypersensibilité du récepteur face aux stéroïdes surrénaliens ou aux autres stéroïdes, ou encore des altérations/mutations du gène du récepteur androgénique ont été décrites (Ruijter *et al.*, 1999). Les résultats sont cependant contradictoires. Alors que certains affirment que la fréquence des mutations est très faible, d'autres indiquent que 44% des tumeurs analysées contenaient des mutations (Lalani *et al.*, 1997), notamment dans le DBD, la région charnière et dans le domaine de liaison

du ligand (Ruijter *et al.*, 1999). Ceci a mené à l'hypothèse voulant que la progression du CaP soit associée à une augmentation du nombre de cellules possédant déjà des mutations au niveau du récepteur des androgènes, plutôt qu'à l'apparition de nouvelles mutations du récepteur (Lalani *et al.*, 1997). Ces dernières pourraient avoir beaucoup d'importance si l'on considère qu'elles peuvent rendre le récepteur constitutivement actif, ou encore que d'autres stéroïdes, normalement peu actifs sur ce récepteur, ou encore des FC, puissent désormais l'activer. L'amplification du récepteur des androgènes pourrait résulter d'une sélection clonale survenue à la suite de l'hormono-thérapie (Koivisto *et al.*, 1997b). Enfin, le polymorphisme du récepteur des androgènes pourrait aussi être un facteur de risque du CaP.

De façon générale, les études sur la présence de ce récepteur dans les tumeurs prostatiques, peu importe leur degré de dépendance aux androgènes, couplées à l'absence d'anomalies structurales et fonctionnelles, suggèrent que des mécanismes autres que les androgènes et leurs récepteurs soient impliqués dans la progression du CaP. Ces mécanismes peuvent inclure l'activation de voies de signalisation des FC.

3.1.2. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des polypeptides de diverses tailles qui activent ou inhibent la prolifération, la différenciation et la motilité des cellules. Les plus connus sont le FC épidermique (EGF), les FC fibroblastiques (FGF 1 à 9), les FC transformants (TGF- α et TGF- β), le FC dérivé des plaquettes (PDGF), le FC hépatocytaire (HGF), ainsi que les FC semblables à l'insuline (IGF, IGF-I, IGF-II). Le FC vasculaire (VEGF) sera traité dans une section subséquente (section 3.3.2.) en raison de son rôle prépondérant vis-à-vis des cellules endothéliales, malgré certaines actions au niveau d'autres types de cellules. Les cytokines sont aussi des FC contrôlant surtout la division et la maturation des cellules hématopoïétiques bien que des études démontrent des effets sur les cellules épithéliales prostatiques.

Tel que mentionné précédemment, les cancers prostatiques sont majoritairement d'origine épithéliale. Puisque les travaux présentés portent sur les cellules épithéliales, la revue des connaissances des FC et leurs récepteurs dans la prostate sera limitée à ces cellules. Ce sujet a déjà fait l'objet de plusieurs articles de revue (McKeehan, 1991; Ware, 1993; Story, 1994; Steiner, 1995; Culig *et al.*, 1996; Chevalier *et al.*, 1996). La majorité des études sur le contrôle de la prolifération de lignées cellulaires prostatiques humaines par les FC montrent des effets de l'ordre de 30 à 60% d'augmentation du nombre de cellules ou encore de l'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN. Ces résultats varient selon les conditions expérimentales, *ie*, les FC utilisés, les doses et les types de cellules choisies. Aucun FC n'a été démontré comme étant le mitogène principal des cellules prostatiques. Tel que mentionné dans notre article de revue (Chevalier *et al.*, 1996), la grande majorité des FC sont synthétisés par le stroma et agissent de façon paracrine sur les cellules épithéliales normales où sont situés leur(s) récepteurs. D'autres FC agissent plutôt de façon autocrine (HGF et EGF), c'est-à-dire qu'ils sont produits par les cellules épithéliales et agissent aussi sur des cellules épithéliales (voisines ou elles-mêmes).

La famille du EGF, identifié dans les glandes salivaires de souris (Carpenter et Cohen, 1979), comprend aussi le TGF- α qui se lie au même récepteur que l'EGF, le R-EGF (ou ses homologues: ErbB-2, Neu/HER2). Malgré que l'EGF et le TGF- α ne possèdent que 35% d'homologie, leur efficacité à lier le R-EGF est à peu près identique et ces deux FC possèdent des activités biologiques similaires (Steiner, 1995). Ils sont impliqués dans la prolifération cellulaire, l'embryogénèse, la différenciation et même l'angiogénèse (Steiner, 1995). L'EGF serait essentiel pour la culture primaire de cellules épithéliales prostatiques humaines (Peehl, 1992). Le fluide et le tissu prostatiques sont les principales sources d'EGF chez l'humain et ces sources sont régulées par les androgènes (Ware, 1993; Steiner, 1995). Malgré ses similitudes avec l'EGF, le TGF- α est plutôt exprimé lors du développement de la prostate aux périodes pré- et néo-natales (Steiner, 1995).

Dans le CaP, il y a surexpression du TGF- α et du R-EGF, tout comme lors de l'embryogénèse. Plusieurs évidences supportent un rôle majeur de ce FC dans la prolifération des cellules cancéreuses. Dans les cellules androgéno-dépendantes, les androgènes stimulent la production de TGF- α et d'EGF, favorisant une prolifération plus active des cellules (Steiner, 1995). Quant aux cellules androgéno-indépendantes, la présence d'anticorps bloquant le TGF- α ou son récepteur, inhibe leur prolifération (Hofer *et al.*, 1991). Cependant, aucune corrélation n'a encore été trouvée entre la progression du cancer ou son grade et la présence de l'EGF ou de son récepteur.

Il y a dix FGF connus jusqu'à présent, et en ajoutant les différents homologues, la famille s'agrandit à plus de 20 membres (Lu *et al.*, 1999). Les principaux membres étudiés sont le FGF-1 (ou acide, a), le FGF-2 (ou basique, b) et le FGF-7 (ou KGF). Quatre récepteurs (produits par des gènes différents) et leurs isoformes produites par épissage alternatif, transmettent le signal des FGF. Ces récepteurs sont communs pour les différents membres, tout en ayant des affinités différentes, permettant des réactions croisées. Cependant, il semble que malgré ces similitudes, chaque FGF aurait des rôles distincts à jouer (Lu *et al.*, 1999). Les FGF se lient au sulfate d'héparan (présent dans l'espace extracellulaire/matrice extracellulaire), ce qui les protège de la dégradation par les protéases (Culig *et al.*, 1996). Pour ce qui est du FGFb, en plus d'être mitogène, il a été démontré qu'il est essentiel pour la prolifération des cellules épithéliales prostatiques de rat en culture (McKeehan et Adams, 1988), qu'il est impliqué dans l'angiogénèse et qu'il peut même affecter la production de l'ECM en régulant certaines protéases ainsi que la synthèse de collagène, de fibronectine et de protéoglycans (Steiner, 1995). Les FGFa et FGFb stimulent la prolifération des cellules épithéliales et stromales de la prostate humaine, tandis que le KGF n'est actif que sur les cellules épithéliales (Story, 1994). L'ARNm canin du KGF a aussi été isolé de la prostate (Canatan *et al.*, 1996). Le FGF8 (ou facteur induit par les androgènes, AIGF) est exprimé à tous les stades de développement de la prostate humaine, même lors de la progression androgéno-indépendante. Sa

surexpression étant associée à un faible taux de survie, il pourrait servir de marqueur pour prédire la survie des patients atteints de CaP (Dorkin *et al.*, 1999).

L'insuline et les IGF partagent une homologie de séquence et de fonction et transmettent leurs signaux par le biais de trois récepteurs, le récepteur de l'insuline et les R-IGF-I et R-IGF-II (Steiner, 1995). La voie de signalisation de l'insuline comprend aussi des protéines liantes, les IGFBP, qui modulent l'activité de l'insuline et des IGF en s'y liant (Baxter, 2000). Les IGFBP peuvent être sécrétées dans le milieu conditionné par les cellules prostatiques humaines en culture et se retrouvent aussi dans le sérum (Pollack *et al.*, 1999). Dans le cas du CaP, des changements du taux des IGFBP-2 et -3 ont été observés (Cohen *et al.*, 1992; 1993). De plus, il a été démontré que l'antigène prostatique spécifique (APS), grâce à son activité protéolytique, était responsable de la diminution des niveaux d'IGFBP-3, permettant une plus grande disponibilité d'IGF-I, et augmentant ainsi son effet (Cohen *et al.*, 1992). L'IGF-I est considéré comme un mitogène majeur des cellules épithéliales prostatiques (Steiner, 1995; Pollak *et al.*, 1999). Comme c'est le cas de plusieurs autres FC dans la prostate normale, l'IGF-I est produit par le stroma et il se lie à son récepteur, situé uniquement à la surface des cellules épithéliales (Steiner, 1995). L'IGF-I n'est pas détecté dans le milieu conditionné des cellules PC-3 et DU145 (Iwamura *et al.*, 1993). Ajouté de façon exogène, l'IGF-I stimule la prolifération des PC-3 et des DU145 (Iwamura *et al.*, 1993). Cette même étude a démontré que l'IGF-I, seul, est inactif sur les LNCaP, mais lorsqu'utilisé avec la DHT, il y a synergie et activation de la prolifération de ces cellules (Iwamura *et al.*, 1993).

Le TGF- β agit comme mitogène pour les fibroblastes, et comme inhibiteur pour les cellules épithéliales. Il est considéré comme un agent pléiotropique affectant aussi l'angiogénèse, la cicatrisation, l'invasion et la formation de métastases, la différenciation cellulaire, la formation d'ECM, de même que la suppression de la réponse immunitaire (Steiner, 1995; Culig *et al.*, 1996). Il existe cinq isoformes, mais seuls les TGF- β 1 à 3 sont exprimés chez les mammifères. La

famille comprend aussi les activines, les inhibines et les protéines façonnant les os (“bone morphogenetic proteins” ou BMP). Le TGF- β est sécrété sous forme de précurseur inactif. Des protéases ou différentes conditions physico-chimiques telles l’acidification, l’alkylation ou la chaleur sont requises pour l’activer (Pircher *et al.*, 1986; Sporn *et al.*, 1987; Lyons *et al.*, 1990). Le signal induit par le TGF- β est transmis par des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (TGF β -RI et TGF β -RII) qui forment des hétéromères, en plus de récepteurs accessoires, le betaglycan et l’endogline (Wrana *et al.*, 1992; 1994).

Dans la prostate, les BMP et les TGF- β 1 à 3 ont été retrouvés dans les tissus normaux et cancéreux ainsi que dans les trois principales lignées cellulaires, PC-3, DU145 et LNCaP (Wilding *et al.*, 1989). Des effets de stimulation et d’inhibition du TGF- β sur la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses ont été rapportés. Les PC-3 et les DU145 sont inhibées par le TGF- β (Wilding *et al.*, 1989) alors que la sensibilité des LNCaP est discutable. En effet, l’absence du TGF β -RI ou du RII (selon les auteurs) serait responsable du manque d’effet du TGF- β sur les LNCaP. Le TGF- β pourrait aussi bloquer l’effet de l’EGF dans ces cellules (Schuurmans *et al.*, 1988). Par ailleurs, la transfection de cellules LNCaP avec l’ADNc du TGF β -RI résulte en une inhibition de la prolifération de ces cellules par le TGF- β (Kim *et al.*, 1996). L’effet inhibiteur du TGF- β , dans les cellules PC-3 et DU145, passe par la diminution des niveaux des protéines Src et Lyn, de leur activité kinasique et par la réduction de la formation du complexe de signalisation SHC-Grb2 (Atfi *et al.*, 1994). Dans ces cellules, le TGF- β active une autre S/TK de 78 kDa, distincte du récepteur de type II et des autres S/TK de poids moléculaire semblable (Atfi *et al.*, 1995). Les effets *in vivo* du TGF- β sont moins clairs. Chez le rat castré, il a été proposé que le TGF- β induisait l’apoptose des cellules androgéno-dépendantes plutôt que la réduction de leur prolifération; l’apoptose par le TGF- β pouvant être induite même en présence d’androgènes exogènes (Kyprianou et Isaacs, 1988; 1989; Martikainen *et al.*, 1990). De là l’idée d’une régulation négative du TGF- β par les androgènes. Jusqu’à présent, il est impossible de relier les effets *in vivo* et *in vitro* du TGF- β . En comparant des

clones présentant une sensibilité ou une résistance au TGF- β , aucune corrélation n'a été trouvée entre la sensibilité *in vitro* et la formation de tumeur *in vivo* (Watts et Ware, 1992). Les cellules cancéreuses de prostate de rat (MATLyLu), résistantes au TGF- β *in vivo*, sont sensibles au TGF- β *in vitro*. Cette sensibilité se situe au niveau de la motilité et non de la prolifération (Watts et Ware, 1992). Lorsque le TGF- β 1 est surexprimé dans les cellules MATLyLu, elles forment des tumeurs plus volumineuses et plus de métastases (Steiner et Barrack, 1992). Le TGF- β réduit l'adhésion des cellules de rat Dunning AT-3, une lignée ayant la capacité de former des métastases, qui peuvent alors proliférer en suspension (Matuo *et al.*, 1990). En utilisant le modèle Dunning et ses sous-lignées, il a été démontré que les tumeurs les plus agressives sont capables de produire leur propre TGF- β en plus d'activer la forme latente. Ces résultats suggèrent l'existence d'une action autocrine du TGF- β dans le CaP avancé (Steiner et Barrack, 1994). De façon contradictoire, le TGF- β n'inhibe pas la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines TSU-Pr1, allant même jusqu'à stimuler l'incorporation de thymidine par un facteur de dix (Lamm *et al.*, 1998). Afin de justifier que les conditions expérimentales n'étaient pas en cause, les auteurs ont démontré que dans les mêmes conditions, l'incorporation de thymidine des PC-3 était bien inhibée. Il semble qu'une telle dualité d'action ait déjà été observée dans les cellules du côlon (Hafez *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1994). Ceci mènerait à la formation de tumeurs ayant une grande capacité à former des métastases (Lamm *et al.*, 1998).

Le GRP, un analogue de la bombésine, est le neuropeptide le plus étudié dans la prostate. La chromogranine A sert habituellement de marqueur des cellules neuroendocrines (NE), bien que plusieurs autres produits de sécrétion (sérotonine, TSH, PTH et PTHrP) soient aussi utilisés. Depuis quelques années, des études ont été entreprises pour mesurer les niveaux de la chromogranine A et/ou la chromogranine B dans le sérum afin d'essayer d'établir une corrélation entre les niveaux sériques de ces chromogranines et le stade du CaP. Plusieurs études ont récemment démontré des niveaux élevés de chromogranine A et de sécrétoneurine

(chromogranine C) chez les patients ayant un CaP avancé (Tarle, 1999; Berruti *et al.*, 2000; Di Sant'Agnesse, 2000; Wu *et al.*, 2000; Ischia *et al.*, 2000). Les données sur les effets de la bombésine dans la prostate sont contradictoires. Une augmentation de la prolifération des cellules PC-3 a été rapportée en présence d'insuline (Bologna *et al.*, 1989). La bombésine, la calcitonine, la sérotonine et le VIP n'ont aucun effet sur la prolifération des PC-3 et des LNCaP, mais ces produits de sécrétion des cellules NE ont un effet sur la prolifération des DU145 (Jongsma *et al.*, 2000). La bombésine aurait plutôt un rôle au niveau de la motilité/invasion des cellules PC-3 (Hoosein *et al.*, 1993; Aprikian *et al.*, 1997). Cependant, l'absence d'effet de la bombésine sur les LNCaP (Hoosein *et al.*, 1993) pourrait s'expliquer par les faibles niveaux de récepteur du GRP dans ces cellules (Aprikian *et al.*, 1996). Plus récemment, une étude de l'action de neuf neuropeptides a montré que seuls le GRP et le CGP (calcitonin gene product) étaient capables d'induire l'invasion et la migration des PC-3 alors que la substance P l'inhibait (Nagakawa *et al.*, 1998). Par contre, plusieurs produits de sécrétion des cellules NE, dont la bombésine/GRP et les membres de sa famille (tels la neuromédine B), ont la capacité d'augmenter les niveaux de calcium intracellulaire dans les PC-3 et les DU145, mais pas dans les LNCaP (Han *et al.*, 1997; Wasilenko *et al.*, 1997), ce qui s'explique par le faible nombre de sites de liaison de la bombésine sur les LNCaP (Aprikian *et al.*, 1996). De plus, l'activité enzymatique de l'endopeptidase neutre (NEP), connue pour hydrolyser la bombésine, est plus élevée dans les LNCaP que dans les PC-3 (Papandreou *et al.*, 1998). La PTHrP a d'abord été identifiée dans les cellules NE (Iwamura *et al.*, 1994a), puis elle a été détectée dans l'épithélium des prostatites normales et hyperplasiques (Peehl *et al.*, 1997), plutôt que dans les cellules NE. Un rôle de FC autocrinien a été proposé pour la PTHrP étant donné sa présence dans plusieurs lignées cellulaires de CaP (Iwamura *et al.*, 1994b). Il a été démontré que la PTHrP n'a pas d'effet quant à la prolifération des cellules épithéliales prostatiques isolées de glandes normales, ce qui laisse croire que la PTHrP a une autre fonction dans la prostate (Peehl *et al.*, 1997).

Dans les fibroblastes de souris (Swiss 3T3), l'activation de Fak est augmentée à la suite de leur traitement avec la bombésine, différents neuropeptides, ou encore des molécules bioactives telles la sphingosylphosphorylcholine (Sinnott-Smith *et al.*, 1993; Zachary *et al.*, 1993; Rozengurt, 1995; Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1998). Dans ces mêmes cellules, l'activation de Src par la bombésine et quelques neuropeptides, est indépendante de l'activation de Fak (Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1996). Des activations similaires ont été obtenues au laboratoire d'accueil avec les cellules cancéreuses de la prostate humaine. Un traitement de ces cellules avec la bombésine active Fak et induit la phosphorylation sur tyrosine de la paxilline, une molécule du cytosquelette associée à Fak, et favorise la motilité des cellules (Aprikian *et al.*, 1997). Dans les PC-3, l'effet de la bombésine sur Fak et la paxilline requiert la participation de la protéine kinase C (PKC), contrairement à ce qui a été rapporté pour les fibroblastes (Sinnott-Smith *et al.*, 1993; Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1998). De plus, le traitement des PC-3 avec la bombésine induit l'association de Src avec une nouvelle protéine nucléaire de 110 kDa (Allard *et al.*, 2000b).

Finalement, d'autres FC ont été étudiés dans la prostate, mais peu de renseignements sont connus quant à leur rôle fonctionnel. Brièvement, mentionnons: 1) le NGF (ou FC neuronal), tout comme plusieurs autres FC, est situé dans le stroma alors que son récepteur à activité TK se trouve dans les cellules épithéliales (Djakiew *et al.*, 1993); 2) le FC hépatocytaire (ou HGF), plutôt situé dans l'épithélium prostatique humain (Wolf *et al.*, 1991), tout comme son récepteur, le produit de l'oncogène *c-met* (Pisters *et al.*, 1995) dont l'expression est reliée à la progression du CaP (Humphrey *et al.*, 1995; Pisters *et al.*, 1995); 3) le PDGF, dont seules les chaînes A et la sous-unité α du récepteur ont été trouvées dans les cellules épithéliales et stromales de la prostate humaine (Fudge *et al.*, 1994). Il est à noter que le PDGF possède deux chaînes (A et B) et existe sous forme de dimères (AA, AB et BB). Sa chaîne B est comparable au proto-oncogène *c-sis*. Le récepteur du PDGF est composé de deux sous-unités (α et β) qui se retrouvent aussi sous forme de dimère; 4) deux facteurs testiculaires,

présents dans le fluide spermatique, ont été partiellement caractérisés (Sutkowski *et al.*, 1993). Leur action serait sélective: un des ces FC agirait uniquement sur les cellules épithéliales et l'autre, uniquement sur les cellules stromales. Un fait intéressant à souligner est qu'aucun de ces deux facteurs n'est détecté chez les hommes vasectomisés (Sutkowski *et al.*, 1993); 5) étant donné la prédilection des cellules prostatiques pour la formation de métastases osseuses, deux FC pour les cellules PC-3 ont été partiellement caractérisés. Un premier se retrouve dans le milieu conditionné de cellules stromales dérivées de moëlle osseuse, et un second sécrété par les cellules osseuses elles-mêmes (pour revue, voir Chevalier *et al.*, 1996).

Les effets de certaines cytokines (interféron α , γ et le facteur de nécrose tumorale, TNF) ont été caractérisés *in vivo* et *in vitro* sur des cellules prostatiques. Les cytokines peuvent être amenées à être en contact avec les cellules prostatiques, notamment lors d'infections ou lorsque d'autres mécanismes de défense immunitaire sont impliqués (par exemple, l'apport des «tumor infiltrating lymphocytes», TIL). Lorsqu'elles sont administrées sous différentes combinaisons, ces cytokines peuvent inhiber la formation de tumeurs (à partir des cellules PC-3 et DU145) chez les souris nues (pour revue, voir Chevalier *et al.*, 1996). Des effets plus ou moins similaires de ces cytokines, utilisées seules ou avec différents FC, ont été remarqués *in vitro* sur des lignées cellulaires prostatiques. L'érythropoïétine et le GM-CSF peuvent stimuler la prolifération des PC-3 et DU145, mais seul le GM-CSF stimule les LNCaP (pour revue, voir Chevalier *et al.*, 1996). De plus, les PC-3 et les DU145 expriment et sécrètent le GM-CSF (Lang *et al.*, 1994). Certaines cytokines peuvent donc agir sur des cellules cancéreuses qui ont elles-mêmes la capacité d'en produire. Cette observation est en accord avec l'expression, par différentes cellules épithéliales, des protéines Jak et STAT, respectivement des kinases et facteurs de transcription, originellement associés uniquement aux cytokines (Heim, 1996). L'endothéline-1, bien connue pour son action vasoconstrictrice, est aussi produite par les lignées cellulaires cancéreuses prostatiques humaines, sécrétée dans le liquide séminal et

libérée dans le sérum des hommes (Nelson *et al.*, 1995). Sa présence est cependant plus élevée dans le sérum d'hommes atteints d'un CaP hormono-indépendant et présentant des métastases (Nelson *et al.*, 1995). Ajoutée de façon exogène aux cellules en culture, l'endothéline-1 augmente la prolifération des TSU-Pr1, DU145, LNCaP et PC-3. Étant donné que l'endothéline-1 augmente l'activité de la phosphatase alcaline des cellules osseuses, un index de la formation osseuse, il est possible de croire qu'elle jouerait un rôle dans la formation de métastases osseuses provoquée par le CaP (Nelson *et al.*, 1995). Certaines interleukines (IL-1beta et IL-6) ont aussi la capacité de modifier la morphologie des cellules LNCaP afin qu'elles aient des extensions de type dendritique, caractéristique de cellules NE, et qu'elles sécrètent des produits de sécrétion typiques des cellules NE, telles la chromogranine A et l'énolase spécifique aux neurones (Diaz *et al.*, 1998; Chiao *et al.*, 1999; Spiotto et Chung, 2000; Zelivianski *et al.*, 2001).

L'action de quelques FC sur la prolifération des cellules épithéliales isolées de prostates normales, hyperplasiques et cancéreuses peut être bloquée par la suramine, un agent initialement utilisé contre les trypanosomes (Mitchen *et al.*, 1993). Il semble que la suramine inhiberait la liaison des FC à leur récepteur ou favoriserait plutôt la dissociation des FC de leur récepteur. Un excès de FC pourrait renverser de façon partielle ou complète l'effet de la suramine (Coffey *et al.*, 1987; Moscatelli et Quarto, 1989). Cependant, à faibles doses, la suramine induit la prolifération des cellules épithéliales prostatiques (Mitchen *et al.*, 1993).

Les études réalisées dans le laboratoire d'accueil révèlent toutefois que le sérum adulte humain ou canin utilisé sur des cultures primaires de cellules épithéliales de prostates canines et humaines, augmente le nombre de cellules d'environ 250%, en fonction de la durée de culture ou de la dose utilisée (Chevalier *et al.*, 1984). Les divers FC connus testés dans le système de culture primaire canin se sont avérés incapables d'induire la division des cellules épithéliales prostatiques (Chevalier *et al.*, 1991).

Étant donné que de nombreux FC sont contenus dans le sérum, l'équipe du laboratoire a partiellement caractérisé ce FC. Sa nature non-stéroïdienne a d'abord été démontrée par la présence de divers antagonistes qui ne modifient pas la réponse des cellules au sérum, de même que par l'élimination des stéroïdes endogènes par adsorption sur le charbon activé (Chevalier *et al.*, 1984). Sa nature peptidique a été révélée par hydrolyse acide (Chevalier *et al.*, 1984). En raison de sa spécificité relative face aux cellules épithéliales plutôt qu'aux fibroblastes prostatiques, il a été nommé FC prostatique, ou PGF (Chapdelaine et Chevalier, 1985). L'action mitogénique des sérums canin et humain a été attribuée à deux entités distinctes quant à leur poids moléculaire, l'une de faible poids moléculaire, PGF-II (1,5 - 2,0 kDa) et l'autre, de poids moléculaire plus élevé, PGF-I (50 kDa chez l'humain et 150 kDa chez le chien) (Chevalier *et al.*, 1993). De plus, le PGF-II, qui correspondrait à la fraction libre dans le sang, peut être extrait et dissocié du PGF-I, d'où l'hypothèse que le PGF-I serait une protéine de transport (Chevalier *et al.*, 1993).

En résumé, la situation quant à l'action des FC dans la prostate est peu comprise. Les pages qui précèdent décrivent l'expression des FC, mais il existe très peu de liens en ce qui concerne leur action ou rôle dans la progression du CaP. À cette fin, la connaissance des voies de signalisation induites par les FC est primordiale. Peu d'études décrivent ces mécanismes dans la prostate mis à part l'expression de certains récepteurs et protéines impliquées dans ces voies de signalisation. Les prochaines sections s'attardent aux mécanismes de signalisation qui ont généralement pour origine la liaison d'un FC à son récepteur.

3.1.3. Tyrosine kinases

Les tyrosine kinases (TK) peuvent être classées en diverses catégories, selon qu'elles soient transmembranaires (de type récepteur) ou cytosoliques (de type non-récepteur). Les récepteurs de FC sont généralement des protéines transmembranaires possédant souvent une activité tyrosine kinase intrinsèque

(Panayotou et Waterfield, 1993). Il existe aussi des récepteurs dépourvus d'activité kinasique auxquels viennent se lier des TK de forme non-récepteur (par exemple les membres de la famille de Jak ou de Src) (Heim, 1996). Finalement, on retrouve des récepteurs à activité sérine/thréonine kinases, tels les récepteurs du TGF- β (Wrana *et al.*, 1994). L'activité catalytique de ces enzymes, par le biais de leur domaine kinasique, ajoute un phosphate à certains résidus (principalement les tyrosines, sérines ou thréonines) contenus dans les protéines qui leur servent de substrat (Hanks *et al.*, 1988)

3.1.3.1. Tyrosine kinases de type récepteur

Les récepteurs des FC sont composés d'un domaine extracellulaire variable, d'un seul domaine transmembranaire, ainsi que d'un domaine intracellulaire qui possède une activité TK intrinsèque (figure 7) (Panayotou et Waterfield, 1993). La plupart des récepteurs sont sous une forme monomérique lorsqu'ils sont inactifs et ils dimérisent à la suite de la liaison d'un FC. Dans certains cas, il s'agit d'une homodimérisation (deux récepteurs identiques s'associent, par exemple le récepteur de l'EGF, des FGF). Dans d'autres cas, il y a plutôt hétérodimérisation, c'est-à-dire que des chaînes distinctes composent le complexe formant le récepteur (le récepteur de l'HGF/SF et les récepteurs des cytokines). Dans le cas du R-HGF/SF, un polypeptide dépourvu d'activité TK s'associe à un autre qui possède une activité TK intrinsèque. Il s'ensuit une transphosphorylation des récepteurs (ou autophosphorylation).

La présence de tyrosines phosphorylées permet alors l'ancrage de différentes protéines à certaines régions spécifiques (et de séquence définie) le long de la chaîne intracellulaire du récepteur.

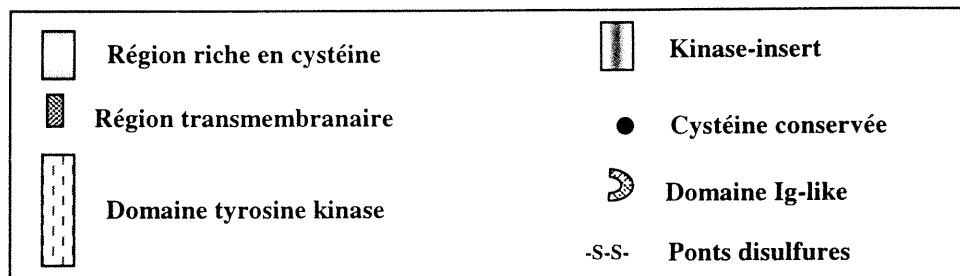
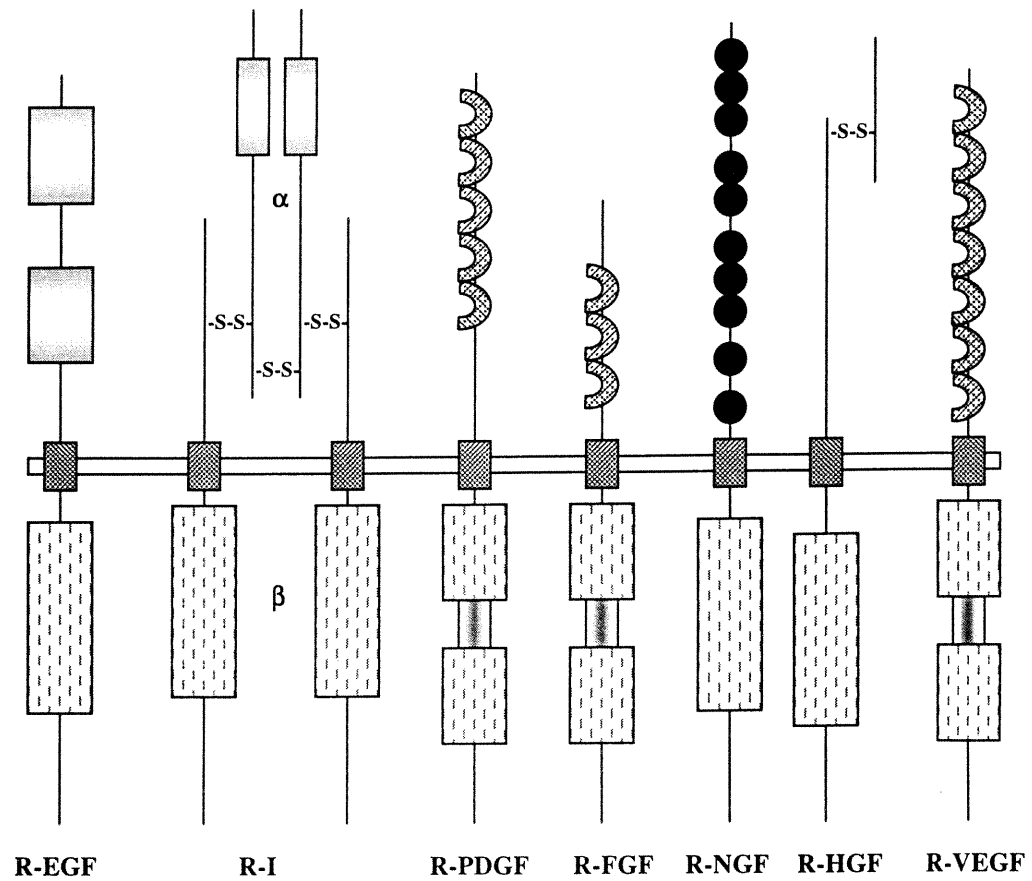


Figure 7 Structure des récepteurs de facteurs de croissance

Représentation schématique des différents récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase intrinsèque. R-I: récepteur de l'insuline. Tiré de: Panayotou et Waterfield (1993).

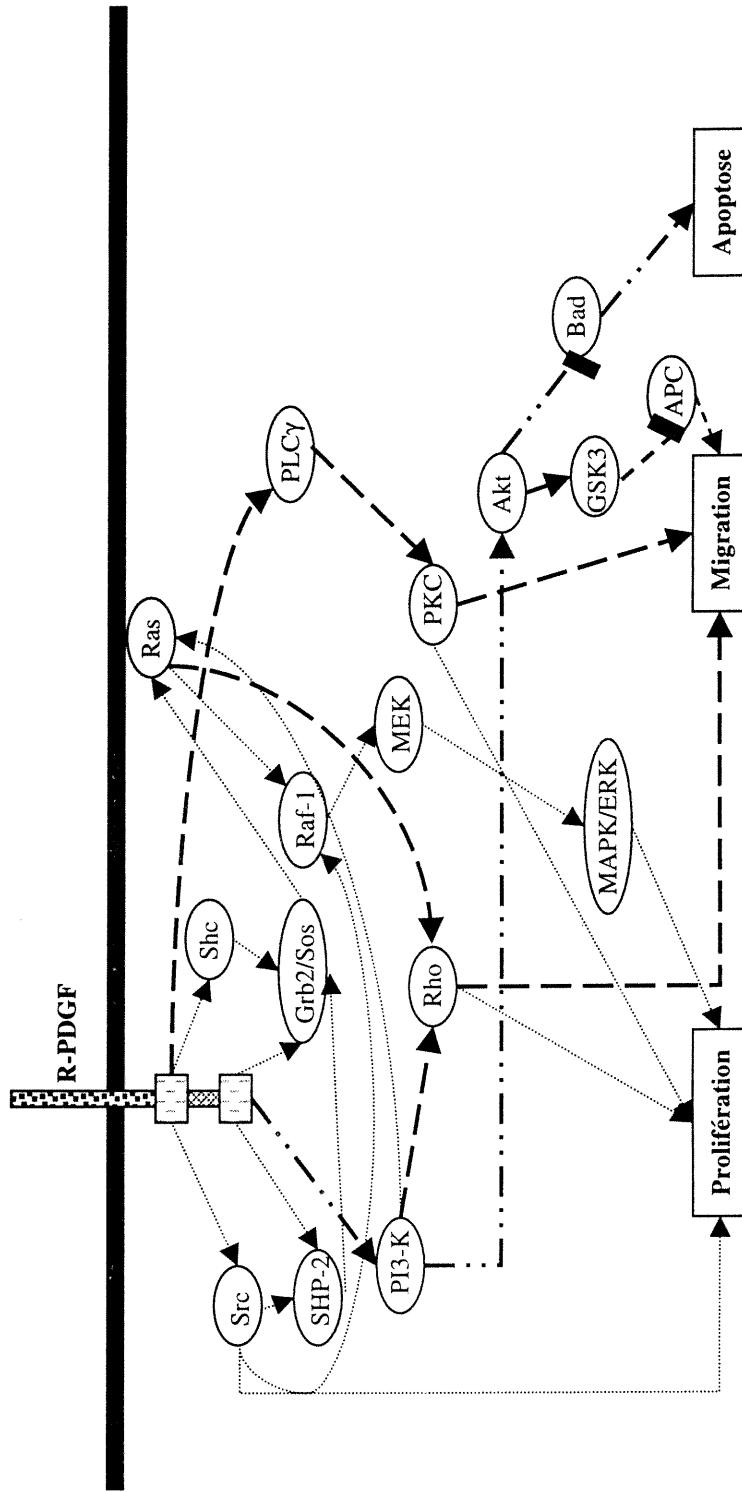


Figure 8 Voie de signalisation des tyrosine kinases

Schématisation de la voie de signalisation d'un facteur de croissance typique, le PDGF. Ces voies de signalisation mènent les cellules à la prolifération, la migration ou l'apoptose. Les interactions entre ces molécules sont souvent régulées par des cascades de phosphorylation/déphosphorylation. PLC: phospholipase C; PI3-K: phosphatidylinositol 3-kinase; PKC: protéine kinase C; ERK: «extracellular-signal regulated kinase»; MEK: «mitogen-activated extracellular-signal regulated kinase»; MAPK: «mitogen-activated protein kinase». Adapté de: Malarkey *et al.* (1995); Schlaepfer et Hunter (1996); Heldin *et al.* (1998)

Les protéines pouvant se lier aux récepteurs sont: les membres de la famille de Src, la sous-unité de 85 kDa de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), la phospholipase C (PLC), des phosphotyrosines phosphatases (PTPases) et enfin, des protéines adaptatrices (Grb2, Sos, SHC, NcK, GAP) (Panayotou et Waterfield, 1993; Malarkey *et al.*, 1995). À titre d'exemple, la figure 8 montre la signalisation du récepteur du PDGF, commençant par la liaison de Grb2 ou SHC au récepteur.

Les étapes successives permettent l'amplification du message jusqu'au noyau. Dans le cas du R-PDGF, la protéine effectrice, Sos, se lie ensuite à Grb2 ou SHC, qui, à leur tour, activent Ras, permettant l'activation de Raf, une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle alors un des membres de la famille des MAP kinases sur des résidus sérine. Il est à noter que Ras doit être liée à la membrane pour permettre son activation dans la cascade de signalisation (Wiesmüller et Wittinhofer, 1994). La "GTPase activating protein" (GAP) contrôle l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui a pour effet de rendre Ras inactive à nouveau. Dans sa forme active, Ras interagit directement avec Raf. Certaines études montrent que Ras seul n'est pas capable d'activer Raf (Stokoe *et al.*, 1994; Marshall, 1995). D'autres mécanismes, encore inconnus, seraient nécessaires (Leevers *et al.*, 1994), dont possiblement la protéine 14-3-3 (Malarkey *et al.*, 1995). L'association de Raf-1 et de BAG-1, une protéine qui agit avec Bcl-2 dans la suppression de l'apoptose, a aussi été rapportée (Wang *et al.*, 1996). Dans la voie de signalisation des FC menant à la division cellulaire, différentes MAPK sont activées et phosphorylées. Certaines sont transportées vers le noyau, où elles peuvent alors activer c-jun et c-fos, des facteurs de transcription faisant partie du complexe AP-1 (Panayotou et Waterfield, 1993; Karin, 1995) qui régule les gènes nécessaires à la mise en branle de la division cellulaire. De fait, JNK serait activée en réponse aux FC (Collins *et al.*, 1996). Les MAP kinases à double activité sont les MAP kinases kinases, les substrats de Raf (une MEKK: MAP kinase ou Erk kinase). Il existe sept MAPKK (ou MKK-1 à -7) connues qui phosphorylent sur tyrosine, sérine et thréonine les «extracellular-signal regulated kinase» ERK1, 2, 5, JNK/SAPK, p38MAPK (Dhanasekaran et Reddy, 1998). Ces dernières, aussi

membres de la famille des MAP kinases, se déplacent dans le noyau pour phosphoryler différents facteurs de transcription. Étant donné que plusieurs de ces membres peuvent être activés de différentes façons, il semble que ce soient des stimuli autres que les FC (stress/choc aux cellules, des dommages induits par les rayons UV ou par certaines cytokines) ou encore la durée de la stimulation qui déterminent la voie de signalisation qui sera empruntée (McCawley *et al.*, 1999; Marshall, 1995). Toutefois, ceci ne ferait pas l'unanimité.

Les FC induisent aussi l'activation de CREB par le biais de Ras, des MAPK et d'une CREB-kinase (Xing *et al.*, 1996). À ces mécanismes permettant l'induction de la transcription, s'ajoute possiblement l'action de différents FC, tels le FGF-1, FGF-2 et le SDGF ("Schwannoma Derived Growth Factor"), ou de leur récepteurs (FGFR-1 et 4), dans le noyau (Prochiantz et Théodore, 1995; Feng *et al.*, 1996). Le rôle de ces molécules dans ce compartiment cellulaire n'est pas encore compris.

Bien que la voie décrite ci-haut semble assez généralisée pour plusieurs récepteurs possédant une activité TK intrinsèque, certains de ces récepteurs (par exemple, le R-EGF) se lient aussi aux Jak kinases (Heim, 1996). Les Jak sont des kinases cytoplasmiques qui médient normalement la signalisation des cytokines chez les cellules hématopoïétiques par le biais des récepteurs des cytokines (Heim, 1996).

L'activation des Jak permet alors le recrutement des STAT ("signal transducers and activators of transcription") qui activent directement la transcription (voir figure 9). Les STAT possèdent un domaine SH2 par lequel elles s'ancrent à des régions (séquence définie) du récepteur ayant une phosphotyrosine. Les STAT sont à leur tour phosphorylées par les Jak. Ceci permet leur dimérisation et leur translocation vers le noyau, où elles peuvent se lier à un élément de réponse dans le promoteur des gènes-cibles (Heim, 1996).

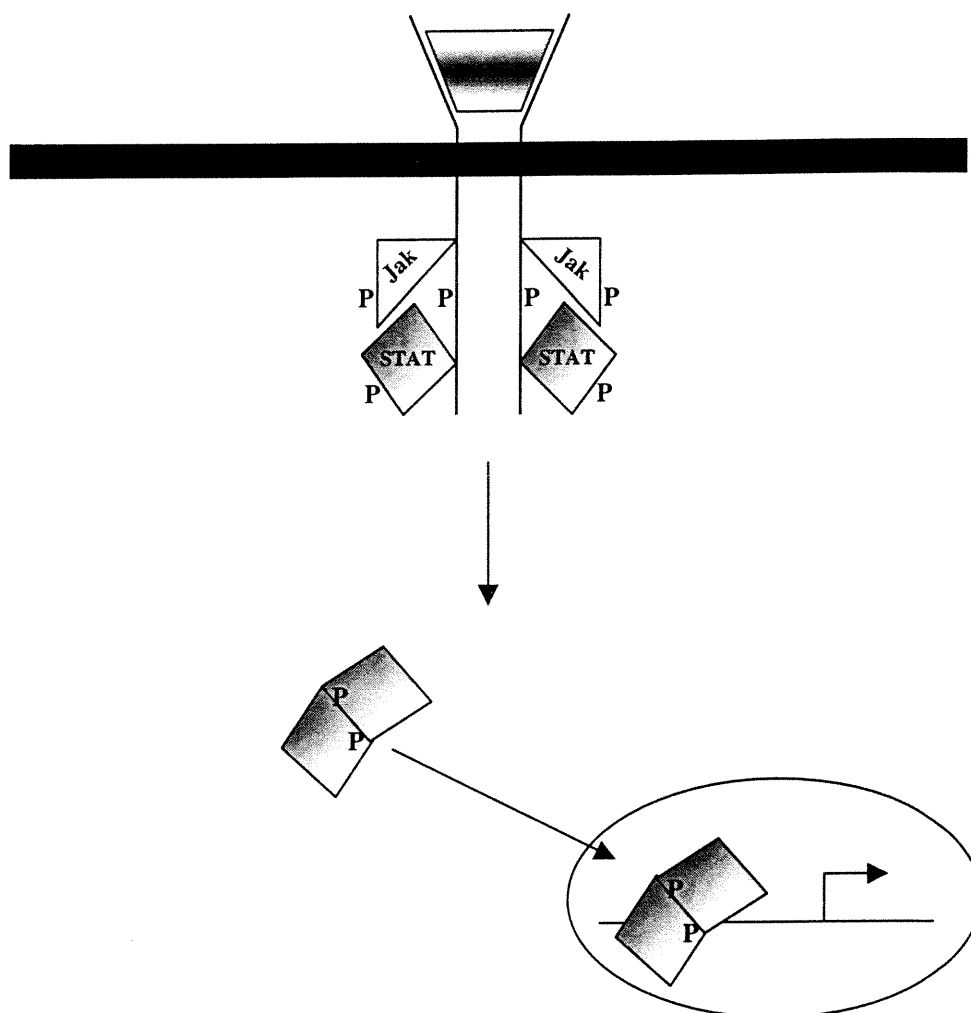


Figure 9 Voie de signalisation des Jak et des STAT

Schématisation de la voie de signalisation des Jak-STAT. À la suite de la liaison du ligand à un récepteur dépourvu d'activité TK intrinsèque, les Jak se transphosphorylent, puis ils phosphorylent le récepteur. Les STAT vont alors s'associer au récepteur (à une tyrosine phosphorylée) où elles sont phosphorylées à leur tour par les Jak. Les dimères de STAT phosphorylés transloquent dans le noyau où ils se lient à des éléments de réponse dans le promoteur des gènes-cibles et activent la transcription de ces gènes. P: site de phosphorylation. Tiré de: Heim (1996; 1999)

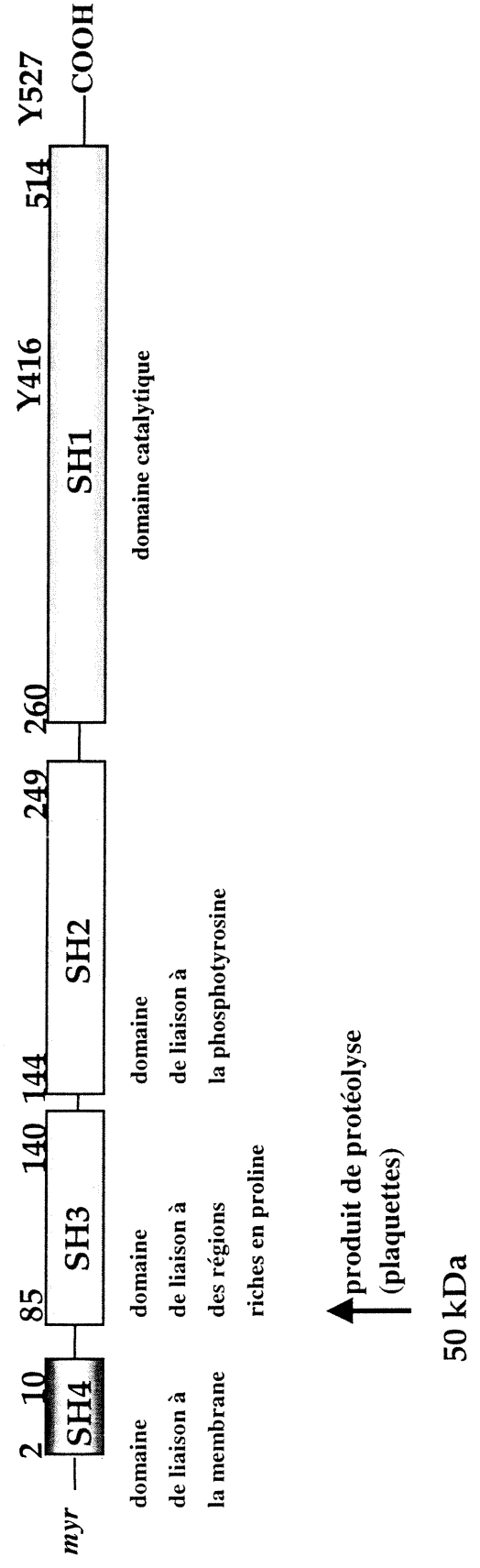


Figure 10 Structure de Src
 Schématisation de la structure de Src. Les principales tyrosines sont identifiées. Src est le prototype d'une famille qui inclut aussi yes, lyn, fyn, blk, hck, lck, fgr et yrk. Adapté de: Cantley *et al.* (1991).

Le domaine SH4 se situe en N-terminal de la protéine et permet l'ancrage de Src à la membrane. La glycine en position 2 sert d'accepteur d'un acide myristique. Les résidus en positions 3 à 7 sont aussi importants pour que la myristylation ait lieu et ils sont relativement bien conservés à travers les membres de la famille (Brown et Cooper, 1996). De plus, certains membres de la famille, mais pas Src (Koege *et al.*, 1994), possèdent un acide palmitique qui est ajouté, *via* un mécanisme réversible, lorsque la protéine se trouve déjà à la membrane. Ceci stabiliserait l'association à la membrane et permettrait une relocalisation de ces kinases, notamment dans les cavéoles, suite à un stimulus (Brown et Cooper, 1996). Il semble que l'association des membres de la famille Src à la membrane soit essentielle pour leur activité kinasique (Spencer *et al.*, 1995). Src et les membres de sa famille se retrouvent au niveau de la membrane périmoléculaire ainsi que dans les plaques d'adhésions et le cytosquelette (Brown et Cooper, 1996).

Le domaine unique, situé immédiatement en C-terminal du domaine SH4, diffère grandement d'un membre à l'autre. Cette région pourrait servir à établir d'autres contacts avec différentes protéines. Ainsi, la TK Lck possède deux cystéines dans ce domaine qui servent à l'associer aux récepteurs CD4 et CD8 (Brown et Cooper, 1996). Ce domaine permet aussi son interaction avec des phosphatases (Gervais et Veillette, 1995). Quant à Src, ce domaine contient plusieurs sites potentiels de phosphorylation par différentes kinases, telles le complexe cdc2/cycline (régulation du cycle cellulaire), la protéine kinase C (PKC) et une MAPK (Brown et Cooper, 1996).

Le domaine SH3 lie des protéines ou peptides contenant un région riche en proline. Ces liens sont de faible affinité et la spécificité de séquence n'est pas très élevée (Yu *et al.*, 1994b). Le domaine SH3 est essentiel pour la localisation de Src au niveau du cytosquelette et pour la régulation négative de son activité (Brown et Cooper, 1996). Le récepteur du PDGF peut phosphoryler Src dans le domaine SH3 (Broome et Hunter, 1996).

Le domaine SH2 lie avec une forte affinité des protéines ou des peptides contenant une phosphotyrosine (pY) (Anderson *et al.*, 1990). Chaque domaine SH2 reconnaît une séquence spécifique dans laquelle les résidus pY+1, +2 et +3 ont des rôles précis à jouer (Brown et Cooper, 1996). Certains phospholipides pourraient se lier au domaine SH2 et contribuer ainsi à la localisation membranaire de Src (Rameh *et al.*, 1995). Le domaine SH2 joue aussi un rôle dans l'inhibition de l'activité de Src.

Le domaine SH1, ou domaine kinasique, est hautement conservé, non seulement à travers la famille de Src, mais aussi au niveau de toutes les kinases, qu'elles soient tyrosine-, sérine- ou thréonine-spécifique (Hanks *et al.*, 1988). La spécificité TK de Src, et par conséquent la possibilité de phosphoryler uniquement des résidus tyrosine, lui vient d'une boucle dans son domaine kinasique où un résidu proline (Pro425) contribue à lier les groupements phényles contenus dans les tyrosines. Cette boucle ne peut lier les sérines et thréonines qui sont dépourvus de ce groupement phényle (Brown et Cooper, 1996). La Tyr416 de Src est le principal site d'autophosphorylation associé de façon positive à son activité (Smart *et al.*, 1981). L'activité catalytique d'un mutant de v-Src (Phe416) est peu affectée, mais son activité transformante est réduite (Snyder *et al.*, 1983). En plus de contribuer à l'activation complète de Src, la Tyr416 sert aussi de site de liaison pour le domaine SH2 d'autres protéines.

Tous les membres de la famille de Src possèdent une queue en C-terminal composée d'environ 15 à 17 acides aminés. La Tyr527 de Src, qui est par ailleurs hautement conservée à travers la famille, est située dans ce domaine. Cette tyrosine est le principal site de phosphorylation de Src et elle contrôle de façon négative l'activité kinasique de Src. Les premières évidences sont apparues à la suite de la délétion de cette tyrosine, ce qui a provoqué une importante augmentation de son activité kinasique (Courtneidge, 1985). Il a depuis été démontré que l'inhibition de l'activité de Src venait du fait que son propre domaine SH2 se liait à la Tyr527 phosphorylée (Matsuda *et al.*, 1990).

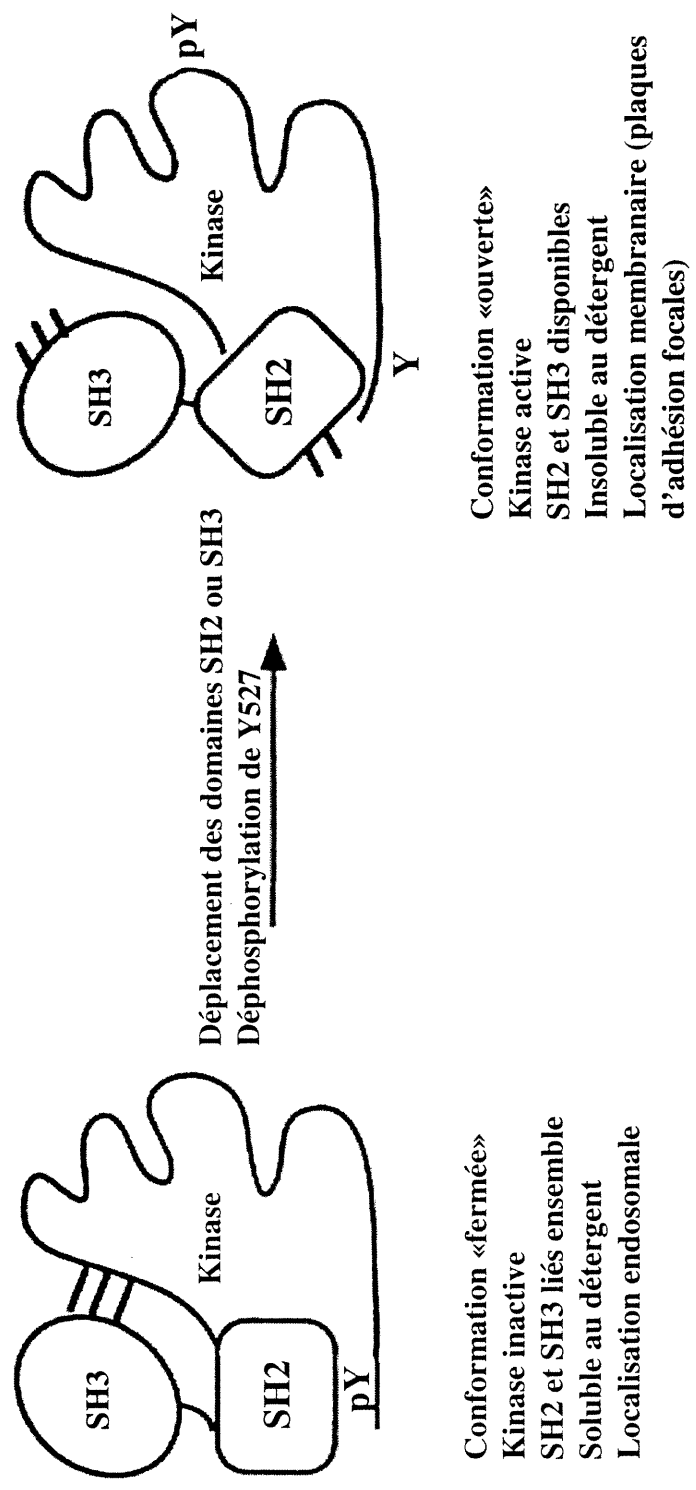


Figure 11 Activation et inhibition de Src

Schématisation de la structure de Src, ses principaux changements structuraux, de localisation et d'interactions intramoléculaires avec le passage de l'état fermé à l'état ouvert. Tiré de: Schwartzberg (1998).

Cette liaison amène un changement de conformation, passant de l'état "ouvert" à l'état "fermé" (voir figure 11). En se repliant ainsi, les domaines kinasiques, SH2 et SH3 ne sont plus accessibles aux autres protéines. Les domaines SH2 et SH3 contribuent à maintenir l'état "fermé" de la protéine (Cooper et Howell, 1993). La phosphorylation de la Tyr527 surviendrait après celle de la Tyr416 et donnerait lieu à une protéine doublement phosphorylée et inactive. Celle-ci verrait ensuite sa Tyr416 être déphosphorylée, ce qui permettrait, une fois l'inhibition levée, l'activation du domaine kinasique par la phosphorylation sur Tyr416 (Stover *et al.*, 1994). L'activité de Src est régulée à la fois par des phosphatases et par des kinases. Dans les lymphocytes, la présence de CD45, une phosphatase, est nécessaire à l'activation des membres de la famille de Src (Weiss et Littman, 1994). La phosphatase Syp peut déphosphoryler jusqu'à 50% de la Tyr527 (Peng et Cartwright, 1995). De plus, il a été démontré qu'une autre phosphatase, SHP-1, pouvait directement s'associer à Src, la déphosphoryler en Tyr527 et se faire phosphoryler par Src (Somani *et al.*, 1997). La kinase responsable de la phosphorylation de la Tyr527, et par conséquent de l'inhibition de l'activité de Src, est la c-Src kinase Csk (Nada *et al.*, 1990).

Régulation de Src

Csk, une protéine de 50 kDa, a été purifiée et clonée et est retrouvée dans presque tous les tissus (Okada et Nakagawa, 1988; Nada *et al.*, 1990). Tout comme plusieurs autres TK, Csk possède un domaine SH2 et un domaine SH3 et fait partie d'une famille dont l'autre membre est Matk (Chow *et al.*, 1994). Elle est capable de phosphoryler tous les membres de la famille de Src. Il semble que l'activité de Csk ne soit pas régulée, mais son accessibilité à Src peut être régulée par sa distribution dans la cellule. Ainsi, Csk est normalement localisée dans le cytosol, mais lorsqu'elle est associée à la membrane, son efficacité à phosphoryler Src est augmentée (Chow *et al.*, 1993). Csk est aussi située dans les plaques d'adhésion et grâce à ses domaines SH2 et SH3, elle peut vraisemblablement se lier à d'autres protéines, telles Fak et la paxilline. En fait, neuf protéines phosphorylées sur tyrosine ont été retrouvées dans des immunoprécipités de Csk

de cellules où Src était activée (Neet et Hunter, 1995). Dans la prostate humaine et les cellules PC-3, une association entre Csk et la paxilline a été démontrée (Tremblay *et al.*, 1996b), concordant avec les résultats d'une autre équipe dans un autre système sur la phosphorylation de la paxilline par Csk (Schaller et Parsons, 1994).

Fonctions de Src

De multiples fonctions biologiques ont été décrites pour Src. Src peut phosphoryler de nombreux substrats parmi lesquels se trouvent des composantes du cytosquelette, des intermédiaires de la cascade de signalisation par les MAPK (Shc, PI3-K, PLC, RasGAP, Syp), des molécules impliquées dans l'adhésion (Fak, intégrines, caténines et connexines), la cavéoline-1, et enfin Sam68, une protéine qui lie l'ARN (Brown et Cooper, 1996). Une association entre le domaine SH3 de Src et des canaux à potassium a aussi été signalée (Holmes *et al.*, 1996). L'absence du gène Src n'est pas létale, ce qui suggère une certaine redondance entre les membres de la famille (Soriano *et al.*, 1991). Par ailleurs, les souris déficientes en Src souffrent d'ostéopétrose. Src est aussi impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, et plus particulièrement au niveau de la transition G2/M (Taylor et Shalloway, 1996). Une nouvelle protéine adaptatrice, SLAP ("Src-like adaptor protein") contenant des domaines SH2 et SH3 peut s'associer au récepteur du PDGF à la place de Src, inhibant ainsi la prolifération des fibroblastes (Roche *et al.*, 1998).

Lyn est aussi présente dans le cytosol de prostate de chien normale et hyperplasique (Allard *et al.*, 1997). Src et Lyn ont été identifiées dans la prostate métaplasique de chien comme faisant partie d'un complexe protéique membranaire de haut poids moléculaire (Allard *et al.*, 1997). Le TGF- β diminue les niveaux d'expression de Src et Lyn dans les cellules PC-3 (Atfi *et al.*, 1994). Dans ces mêmes cellules, sous l'action de la bombésine, Src s'associe à une p110 nucléaire qui pourrait être un facteur de transcription (Allard *et al.*, 2000b).

Autres motifs

Outre les domaines SH2 et SH3, d'autres motifs assurent la reconnaissance entre protéines et permettent leurs interactions. Le domaine PTB ou "phosphotyrosine binding" a un rôle similaire au domaine SH2. Par contre, ce sont les acides aminés -3 et -2, à partir de la tyrosine, qui sont conservés dans la séquence reconnue par le domaine PTB. Il importe de souligner qu'il n'est pas essentiel que la tyrosine soit phosphorylée, pourvu qu'une tyrosine soit présente (Sudol, 1998). Le domaine EH, pour "Eps homology" (Eps vient de "EGF receptor phosphorylation substrate"), reconnaît les mêmes acides aminés que le domaine PTB (Sudol, 1998). Il semble que la liaison du domaine EH à son ligand soit impliquée dans l'endocytose (Salcini *et al.*, 1997). Le domaine WW exerce des fonctions similaires à celles du domaine SH3, c'est-à-dire qu'il reconnaît des régions riches en proline. Son nom WW vient du fait que deux résidus tryptophanes (W) sont présents et conservés dans ce domaine. Ils sont séparés par environ 20 acides aminés (Sudol, 1998). Le domaine PH, pour "pleckstrin homology" servirait probablement à diriger les protéines vers la membrane (Pawson, 1995). Ce domaine peut lier des phospholipides (par exemple le phosphatidylinositol-4,5-P₂) ou des protéines, comme par exemple les sous-unités β et γ des protéines G (Touhara *et al.*, 1994). Le domaine PDZ, nommé d'après trois protéines qui contiennent ce domaine, est présent dans les protéines cytosoliques principalement impliquées dans les contacts cellule-cellule (Sudol, 1998). Ce domaine reconnaît trois groupes de séquences uniques, localisées généralement en C-terminal des protéines, et dans lesquelles la présence d'un acide aminé hydrophobe en C-terminal est essentielle (Sudol, 1998).

Fak

La kinase d'adhésion focale, Fak (125 kDa), a tout d'abord été identifiée comme la principale protéine phosphorylée sur tyrosine dans les cellules d'embryons de poulet transformées par l'oncogène *v-Src* (Kanner *et al.*, 1990). Son identité a par la suite été établie en tant que TK distincte des autres TK connues. Son nom lui vient de sa localisation dans les plaques d'adhésion

(Schaller *et al.*, 1992). Fak ne possède ni domaine SH2 ni domaine SH3, et son domaine catalytique est situé au milieu de la protéine (voir figure 12). Ce qui la distingue particulièrement des autres TK est une séquence, en C-terminal de la protéine (nommée FAT pour “focal adhesion targeting”), qui est responsable de sa localisation au niveau des plaques d’adhésion (Schaller et Parsons, 1994). De plus, un site de liaison aux intégrines se trouve en N-terminal de Fak. Un second gène, exprimé dans certaines cellules donne naissance à “Fak-related non-kinase” (FRNK, une protéine de 41 à 43 kDa qui correspond à une portion de Fak) qui est dépourvue d’activité kinasique (Schaller *et al.*, 1993). La surexpression de FRNK empêche l’action de Fak en bloquant la formation de plaques d’adhésion focales et en réduisant la phosphorylation de Fak, de la paxilline et de la tensine (Richardson et Parsons, 1996). L’étalement des cellules, inhibé par FRNK, peut être renversé par la surexpression conjointe de Fak ou encore de Src (Richardson *et al.*, 1997). Dans le cas où seule Src est aussi surexprimée (dans les cellules surexprimant déjà FRNK), Fak n’est pas phosphorylée, mais la paxilline l’est et les cellules s’étalent correctement, suggérant ainsi un rôle crucial pour la paxilline (Richardson *et al.*, 1997).

Fak possède deux régions riches en proline, lui permettant de s’associer avec des protéines contenant des domaines SH3. Il existe six sites de phosphorylation sur tyrosine dans Fak: les tyrosines 397, 407, 576, 577, 861 et 925 (Hanks et Polte, 1997). Parmi celles-ci, la tyr397 sert de site d’autophosphorylation et d’interaction avec le domaine SH2 de Src, et les tyr576, 577 et 925 sont probablement phosphorylées par Src. Effectivement, lorsque des peptides correspondant à différentes régions de Fak sont utilisés, Src s’associe à ces peptides par ses domaines SH2 et SH3 (Thomas *et al.*, 1998). La phosphorylation sur les tyr576 et 577 est essentielle pour que Fak ait une activité kinasique maximale, tandis que la phosphorylation sur tyr925 créerait un site pour Grb2 et lierait ainsi Fak à la voie de signalisation des MAPK (Hanks et Polte, 1997). La phosphorylation de Fak sur résidus sérine pourrait être une façon de réguler l’activité de Fak (Hanks et Polte, 1997).

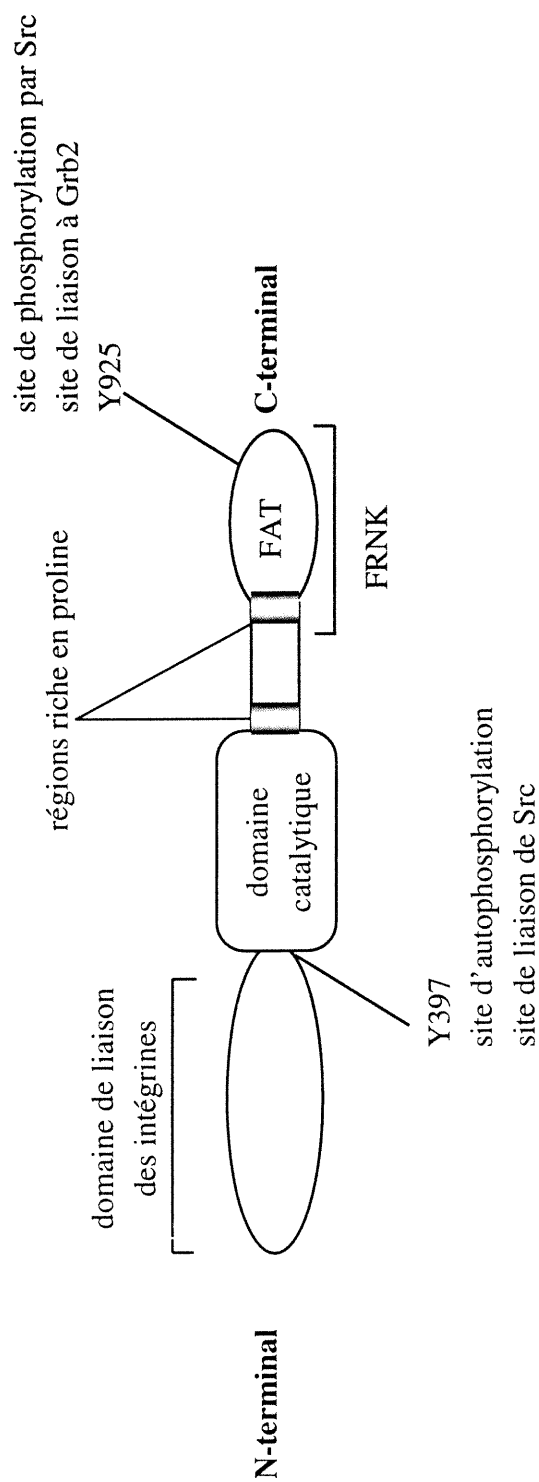


Figure 12 Structure de Fak

Schématisation de la structure de Fak. Seules les deux principales tyrosines sont identifiées, mais Fak contient de nombreux autres sites de phosphorylation (tyrosine et sérine). Les deux régions riches en proline permettent des interactions avec les domaines SH3 d'autres protéines. FAT: «focal adhesion target»; FRNK: «focal non-related kinase». Adapté de: Schaller et Parsons (1994); Schlaepfer et Hunter (1996); Hanks et Polte (1997); Zachary (1997); Vuori (1998).

Il existe maintenant un autre membre dans la famille de Fak: Pyk2, qui est aussi nommée Raftk, Cadtk et Cak β , selon les groupes qui l'ont simultanément identifiée (Sasaki *et al.*, 1995; Lev *et al.*, 1995; Avraham *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996). Pyk2 possède une structure très similaire à celle de Fak, mais seulement environ 45% d'homologie globale (Sasaki *et al.*, 1995). Le domaine catalytique est la région où la plus forte homologie est trouvée, soit 61%. La séquence FAT est aussi conservée à 61%, tandis que l'ensemble de la région C-terminale ne possède que 40% d'homologie avec Fak. Il en est de même pour le région N-terminale. De plus, Fak et Pyk2 semblent impliqués dans des fonctions différentes. Des études associent Fak à la survie des cellules et Pyk2 à leur apoptose (Frisch *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Xiong et Parsons, 1997). Pyk2 a besoin du calcium pour être activée, *i.e.* activée uniquement par des facteurs induisant une augmentation du calcium intracellulaire, alors que Fak est calcium-indépendante et peut être activée par une panoplie de FC (Lev *et al.*, 1995; Dikic *et al.*, 1996). Des résultats contradictoires sont publiés quant à son activation par les intégrines, sa localisation dans les plaques d'adhésion *versus* une localisation périnucléaire et ses niveaux de phosphorylation endogène. Par contre, l'équivalent de FRNK, nommé PRNK, et dépourvu d'activité kinasique, est aussi généré pour Pyk2 (Xiong *et al.*, 1998). Vraisemblablement, Fak et Pyk2 ne jouent pas des rôles redondants car l'absence du gène de Fak dans les souris est léthale (Illic *et al.*, 1995). Il a été démontré que le problème majeur des cellules déficientes en Fak isolées de ces embryons est leur motilité réduite et un nombre élevé de plaques d'adhésion focale (Illic *et al.*, 1995). Dans ces cellules, l'expression de Pyk2 et sa phosphorylation sur tyrosine sont augmentées, mais sa localisation est plutôt périnucléaire et non dans les plaques d'adhésion (Sieg *et al.*, 1998). De plus, l'activité des membres de la famille de Src est aussi augmentée, mais ni Src ni Pyk2 ne suffisent pour restaurer la motilité de ces cellules (Sieg *et al.*, 1998). Enfin, les gènes de Fak et Pyk2 sont localisés sur des régions distinctes du chromosome 8 qui sont amplifiées (Fak: q24-qter) ou délétées (Pyk2: p21.1) dans le CaP (Fiedorek et Kay, 1995; Inazawa *et al.*, 1996).

L'expression de Fak a d'abord été observée dans le cerveau humain normal (Andre et Becker-Andre, 1993). Puis d'autres études ont démontré l'absence ou de faibles niveaux d'expression de Fak dans plusieurs autres tissus humains normaux, une expression occasionnelle dans les pathologies bénignes et des niveaux élevés dans presque toutes les tumeurs étudiées (sein, colon, prostate, rein, thyroïde, oesophage), ainsi que dans leurs métastases (Weiner *et al.*, 1993; Owens *et al.*, 1995; Jenq *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1996b; Kornberg, 1998). Au contraire, Pyk2 n'est exprimée que dans le tissu prostatique épithélial normal et hyperplasique, alors que son expression décline avec l'augmentation du stade du CaP (Stanzione *et al.*, 2001).

Fak s'associe avec la chaîne β des intégrines et est activée lors de la liaison des intégrines à des protéines de la matrice extracellulaire. Plusieurs peptides bioactifs (bombésine, vasopressine, bradykinine, cholecystokinine, *etc.*), facteurs de croissance (FGF, HGF, IGF, PDGF, EGF, VEGF) ou autres molécules bioactives (acide lysophosphatidique, sphingosylphosphorylcholine) ont aussi la capacité d'activer Fak, et par conséquent, la phosphorylation de la paxilline (Baron *et al.*, 1998; Casamassima et Rozengurt, 1998; Abedi et Zachary, 1997; Brunton *et al.*, 1997; Leventhal *et al.*, 1997; Schaller, 1997; Rozengurt, 1995; Hatai *et al.*, 1994). En utilisant le système de double hybride chez la levure, une association entre Fak et un substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1) a été démontrée (Lebrun *et al.*, 1998). Cette association est intéressante car l'IRS-1 forme aussi un complexe avec les intégrines, notamment avec le récepteur de la vitronectine, $\alpha_v\beta_3$ (Vuori et Ruoslahti, 1994). Une S/TK associée aux intégrines β , "integrin-linked kinase" (Ilk), pourrait aussi interagir avec Fak (Hannigan *et al.*, 1996). Une tyrosine phosphatase, PTP-PEST, joue un rôle important dans l'organisation du cytosquelette et la formation des plaques d'adhésion, tel que démontré dans des fibroblastes où PTP-PEST est absente (Angers-Loustau *et al.*, 1999). Dans ces fibroblastes, la quantité de points de contact entre les cellules et la fibronectine est augmentée et les cellules sont peu ou pas motiles. De plus, certaines protéines

(Fak, paxilline, p130Cas) sont plus phosphorylées dans les cellules -/- que dans les cellules +/-, expliquant en partie les défauts observés et suggérant fortement que le rôle de la phosphatase PTP-PEST soit essentiel pour détacher les fibroblastes de la matrice et leur permettre de se mouvoir. Une autre phosphatase, PTEN un gène suppresseur de tumeur, déphosphoryle Fak (Gu *et al.*, 1998). La participation de Fak dans la voie de signalisation par les intégrines ne fait plus de doute. De plus, Fak est même essentielle à la régulation du cycle cellulaire lorsque les cellules sont stimulées par l'activation des intégrines. Ces constatations ont été tirées à la suite d'observations à propos de la surexpression de Fak qui accélérerait la transition G₁-S du cycle cellulaire (Zhao *et al.*, 1998). Cette fonction requiert la présence de la tyr397 de Fak et peut être inhibée par la présence de FRNK. Ces résultats vont de pair avec ceux démontrant que l'expression du domaine C-terminal de Fak (qui correspond approximativement à FRNK) provoque une perte d'adhésion et la mort des cellules (Xu *et al.*, 1998a). Ceci est en accord avec le concept voulant que les cellules normales doivent adhérer à une matrice quelconque afin de proliférer. Cette adhésion essentielle est souvent celle qui est générée par les intégrines (adhésion cellules-matrice). L'ADN des cellules non-adhérées subit généralement des dommages irréversibles. Ces dernières meurent alors par apoptose (Chinnaiyan et Dixit, 1996). Les signaux transmis par Fak suite à la liaison des intégrines aux protéines de l'ECM seraient en fait des signaux de survie qui empêchent l'apoptose des cellules induite par p53 (Illic *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2000). Le rôle essentiel de Fak dans la survie des cellules a été démontré simultanément par deux groupes. Fak est clivé par certaines caspases (des enzymes responsables de l'apoptose, voir section 3.2.), avant que les cellules ne se détachent (Levkau *et al.*, 1998), en un fragment qui ressemble à FRNK (Gervais *et al.*, 1998). Le clivage de Fak serait responsable de la perte des points de contacts focaux, de la déphosphorylation de Fak et par conséquent, de la dissociation des complexes de signalisation (Gervais *et al.*, 1998; Levkau *et al.*, 1998). Les différentes voies de signalisation impliquant Fak sont illustrées à la figure 13.

Peu d'études sur l'expression de Fak ont été réalisées dans la prostate, autres que celles du laboratoire d'accueil. Fak n'est pas ou peu exprimée dans la prostate normale de chien ou d'humain (Tremblay *et al.*, 1996a; 1996b). Son niveau d'expression et son activation vont de pair avec l'étalement et la prolifération des cellules basales en culture primaire (Tremblay *et al.*, 1996a). De même, l'expression et l'activation de Fak sont observées lors du remodelage de l'épithélium induit par la castration et l'administration d'oestrogènes chez le chien (Tremblay *et al.*, 1996a) ou avec l'existence de cancer avancé chez les hommes (métastases) (Tremblay *et al.*, 1996b). Des résultats similaires sont trouvés dans les lignées prostatiques cancéreuses humaines: Fak est peu exprimée et inactive dans les LNCaP (représentant un cancer peu avancé et bien différencié). Par contre, elle est fortement exprimée et activée dans les PC-3 (représentant un phénotype peu différencié et un cancer avancé) et les DU145 (Tremblay *et al.*, 1996b). De plus, dans les PC-3, la bombésine augmente la phosphorylation sur tyrosine de Fak de façon dose- et temps-dépendante (Aprikian *et al.*, 1997). Cette activation requiert la PKC et l'intégrité du cytosquelette (Aprikian *et al.*, 1997). La nécessité du cytosquelette d'actine pour l'activation de Fak par la bombésine a aussi été démontrée sur les PC-3 (Duncan *et al.*, 1996). Sous l'effet de la bombésine, Fak s'associe à certaines intégrines β (Aprikian *et al.*, 1997). L'action de la bombésine dans ces cellules a aussi été reliée à la mobilisation du calcium (Han *et al.*, 1997) et à une motilité accrue (Aprikian *et al.*, 1997). Cependant, la bombésine n'a aucun effet sur le taux d'adhésion des cellules PC-3 à des protéines de l'ECM ainsi que sur leur prolifération (Aprikian *et al.*, 1997). L'adhésion des PC-3M, stimulée par la génistéine, provoque aussi une association aux intégrines (Bergan *et al.*, 1996). Quant aux LNCaP, leur faible taux de migration sur la vitronectine serait causé par le peu d'expression de l'intégrine β_3 . La surexpression de cette intégrine restaure la migration des LNCaP qui est par ailleurs inhibée s'il y a co-surexpression de FRNK, reliant le mouvement des LNCaP à la voie de signalisation de Fak (Zheng *et al.*, 1999). Le potentiel métastatique des PC-3 et des DU145 a été corrélé avec l'expression de Fak, sa phosphorylation sur tyrosine et son activité (Slack *et al.*, 2001).

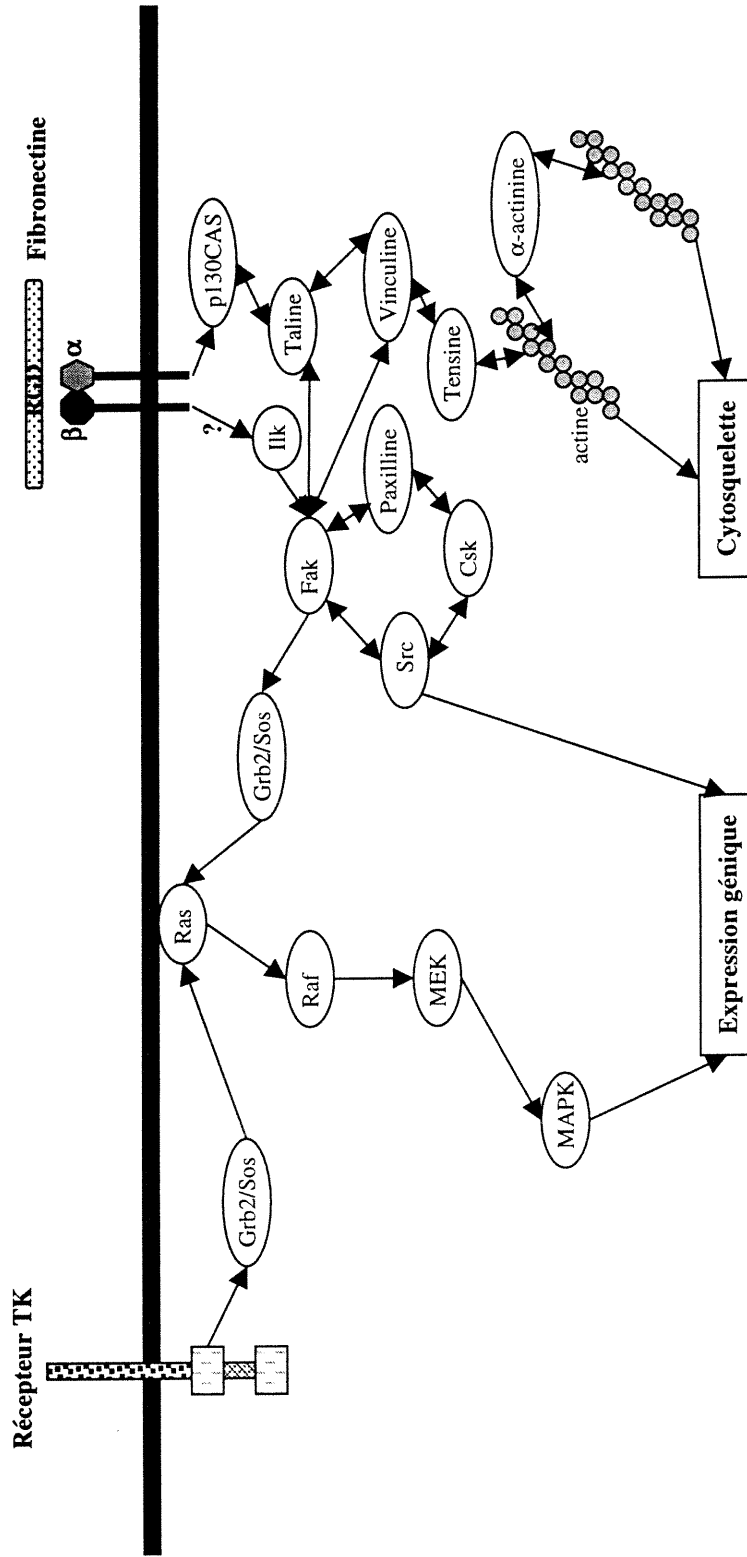


Figure 13 Voies de signalisation de Fak

Schématisation des voies de signalisation impliquant Fak. Fak peut se coupler à la voie des RTK. Il a aussi été proposé que différents RTK pouvaient directement activer Fak. Fak peut donc réguler l'expression génétique et la structure des cellules (par le biais du cytosquelette et des molécules qui y sont associées). Fak est aussi impliquée dans la motilité des cellules mais les mécanismes exacts ne sont pas encore élucidés. Quelques phosphatases contrôlent les niveaux de phosphorylation de Fak. Adapté de: Dedhar et Hannigan (1996); Otey (1996); Schlaepfer et Hunter (1996); Giancotti (1997); Vuori (1998).

Dans ces cellules, l'autophosphorylation de Fak dépend de l'adhésion et leur capacité migratoire peut être inhibée par la surexpression de FRNK ou le traitement avec un inhibiteur des kinases de la famille de Src (Slack *et al.*, 2001).

Jak

Les Jak (Jak1 à 3 et Tyk2) sont principalement associées aux récepteurs dépourvus d'activité TK intrinsèque, tels les récepteurs des cytokines (Heim, 1996). La voie de signalisation empruntée par les Jak nécessite le recrutement des STAT, leur phosphorylation sur tyrosine par les Jak et leur translocation vers le noyau où les STAT servent de facteur de transcription (voir figure 9). Il a récemment été démontré que les Jak et les STAT peuvent aussi s'associer aux RTK. La présence des Jak n'est pas un pré-requis pour l'association des STAT avec les récepteurs TK (Heim, 1999). Les STAT sont des protéines ubiquitaires (Heim, 1999). De plus, STAT3 a été décrit comme un oncogène (Bromberg *et al.*, 1999) et les souris dont le gène STAT3 est absent («gene knockout») meurent à l'état embryonnaire (Heim, 1999).

3.1.4. Sérine/thréonine kinases

Il existe de nombreuses S/TK impliquées dans la régulation de la phosphorylation de plusieurs protéines. Les plus connues sont Raf, les récepteurs I et II du TGF β , ainsi que les protéines kinases C et A (PKC et PKA). Raf fait suite à Ras dans la cascade de phosphorylation menant à l'activation des MAPK. Akt est aussi une S/TK et elle est impliquée dans les mécanismes anti-apoptotiques (Aoki *et al.*, 1998).

Dans le contexte des FC décrits précédemment, la voie de signalisation induite par le TGF β est différente de la voie habituellement empruntée par les FC. Tout d'abord, contrairement aux autres FC, les récepteurs du TGF β ne sont pas des TK, mais plutôt des S/TK (Sporn *et al.*, 1987). La liaison du TGF β au récepteur II recrute le récepteur I. Il y a alors formation d'un hétéromère composé de deux molécules de chaque récepteur (Wrana *et al.*, 1992; 1994). Les intermédiaires de

cette cascade sont les Smad (1 à 9), dont certains ont la capacité de se déplacer dans le noyau et de moduler la transcription de gènes cibles (Wrana *et al.*, 1994). Une autre S/TK activée par le TGF β est une p78 distincte des S/TK déjà connues et possédant un poids moléculaire du même ordre de grandeur (Atfi *et al.*, 1995). L'activité de cette kinase a été mise en évidence dans les cellules prostatiques DU145 et PC-3.

Les voies de signalisation impliquant l'activation ou l'inactivation des PKC sont maintenant mieux connues. La bombésine, par le biais de récepteurs couplés aux protéines G (voir section 3.1.6.), active la PKC. La phosphorylation sur tyrosine inhibe la PKC δ (Denning *et al.*, 1996). Par ailleurs, une PKC est aussi capable d'activer Raf-1 (Malarkey *et al.*, 1995), un intermédiaire de la cascade de signalisation induite par Ras. La PLA₂ est quant à elle responsable de l'hydrolyse des acides gras menant à la production de l'acide arachidonique. Il a aussi été démontré que certaines protéines G agissaient directement sur les canaux calciques plutôt que par voie intermédiaire (Crouch et Hendry, 1993).

3.1.5. Phosphatases

Tout comme c'est le cas des kinases, il existe des phosphatases qui déphosphorylent spécifiquement les résidus tyrosine (PTP) ou les résidus sérine et thréonine (PSP). La famille des PTP est divisée en quatre sous-familles: transmembranaires, cytoplasmiques, à double spécificité, de faible poids moléculaire (Olivero *et al.*, 1998). Contrairement à la croyance initiale, les phosphatases sont régulées d'une manière complexe. L'inhibition de l'action des phosphatases peut avoir des conséquences drastiques sur le développement des tumeurs. En effet, lorsque les FC se lient à leur récepteur, il s'ensuit une cascade de phosphorylation. Mais cette phosphorylation est temporaire car les phosphatases déphosphorylent les différents intermédiaires, contrôlant ainsi la durée du signal et donc son effet (Hunter, 1995). Si ces effets sont maintenus, une prolifération (ou toute autre fonction) non-contrôlée s'ensuivra. Ainsi, la phosphatase PTEN/MMAC1 est un gène suppresseur de tumeurs (Li *et al.*, 1997).

Par ailleurs, l'inactivation de SHP-2, une phosphatase ubiquitaire qui se lie aux récepteurs de FC et à Src, est léthale pour les embryons de souris (Saxton *et al.*, 1997). Des phosphatases exercent aussi une fonction dans le contrôle du cycle cellulaire, comme c'est le cas de Cdc25 qui déphosphoryle Cdc2, un intermédiaire important dans le cycle cellulaire. Cdc25 possède une double spécificité (tyrosine, sérine et thréonine). Elle agit aussi sur les kinases régulatrices du cycle cellulaire, les Cdk, en les activant (Cans *et al.*, 1998). Ce ne sont donc pas toutes les phosphatases qui ont une fonction négative, certaines sont requises pour l'activation des récepteurs TK, des Cdk ou de Src.

Dans la prostate, la PAP est une PTP importante pour la déphosphorylation des protéines (Lin et Clinton, 1987; Nguyen *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1994; Boissonneault *et al.*, 1995). La PTP-1B, une PTP cytosolique (Olivero *et al.*, 1998), est présente dans la prostate hyperplasique et cancéreuse, ainsi que dans la lignée cellulaire PC-3 (Boissonneault *et al.*, 1995). Ces deux PTP se retrouvent associées à la membrane dans les cellules prostatiques en division et ont vraisemblablement un rôle important à jouer dans le développement et la progression du CaP (Boissonneault *et al.*, 1995).

3.1.6. Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G, ou récepteurs serpentins, sont caractérisés par leurs sept domaines transmembranaires. Parmi ces récepteurs serpentins se retrouvent les récepteurs de l'adrénaline, de la bombésine, de la vasopressine, de l' α -thrombine, de l'acétylcholine et de la sérotonine (Pouysségur et Seuwen, 1992). Les protéines G quant à elles, sont composées de trois sous-unités (α , β et γ) associées entre elles et à la membrane cellulaire. Ces protéines ne sont pas associées aux récepteurs lorsque ceux-ci sont inactifs. Ces trimères lient les nucléotides guanosines (GDP et GTP). Le GDP est lié à la sous-unité α lorsque les protéines G sont inactives. L'activation des récepteurs par la liaison du ligand et le changement de conformation de sa partie cytoplasmique qui s'ensuit, amène la séparation du trimère en deux complexes (α et β - γ) et le remplacement du

GDP par le GTP. Il semble que les deux complexes aient chacun un rôle à jouer dans la transmission du signal, mais le rôle exact de chacun n'est pas encore clairement défini. Cependant, le GTP est lentement hydrolysé en GDP par l'activité GTPasique de la sous-unité α , et les protéines G retrouvent alors leur forme inactive. Des kinases phosphorylent les récepteurs couplés aux protéines G et provoquent la dissociation du récepteur des protéines G qui y sont associées. La phosphorylation est aussi responsable de l'internalisation du récepteur et par conséquent, de sa désensibilisation (Carman *et al.*, 1999).

Il existe différentes espèces de protéines G: Gs, Gi, Go, Gz et Gq qui mènent chacune à des effets distincts (Crouch et Hendry, 1993). La sous-unité α , ou le dimère β - γ (selon les auteurs) des protéines G agit sur d'autres effecteurs tels l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase C (PLC) et la phospholipase A (PLA). À leur tour, ces effecteurs produisent des signaux intracellulaires (Crouch et Hendry, 1993). L'adénylate cyclase est responsable de la production d'AMP cyclique (AMPc), un second messenger. L'effet des protéines G sur la PLC provoque une hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). La production d'IP₃ relâche le Ca²⁺ intracellulaire alors que le DAG active les protéines kinases C (PKC) (voir figure 14).

Ras et Rho font partie de la famille des petites protéines G à activité GTPasique. Cette famille contient plus de 80 membres et elle est divisée en neuf branches, parmi lesquelles se trouvent Ras et Rho (Zohn *et al.*, 1998). Les membres de la branche de Rho (14 protéines identifiées chez les mammifères à ce jour) présentent environ 30% d'homologie avec les quatre membres de la branche de Ras, et 50-90% d'homologie entre eux (Zohn *et al.*, 1998). Les principales protéines Rho étudiées sont: Rac1, RhoA et Cdc42.

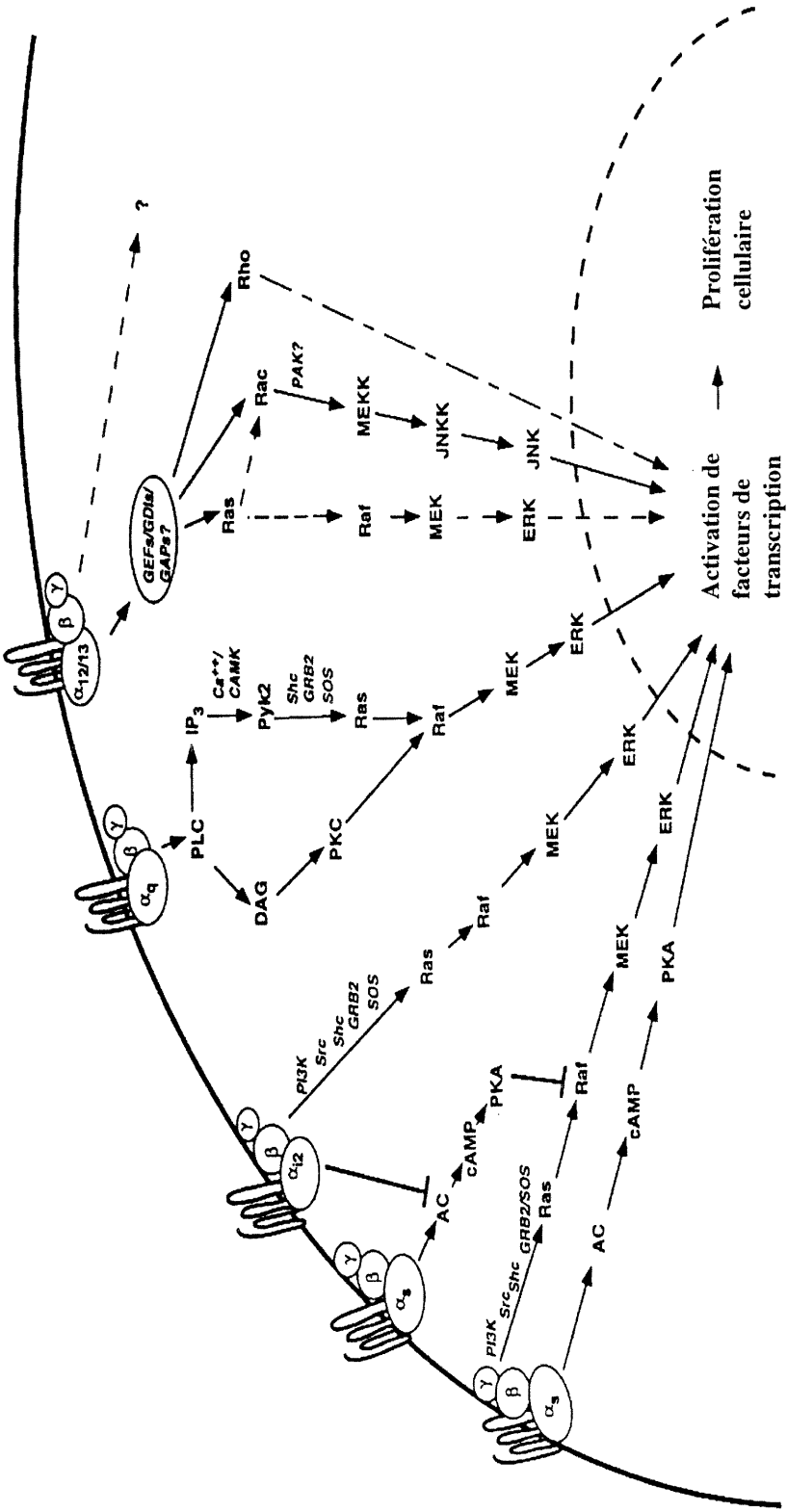


Figure 14 Voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Schématisation des voies de signalisation impliquant les récepteurs couplés aux protéines G et menant à la prolifération des cellules. Les signaux générés par la liaison du ligand à son récepteur activent diverses voies qui dépendent du type de protéine G impliqué. AC: adénylate cyclase; IP₃: inositol 1,4,5 triphosphate; Pyk2: tyrosine kinase riche en proline; PKC: protéine kinase C; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; GEF: guanine nucleotide exchange factor; GDI: guanine nucleotide dissociation inhibitor; GAP: GTPase-activating protein; PAK: p21-activated kinase; ERK: extracellular-signal regulated kinase; MEK: mitogen-activated extracellular-signal regulated kinase kinase; MEK: MEK kinase; JNK: Jun N-terminal kinase; JNKK: JNK kinase. Tiré de: Dhanasekaran *et al.* (1998).

Plusieurs fonctions sont associées aux différentes protéines Rho: organisation du cytosquelette d'actine, régulation de la forme des cellules, de l'adhésion, de la motilité, de l'invasion, des interactions cellule-cellule, de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose. En tant que régulateurs de l'expression génique, les membres de la branche de Rho affectent la cascade de signalisation des MAPK et le facteur de transcription NF- κ B (Zohn *et al.*, 1998).

L'expression de RhoB est induite par l'activation de certaines TK et par des dommages à l'ADN. De plus, RhoA, Rac1 et Cdc42 sont requises pour la progression du cycle cellulaire (Zohn *et al.*, 1998). L'inhibition de Rho empêche l'invasion de certaines cellules. L'activation aberrante de Rac1 ou Cdc42 augmente l'invasion et la motilité des cellules mammaires tumorales (Keely *et al.*, 1997). De plus, plusieurs protéines de la branche de Rho sont des composantes de la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.

3.1.7. Oncogènes

Il existe trois mécanismes pour qu'un proto-oncogène devienne un oncogène: un premier mécanisme est lorsque des mutations surviennent dans la séquence du gène en question; un second mécanisme passe par l'amplification du gène, c'est-à-dire qu'un nombre plus élevé de copies de l'ADN sont disponibles; enfin, un troisième mécanisme décrit la translocation du gène à un autre endroit sur le même chromosome ou sur un autre chromosome, résultant en une expression inadéquate de la protéine ou encore d'une protéine mutante (Lalani *et al.*, 1997). Étant donné le rôle des nombreuses protéines décrites dans le contrôle de la prolifération cellulaire, il semble clair que des anomalies dans les gènes codant pour des FC, récepteurs, kinases, protéines de signalisation et facteurs de transcription peuvent en faire des oncogènes.

Des FC peuvent être identiques à des proto-oncogènes, tels la chaîne β du PDGF (c-Sis) et un FGF (int-2). Plusieurs récepteurs de FC sont aussi considérés comme les homologues cellulaires d'oncogènes viraux. À ce groupe appartiennent

le R-EGF (erbB2/neu), le R-NGF (trk), un des R-FGF (K-sam), le R-HGF (Trp-Met), Ret, Kit, Fms, Ros (Minden et Pawson, 1992; Wilks, 1993; Hunter, 1997). Des récepteurs couplés aux protéines G ont été identifiés en tant qu'oncogènes dans les fibroblastes, tel le récepteur 5HT1b de la sérotonine (Zohn *et al.*, 1998). En fait, ce sont surtout certaines sous-unités des protéines G ($G\alpha$) qui ont un potentiel élevé de transformation. Des TK cytosoliques sont aussi des produits d'oncogènes: Bcr-Abl, Fes/Fps, Fgr, Hck, Lck, Pim, Src, Yes, tout comme deux S/TK, Raf et Mos (Minden et Pawson, 1992).

Un des oncogènes les plus étudiés est Ras, un membre de la famille des protéines G, appartenant à une classe différente de celle des trimères associés aux récepteurs à sept passages transmembranaires décrits précédemment. Ras fait partie des petites protéines G. Ses trois formes oncogéniques (N-Ras, K-Ras, H-Ras) sont fréquemment activées dans différents types de cancer (Minden et Pawson, 1992).

Un autre oncogène fréquemment étudié est Myc. Myc est un facteur de transcription qui forme des homodimères ou des hétérodimères avec les autres membres de sa famille, ce qui permet alors leur liaison à l'ADN (Lalani *et al.*, 1997). *C-Fos* est aussi un oncogène dont l'homologue cellulaire est un facteur de transcription. Fos se dimérise avec Jun pour former le complexe AP-1 qui est responsable de la transcription de nombreux gènes (Karin, 1995).

3.1.8. Gènes suppresseurs de tumeurs

La dénomination gène suppresseur de tumeur vient de l'identification de certains gènes dont la disparition ou l'inactivation est directement liée à la progression du cancer. Les plus étudiés sont: Rb, p53, KAI1, CD44 et, tel que mentionné précédemment, PTEN. Récemment, une nouvelle possibilité de gène suppresseur de tumeurs est apparue lorsque qu'une protéine parente à l'IGFBP1, l'IGFBP-rP1, a été identifiée et que son expression s'est avérée diminuée avec la le développement de l'HBP et du CaP (Sprenger *et al.*, 1999).

Initialement identifiée chez les enfants atteints d'un rétinoblastome, la présence du gène du rétinoblastome (Rb) a depuis été démontrée dans plusieurs types de cancer. La protéine Rb est nucléaire et son degré de phosphorylation joue un rôle important. En effet, l'hypophosphorylation de Rb est requise pour garder les cellules quiescentes (phase G₀), et sa phosphorylation subséquente est nécessaire pour la progression du cycle cellulaire (phases S et G₂) (Squire et Phillips, 1992). L'entrée des cellules dans le cycle cellulaire peut aussi être causée par l'inactivation (mutation) de Rb ou encore sa liaison à des protéines virales (Cooper et Whyte, 1989).

La phosphoprotéine nucléaire p53 contrôle la prolifération des cellules. Lorsque des dommages à l'ADN surviennent, p53 a la capacité d'arrêter le cycle cellulaire en G₁, le temps de réparer les dégâts, ou encore d'induire l'apoptose (Lalani *et al.*, 1997). p53 est d'ailleurs considérée comme étant la gardienne du génome. Des mutations menant à la perte de la fonction normale de p53 sont fréquentes dans plusieurs cancers, bien que ces mutations soient relativement rares dans le CaP (Lalani *et al.*, 1997). Par contre, l'introduction d'une copie intacte de p53 dans diverses lignées cellulaires prostatiques supprime leur prolifération. Ainsi, de nombreuses évidences suggèrent que les mutations de p53 sont des événements qui se produisent tardivement dans la progression du CaP (Isaacs *et al.*, 1994).

Le gène *KAI1* a été identifié dans la prostate de rat à la suite de la découverte de cellules cancéreuses possédant la capacité de former des métastases, propriété perdue lorsque ces cellules sont fusionnées à des cellules cancéreuses ne formant pas de métastases (Dong *et al.*, 1995). Un rôle dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice est fort probable pour cette protéine à quatre passages transmembranaires ainsi que pour les autres membres de sa famille. Ces interactions sont importantes pour l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases. Ainsi, *KAI1* est généralement considérée comme un gène

suppresseur de métastases, d'autant plus que dans les métastases prostatiques examinées, 90% d'entre elles ne montraient que peu ou pas d'expression de KAI1 (Dong *et al.*, 1996).

La protéine CD44 est aussi impliquée dans les interactions cellule-cellule. La perte de son expression dans la prostate est associée à la présence de métastases et un haut grade tumoral (Ruijter *et al.*, 1999). D'autres molécules d'adhésion peuvent être considérées à titre de gènes suppresseurs de tumeurs, notamment dans la prostate. Parmi celles-ci se trouvent la cadhérine-E et la cadhérine-P (Frixen *et al.*, 1991; Jarrard *et al.*, 1997).

Le gène suppresseur de métastases PTEN/MMAC1 possède une activité PTP putative et présente une forte homologie avec la tensine, une molécule retrouvée dans les plaques d'adhésion (Li *et al.*, 1997). PTEN interagit avec Fak dans les plaques d'adhésion. PTEN déphosphoryle Fak et empêche l'invasion, et probablement la prolifération des cellules tumorales, ainsi que la formation de métastases. Ces trois étapes sont principalement médiées par la voie de Ras et ERK (Gu *et al.*, 1998). Dans les fibroblastes, la surexpression de PTEN inhibe la migration des cellules et inversement, son absence générée par des ARNm antisens favorise leur migration (Tamura *et al.*, 1998). Contrairement à p53, les mutations de PTEN dans la prostate sont fréquentes (Ruijter *et al.*, 1999) et PTEN est absente des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques LNCaP et PC-3 (Li *et al.*, 1997), mais exprimée dans la lignée DU 145 (Gustin *et al.*, 2001).

3.2. Apoptose

Dans un tissu normal, la balance entre la prolifération/différenciation des cellules et l'apoptose contrôle l'homéostasie du tissu. Jusqu'à tout récemment, la croyance voulait que le cancer résulte uniquement d'une prolifération incontrôlée ou d'une dérégulation des contrôles de la prolifération. Cependant, à la lumière des récentes découvertes sur les mécanismes d'apoptose, il appert que le cancer est probablement le résultat d'un déséquilibre de l'équilibre normal

prolifération/différenciation – apoptose. De ceci, résulte non pas uniquement une prolifération accrue, mais aussi une diminution de l'apoptose. Les cellules anormales (cancéreuses) échappant au contrôle de détection d'anomalies dans leur ADN peuvent donc voir leur vie prolongée et ainsi survivre au lieu d'être détruites. Puisque les mécanismes d'apoptose interfèrent avec plusieurs molécules de signalisation mentionnées précédemment, il importait d'en souligner ici les éléments-clés. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est caractérisée par des boursofflures de la membrane plasmique, une diminution du volume de la cellule, la condensation du noyau et la fragmentation de l'ADN (Dragovich *et al.*, 1998). Les premiers pas vers la compréhension de l'apoptose ont été faits en étudiant le nématode *C. elegans*. De ces études, trois gènes se sont avérés essentiels pour le développement normal du nématode qui passe par l'apoptose. Les homologues chez les mammifères ont été caractérisés et il s'agit des Caspases (protéases à cystéine, connues aussi sous le nom de « interleukin-1 β converting enzyme » ou ICE), de leur activateur Apaf-1 et de Bcl-2, un facteur anti-apoptose. Trois voies menant à l'apoptose ont été établies (Dragovich *et al.*, 1998). La première voie est activée lorsque les cellules sont privées de FC essentiels. Elle requiert Bcl-2, les autres membres de sa famille, ainsi que les caspases. Le relâchement du cytochrome C est considéré comme un co-facteur dans l'activation des caspases. La seconde voie implique les « récepteurs de la mort » et leurs ligands, le TNF et/ou Fas, et elle mène aussi à l'activation des caspases. Enfin, la troisième voie, moins bien définie, fait suite aux dommages que subit l'ADN et passe probablement par p53. La perte de contact des cellules avec la matrice extracellulaire ou avec une autre cellule induit aussi l'apoptose. Dans ce cas-ci, la terminologie utilisée est anoikis. Deux voies de signalisation ont été proposées pour expliquer l'anoikis. Une première passe par Fak, la PI3-K et Akt, une S/TK impliquée dans les mécanismes anti-apoptotiques (Aoki *et al.*, 1998), alors que la seconde passe par les kinases de stress cellulaire, MEKK et JNK (Frisch et Ruoslahti, 1997). Le rôle précis de l'anoikis est encore peu compris, mais sa dérégulation peut être importante lorsqu'il s'agit d'invasion et de formation de métastases.

Bcl-2, une protéine mitochondriale fait partie d'une famille de protéines qui régulent l'apoptose de façon positive et négative et dont les membres les plus étudiés incluent Bcl-X_L (anti-apoptose) et Bad, Bax, Blk (pro-apoptose). Bcl-2 prévient l'apoptose en se dimérisant avec d'autres membres de sa famille ou avec d'autres protéines non-relées. C'est le ratio, par exemple entre Bcl-2 et Bax qui détermine la sensibilité ou la résistance à l'apoptose (Reed, 1998). Bcl-2 a aussi la capacité de former des pores dans les membranes, entre autres dans celles des mitochondries (Reed, 1998). Les membres de la famille de Bcl-2 possèdent tous des domaines conservés (BH1 à 4) et plusieurs de ces protéines peuvent s'ancrer à la membrane par leur domaine transmembranaire (Reed, 1998). Une des nombreuses voies de signalisation des membres de cette famille menant à l'apoptose fait suite à la liaison de Bad à Bcl-X_L. Ainsi liée, Bcl-X_L ne pourrait empêcher le cytochrome C d'être libéré des mitochondries. Par contre, la S/TK Akt peut phosphoryler Bad et l'empêcher de former des complexes avec Bcl-X_L. Cela aurait pour effet de complexer Bad à la protéine 14-3-3, un activateur de Raf (section 3.1.3.1.) (Dragovich *et al.*, 1998).

Les caspases, au nombre de 14, sont synthétisées en tant que précurseurs inactifs qui doivent être clivés afin que deux sous-unités s'assemblent en une enzyme active (Nunez *et al.*, 1998). De plus, deux caspases doivent s'associer pour former un hétéromère possédant deux sites actifs. Il existe deux catégories de caspases. Une première catégorie rassemble celles qui régulent l'apoptose et qui sont soit activées soit inactivées par clivage enzymatique. Une seconde catégorie regroupe les caspases qui sont des protéines structurales ou de maintien ("housekeeping") et dont le clivage est nécessaire pour que la cellule entre en apoptose (Nunez *et al.*, 1998). Les caspases jouent un rôle central dans l'apoptose et elles sont associées aux divers aspects (boursoufflures, condensation du noyau, *etc.*) caractéristiques de ce phénotype. La protéolyse de Bid, Bcl-2 et Bcl-X_L par des caspases permet la libération du cytochrome C. Une caspase peut aussi activer MEKK-1, permettant alors l'activation de l'apoptose par JNK (Nunez *et al.*,

1998). De même, des caspases sont responsables de la protéolyse de Fak en un fragment semblable à FRNK. Ceci mène au détachement des cellules, engendré par la perte des points de contacts focaux (Gervais *et al.*, 1998; Levkau *et al.*, 1998).

Les récepteurs de la mort forment des trimères auxquels s'associent des protéines accessoires, par le biais de leurs domaines de la mort ("death domain"), FADD ou TRADD, selon le récepteur activé. Les caspases interagissent avec ces dernières. Les récepteurs de la mort sont des récepteurs de cytokines, membres de la famille du TNF (facteur tumoral nécrosant). Ils s'associent subséquemment avec les caspases (Dragovich *et al.*, 1998). Le ligand FasL est un membre de la famille du TNF et, tout comme les autres membres de sa famille, il est synthétisé sous forme de précurseur ancré à la membrane (Nagata, 1997). Les responsables de leur protéolyse sont les métalloprotéinases (Nagata, 1997).

Des inhibiteurs d'apoptose commencent à être caractérisés. Leur rôle est principalement d'inhiber certaines caspases et pro-caspases et de réguler des facteurs de transcription impliqués dans le processus d'apoptose (LaCasse *et al.*, 1998). L'existence de telles protéines a été mise en évidence par les études sur la survivine, qui est absente des tissus différenciés adultes mais qui est présente dans presque toutes les cellules cancéreuses (LaCasse *et al.*, 1998).

Dans la prostate, les cellules sécrétrices meurent par apoptose lors du traitement hormonal visant un blocage complet des androgènes (Bui et Reiter, 1999). La protéine Bcl-2 est présente dans les cellules basales et sa surexpression dans les cellules cancéreuses résistantes aux androgènes favoriserait ainsi leur survie (Colombel *et al.*, 1993). Cependant, un mécanisme de survie indépendant d'Akt peut être induit dans les LNCaP par les androgènes, le sérum ou l'EGF, ce qui suggère l'existence d'une nouvelle voie de signalisation prévenant l'apoptose (Carson *et al.*, 1999).

3.3. Angiogénèse

L'angiogénèse est définie comme étant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux déjà existants. Elle est cruciale pour le développement des tumeurs au-delà de 2 à 3 mm³ (Folkman, 1971). L'angiogénèse apporte ainsi les nutriments et l'oxygène nécessaire à la survie des tumeurs (Gingras et Béliveau, 1997). L'angiogénèse est aussi utile dans les cas d'ischémie où une reperfusion est nécessaire, et bien entendu dans le développement embryonnaire. L'excès d'angiogénèse ou sa dérégulation peut entraîner, en plus de la croissance tumorale, des hémangiomes, du psoriasis, de l'arthrite rhumatoïde et des ulcères intestinaux (Gingras et Béliveau, 1997). Plusieurs évidences relient l'angiogénèse au risque de développer des métastases (Pluda, 1997). Il est possible de définir cinq étapes dans le processus d'angiogénèse: la stimulation des cellules endothéliales par un facteur angiogénique; la pénétration de la membrane basale des vaisseaux existants et la sécrétion d'enzymes qui la dégrade; la migration des cellules endothéliales vers le stimulus; la formation de nouveaux vaisseaux qui résultent de la prolifération des cellules endothéliales; le remodelage du tissu et la formation d'un réseau de capillaires (Gingras et Béliveau, 1997). Cependant, la question-clé concerne le mécanisme qui induit l'angiogénèse. En effet, certaines tumeurs peuvent demeurer longtemps dans un état latent et ne se développer qu'à la suite de l'initiation de l'angiogénèse. Différentes protéines ou facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales ou leurs cellules voisines auraient la capacité d'induire la prolifération et la motilité des cellules endothéliales et la formation des tubules. Parmi ceux-ci se retrouvent le VEGF (FC vasculaire, "vascular endothelial growth factor") et les membres de sa famille, les angiopoïétines, les éphrines et certains autres FC tels le FGF, le TGF β et le TNF (Gingras et Béliveau, 1997; Gale et Yancopoulos, 1999).

3.3.1. Densité des microvaisseaux

La méthode généralement employée pour détecter l'étendue de l'angiogénèse est l'étude de certaines molécules qui sont en principe spécifiques aux cellules endothéliales, comme le VEGF et ses récepteurs, ainsi que le facteur VIII (ou

facteur de von Willdebrand) et l'endogline. Il est possible de compter le nombre de vaisseaux sanguins, à la suite de leur marquage avec un anticorps contre le facteur VIII, dans une surface donnée et ainsi d'établir la densité des microvaisseaux. Dans plusieurs types de cancer, dont celui de la prostate, la densité des microvaisseaux dans la tumeur primaire corrèle avec la présence de métastases, avec la récurrence du cancer, avec la mortalité ou encore avec le stade pathologique (Pluda, 1997).

3.3.2. VEGF et ses récepteurs

Le VEGF (ou VEGF-A) est le prototype d'une famille qui s'élargit encore. À ce jour, cinq VEGF ont été identifiés (VEGF-A à -E) et certains, comme le VEGF-A possèdent plusieurs isoformes qui sont produites par l'épissage alternatif du gène (Zachary, 1998; Achen *et al.*, 1998; Neufeld *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 1999b). Le VEGF doit se dimériser pour être actif (Zachary, 1998). Le FC placentaire, PlGF, fait aussi partie de la famille et comprend deux autres membres, PlGF-1, PlGF-2 (Neufeld *et al.*, 1999). La majorité des études sont réalisées avec le VEGF-A, bien que certaines impliquent le VEGF-C, qui est plutôt associé aux vaisseaux lymphatiques (Valtola *et al.*, 1999; Tsurusaki *et al.*, 1999). Le VEGF est impliqué dans le développement du système cardio-vasculaire. Son importance a été établie chez des embryons de souris ne possédant qu'un seul allèle du gène du VEGF et ne pouvant survivre à l'état embryonnaire. Leur décès a été associé à des défauts majeurs dans le développement des vaisseaux sanguins (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Le VEGF est aussi produit par plusieurs types de cellules et son ARNm augmente dans plusieurs types de cancers: du poumon, de la thyroïde, du sein, de l'intestin, du rein, de la vessie, de l'ovaire, du col de l'utérus, du cerveau (Ferrara et Davis-Smyth, 1997) et de la prostate (Jackson *et al.*, 1997; Ferrer *et al.*, 1997). Dans plusieurs de ces cancers, une corrélation entre l'expression de l'ARNm du VEGF et la vascularisation de la tumeur a été établie (Ferrera et Davis-Smyth, 1997). Le rôle primordial du VEGF a été démontré pour la première fois par le traitement d'animaux avec des anticorps bloquant son action et chez lesquels une inhibition de la croissance de la tumeur a été observée (Kim *et*

al., 1993). Depuis, la nécessité du VEGF et de l'angiogénèse qui en découle, a été démontrée dans une panoplie de tumeurs (Ferrara et Davis-Smyth, 1997; Neufeld *et al.*, 1999).

L'hypoxie cause une augmentation de la production du VEGF dans les tumeurs, mais aussi dans la rétine et dans le poumon (Pluda, 1997; Siemeister *et al.*, 1998). Dans certains types de cellules, les niveaux d'ARNm du VEGF sont influencés par le PDGF, le FGFb et le TGF β (Zachary, 1998).

Dans la prostate humaine, le VEGF a d'abord été localisé dans les cellules NE (Harper *et al.*, 1996). Des études subséquentes l'ont retrouvé à la fois dans le stroma et dans les cellules épithéliales, mais avec un marquage accru dans les cas de CaP (Ferrer *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1997). Récemment, l'expression du VEGF-C a été reliée aux métastases présentes dans les ganglions lymphatiques étant donné sa corrélation avec le développement de vaisseaux lymphatiques (Tsurusaki *et al.*, 1999). Comme c'est le cas d'autres cancers, le développement du CaP (sous forme de microtumeurs chez le rat) peut être inhibé par des anticorps contre le VEGF (Borgström *et al.*, 1998). Dans une autre étude, il a été démontré que les niveaux de VEGF dans le plasma sanguin étaient augmentés en présence de CaP métastatique, permettant ainsi de faire une distinction entre les hommes sains, ceux atteints d'un cancer localisé et ceux possédant des métastases (Duque *et al.*, 1999).

Le mécanisme d'action des VEGF passe, comme c'est le cas de la plupart des FC, par des récepteurs possédant une activité TK intrinsèque. À ce jour, trois de ces récepteurs ont été identifiés: R1-VEGF (Flt-1), R2-VEGF (Flk-1/KDR), et R3-VEGF (Flt-4). Des récepteurs accessoires ont aussi été décrits pour le VEGF, tels la neuropiline et le protéoglycan (Soker *et al.*, 1998; Neufeld *et al.*, 1999).

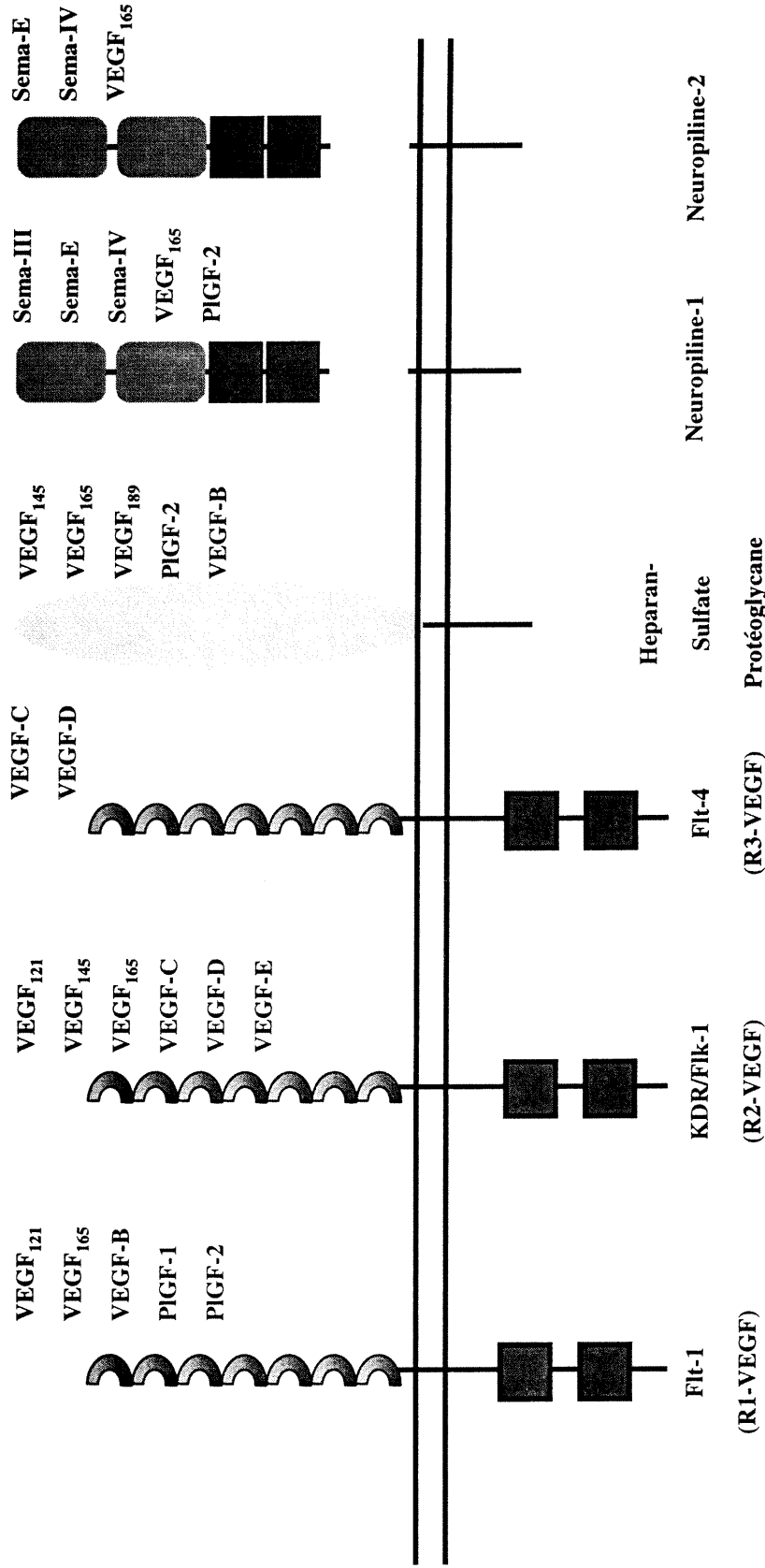


Figure 15 Famille de récepteurs du VEGF

Schématisation des différents récepteurs du VEGF. Ces récepteurs ont des affinités différentes pour les membres de la famille du VEGF. Les ligands indiqués à la droite de chacun des récepteurs sont ceux qui possèdent la plus grande affinité de liaison. Adapté de: Neufeld *et al.* (1999).

Le domaine extracellulaire de Flt-1, Flk-1 et Flt-4 est composé de sept domaines similaires aux immunoglobulines, dont deux sont responsables de la liaison du ligand et un autre est responsable de la dimérisation des récepteurs (Neufeld *et al.*, 1999). Les différents récepteurs ont des affinités différentes pour les divers membres de la famille du VEGF. La figure 15 représente schématiquement les divers R-VEGF et indique leurs ligands respectifs. Selon certaines études, il semble que le signal transmis par Flt-1 et Flk-1 diffère au point de vue des effets produits sur les cellules (Ferrara et Davis-Smyth, 1997) et seul Flk-1 affecterait la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogénèse (Witte *et al.*, 1998). La présence et la fonction de Flt-4 sont associées aux vaisseaux lymphatiques (Kukk *et al.*, 1996).

Les divergences sont aussi démontrées par les études réalisées chez des souris ayant des mutations ou une absence complète des gènes de Flt-1 ou de Flk-1. L'absence des gènes de chacun des trois R-VEGF est létale pour les embryons de souris (Gale et Yancopoulos, 1999). Alors que l'absence de Flt-1 ou de Flt-4 conduit à la malformation des vaisseaux sanguins et à leur organisation déficiente (Fong *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1998), l'absence de Flk-1 empêche la formation des structures nécessaires au développement des vaisseaux sanguins (Shalaby *et al.*, 1995).

L'occupation de Flt-4, tout comme celle de Flk-1 par leur ligand respectif, provoque la phosphorylation sur tyrosine de Fak et de la paxilline (Abedi et Zachary, 1997; Liu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). Erk-1 et Erk-2 sont activées à la suite de la liaison du VEGF à Flk-1, tout comme le sont la PLC γ et la PKC (Zachary, 1998). L'activation des ERK par le VEGF a pour effet d'activer JNK et d'induire la prolifération des cellules endothéliales (Pedram *et al.*, 1998). La présence de JNK est importante puisque la prolifération de ces cellules est inhibée de 75% lorsque la translocation de JNK vers le noyau est empêchée (Pedram *et al.*, 1998). Ces résultats ouvrent aussi la voie à de nouveaux croisements dans les voies de signalisation car jusqu'à présent, JNK était principalement impliquée

dans les réactions des cellules au stress. Il s'agirait des premiers travaux montrant une activation directe de JNK par ERK (Pedram *et al.*, 1998). L'activation d'une MAPK par le VEGF amène des changements au niveau de la réorganisation du cytosquelette des cellules endothéliales, ainsi que dans leur migration (Rousseau *et al.*, 1997). Ces effets ont été démontrés en inhibant particulièrement l'action de cette MAPK. Il est intéressant de mentionner que certaines isoformes du VEGF n'ont pas d'activité mitogénique. En effet, seules les isoformes 121 et 165 sont capables d'activer les récepteurs du VEGF. Cependant, l'urokinase a la capacité de cliver l'isoforme 189 du VEGF, le rendant ainsi apte à lier Flk-1 et induire la prolifération des cellules endothéliales (Plouët *et al.*, 1997).

La présence de formes solubles des récepteurs du VEGF a été révélée dans les cellules endothéliales. Tout récemment, une forme soluble de la neuropiline a été caractérisée dans les cellules PC-3 et les cellules de rat AT2.1, une lignée cellulaire de carcinome prostatique (Gagnon *et al.*, 2000). Ces protéines ont la capacité de bloquer l'activité du VEGF passant par Flt-1 et Flk-1 (Roeckl *et al.*, 1998). En fait, ces formes solubles peuvent lier le VEGF ou ses récepteurs et ainsi empêcher le développement des tumeurs, la formation de métastases et le taux de mortalité. Ceci a été démontré par la transfection de cellules tumorales de fibrosarcome (HT-80) avec la forme soluble de Flt-1 et l'effet de cette transfection sur les tumeurs implantée par xénogreffe chez la souris (Goldman *et al.*, 1998). L'utilisation de ces protéines générées par épissage alternatif pourrait donc être envisagée comme thérapie afin de prévenir les effets du VEGF sur les tumeurs. Des formes solubles de récepteurs TK ont déjà été décrites dans la littérature, notamment pour divers récepteurs des FGF (Hanneken *et al.*, 1994; Wang et Thomas, 1994).

3.3.3. Autres facteurs et leurs récepteurs

D'autres facteurs, dits de croissance, ont aussi un rôle à jouer dans le processus d'angiogénèse. Les effets du FGFb sur la vascularisation des tumeurs *in vivo* ont été démontrés à la fois par son inhibition et par son administration (Hori *et al.*,

1991; Gross *et al.*, 1993). Les angiopoïétines, dont les récepteurs, Tie1 et Tie2, possèdent aussi une activité TK, ont vraisemblablement un mode d'action complémentaire à celui du VEGF. Elles sont plutôt impliquées dans le remodelage, la maturation et la stabilisation des vaisseaux sanguins (Gale et Yancopoulos, 1999). Il est intéressant de noter que l'angiopoïétine 1 a un antagoniste naturel, l'angiopoïétine 2 (Gale et Yancopoulos, 1999). Les éphrines ont la particularité de devoir être associées à la membrane et regroupées afin de pouvoir activer leurs récepteurs à activité TK, les Eph (Davis *et al.*, 1994). Leur fonction exacte ainsi que leur mode d'action sont encore peu connus. Par contre, les éphrines et leurs récepteurs sont impliqués dans le développement du système vasculaire et leur délétion est souvent létale (Gale et Yancopoulos, 1999).

3.4. Motilité et invasion

La capacité d'une cellule tumorale à se mouvoir et/ou à traverser une membrane basale (ou celle des vaisseaux sanguins) est un élément primordial pour la formation de métastases. Étant donné que cette propriété requiert que les cellules, en contact étroit avec d'autres cellules, se détachent, se déplacent et sécrètent des enzymes pour dégrader la membrane qu'elles doivent traverser, cette section résume l'état des connaissances sur les mécanismes régulant l'adhésion cellulaire et les protéines impliquées, notamment les enzymes protéolytiques. De nombreuses études ont établi une corrélation entre la motilité des cellules et la formation de métastases (Banyard et Zetter, 1999). Bloquer la capacité des cellules à se déplacer est devenu un aspect du traitement du cancer de plus en plus exploité du point de vue de la recherche. Dans le cas du CaP, il n'existe présentement aucun moyen de distinguer les cellules possédant une capacité accrue à se déplacer. Il faut se rappeler que les CaP qui progressent et forment des métastases sont souvent la cause des décès, alors que de nombreux hommes subissent une prostatectomie radicale pour un cancer localisé qui ne se développera peut-être pas. Cette chirurgie pourrait possiblement être évitée si des marqueurs étaient disponibles afin d'identifier les tumeurs les plus agressives. Ces

marqueurs pourraient aussi servir de base au développement de traitements plus efficaces.

3.4.1. Adhésion

Les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (ECM) sont des événements primordiaux dans l'embryogénèse et l'homéostasie des tissus. Ces interactions constituent des voies de communications élaborées, bien que partiellement résolues, absolument nécessaires sous peine de voir apparaître des anomalies souvent sérieuses (dystrophie musculaire, maladies auto-immunes, cancer) (Gumbiner, 1996). Les premières molécules responsables de ces interactions sont considérées comme des récepteurs qui permettent l'adhésion inter-cellulaire et cellule-ECM. Il est possible de diviser ces récepteurs en quatre grandes familles: les cadhérines, les protéines homologues aux immunoglobulines, les sélectines et les intégrines (Rosales *et al.*, 1995). La famille des protéines de type immunoglobulines est composée de membres ayant des motifs "immunoglobulin-like" dans leur domaine extracellulaire (N-terminal). Quelques-uns de ces membres sont connus sous le nom de CAM ("cell adhesion molecule"), telles la VCAM, et les ICAM 1 à 3. Cette famille comprend aussi l'antigène carcinoembryonnaire (CEA), la protéine codée par le gène délété dans le cancer du colon ou "deleted in colon carcinoma" (DCC) et même des phosphatases de type transmembranaires (Rosales *et al.*, 1995; Brady-Kalnay et Tonks, 1995). Les CAM sont impliquées dans l'adhésion cellule-cellule. Les sélectines (P, L et E) favorisent les interactions entre cellules de façon calcium-dépendante en reconnaissant des glycans situés sur chacune des cellules (Rosales *et al.*, 1995). Leur ligands ne sont pas encore très bien connus, mais il semble de plus en plus probable que leur cible soient des glycoprotéines (Rosales *et al.*, 1995).

3.4.1.1. Cytosquelette

Les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires sont les principales composantes du cytosquelette qui régulent la forme de la cellule, son mouvement et des signaux intracellulaires (Zohn *et al.*, 1998).

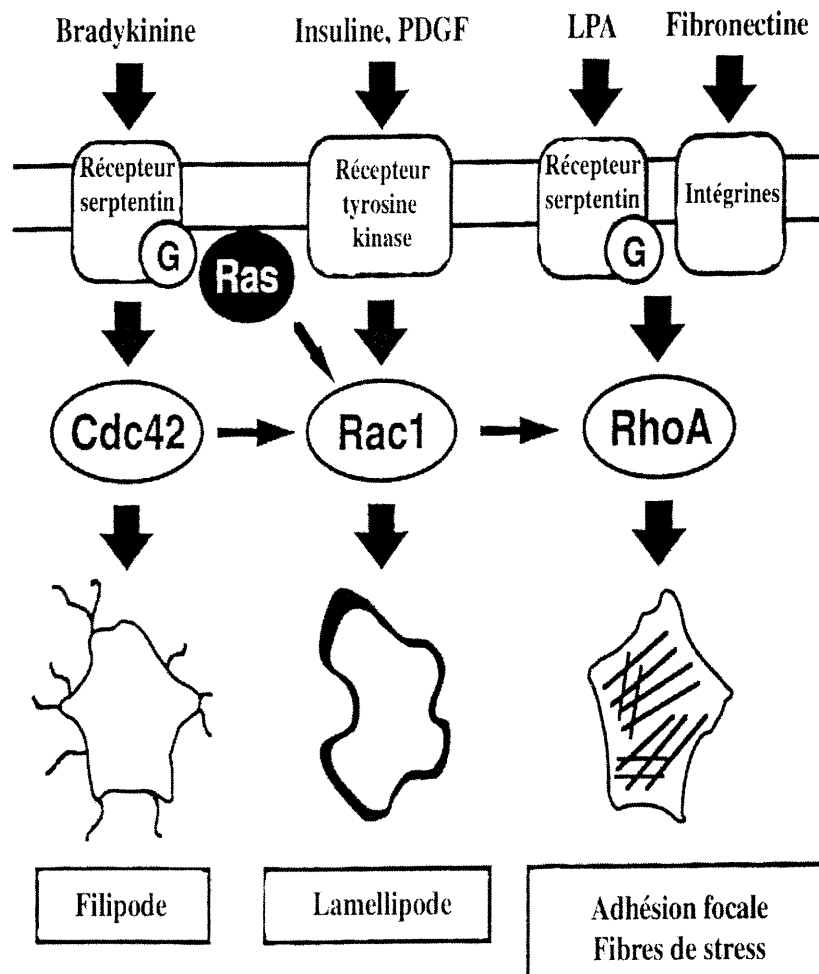


Figure 16 Réorganisation du cytosquelette

Représentation schématique montrant la réorganisation du cytosquelette telle que régulée par les membres de la famille de Rho. Les différentes structures ainsi formées résultent de la liaison d'un facteur de croissance, neuropeptide, lipide ou protéine de la matrice extracellulaire à leur propre récepteur. La cascade de signalisation qui s'ensuit conduit alors à la formation d'une structure distincte (réorganisation de l'actine) qui dépend de la voie activée. LPA: acide lysophosphatidique; G: protéines G. Tiré de: Zohn *et al.* (1998).

Tel qu'illustré à la figure 16, cette structure cytoplasmique en constant changement peut conduire à la formation des lamellipodes, ou prolongements de la cellule formés d'actine qui permettent des ondulations de la membrane (non adhérente au substratum). Par ailleurs, les fibres d'actine ("stress fiber") formant un fagot ("bundle") traversent la cellule et favorisent l'adhésion générée par les protéines de l'ECM au niveau des plaques d'adhésion (Zohn *et al.*, 1998) où se regroupent les intégrines, les fibres d'actine et des protéines telles la paxilline et la taline. Enfin, les filipodes sont des petits prolongements de la cellule, en forme de pied ou de doigt (selon les auteurs), qui contiennent des fagots d'actine. Les filipodes sont impliqués dans la reconnaissance de l'environnement extracellulaire (Nobes et Hall, 1995). Toutes ces structures sont régulées par les protéines Rho (Cdc42/Rac1, RhoA) cytoplasmiques et divers stimuli externes. Les récepteurs couplés aux protéines G (par exemple, le récepteur de la bradykinine) et les récepteurs des FC à activité TK (par exemple, les récepteurs de l'insuline et du PDGF) peuvent activer la formation d'ondulations de la membrane cytoplasmique, de lamellipodes et de filipodes (Zohn *et al.*, 1998).

3.4.1.2. Plaques d'adhésion

Les cadhérines, *via* les caténines, et les intégrines, *via* Fak, agissent aussi au niveau du cytosquelette. Un complexe formé de la fibronectine, des intégrines, de la vinculine, de l'actine et de la tensine est probablement ce qui relie l'actine aux plaques d'adhésion focales (Lo *et al.*, 1994).

3.4.1.3. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire, ou ECM, joue un rôle primordial dans la régulation des cellules, en ce sens qu'à la suite de la liaison des intégrines aux protéines de l'ECM, les transitions G₀ vers G₁, puis G₁ vers S du cycle cellulaire sont activées (Assoian et Zhu, 1997). La plupart des protéines composant l'ECM possèdent une séquence RGD (arginine, glycine, acide aspartique) qui leur permet d'être reconnues par les intégrines (Ruoslahti, 1996). La vitronectine, la fibronectine et le collagène sont les principales protéines de l'ECM.

3.4.1.4. Intégrines (cellule - matrice)

Les intégrines sont des glycoprotéines qui reconnaissent principalement des protéines de l'ECM, donc qui agissent en tant que récepteurs. Les intégrines sont en fait des hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (figure 17A). Les diverses associations possibles entre ces deux types de sous-unités portent maintenant à 22 le nombre d'associations décrites (Dedhar, 1995; Kumar, 1998). Certains de ces dimères peuvent reconnaître plusieurs ligands alors que d'autres n'en reconnaissent qu'un seul. Il semble que la phosphorylation sur résidus tyrosine des intégrines α et β soit un mécanisme régulant leur affinité (Hynes, 1992).

De plus, lorsque des fibroblastes sont ensemencés sur la fibronectine (une protéine de l'ECM), la première molécule à être phosphorylée sur tyrosine est Fak, la kinase d'adhésion focale (Rozengurt, 1995). De plus, Ilk ("integrin-linked kinase") est une sérine/thréonine kinase qui se lierait aux sous-unités β et dont l'activité serait régulée par l'adhésion à la fibronectine. Sa surexpression dans certaines cellules réduirait leur adhésion aux protéines de l'ECM (Hannigan *et al.*, 1996). Le principal rôle d'Ilk serait de prévenir l'anoikis (Attwell *et al.*, 2000).

Les ligands des intégrines sont, en plus des molécules de l'ECM, des peptides contenant la séquence RGD ainsi que des molécules d'adhésion telles la VCAM et les ICAM (Dedhar, 1995). La signalisation par les intégrines (figure 17B) est la voie la plus étudiée en ce qui concerne les molécules d'adhésion. L'activation des intégrines, à la suite de leur liaison avec des protéines de l'ECM provoque leur regroupement (clustering). Il s'ensuit que d'autres protéines se lient au domaine cytoplasmique de la sous-unité β . De nombreuses études rapportent la liaison directe d'intégrines β avec la TK Fak (Hanks et Polte, 1997), bien qu'il ait été proposé que la S/TK Ilk agisse en tant qu'intermédiaire entre les intégrines et les autres protéines de signalisation (Dedhar, 1995; Hannigan *et al.*, 1996).

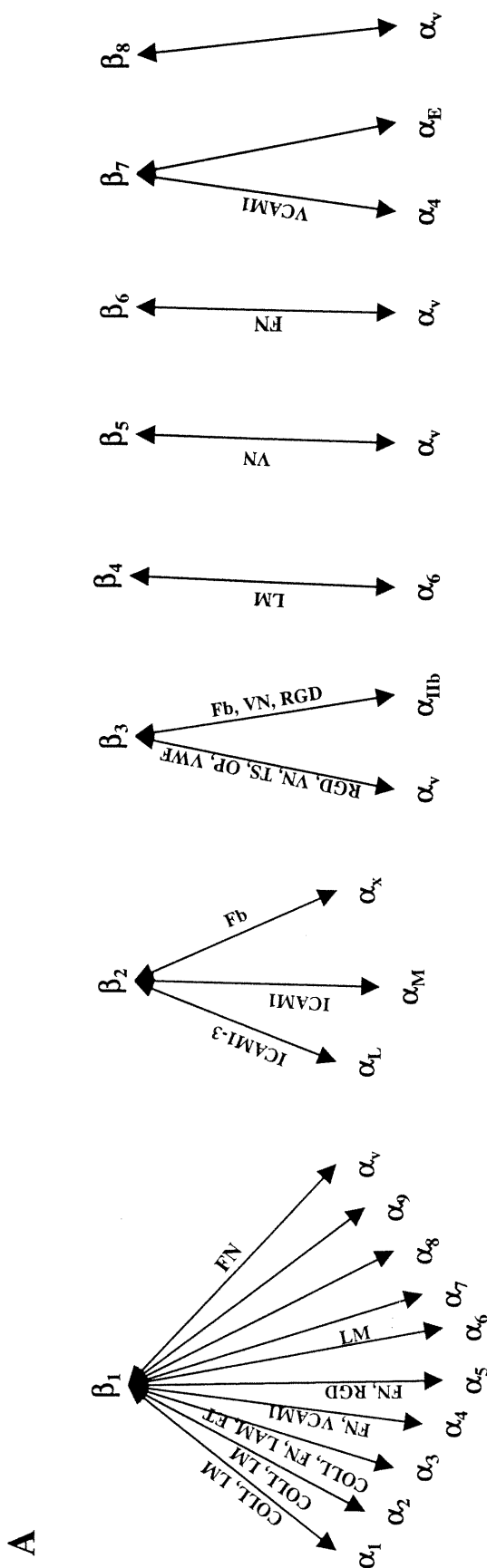


Figure 17 Famille des intégrines et voies de signalisation

A Représentation schématique des différentes intégrines formant des hétérodimères (sous-unités α et β). Les ligands connus des chacune de ces paires d'intégrines sont aussi indiqués. COLL: collagène; ET: entactin; Fb: fibrinogène; FN: fibronectine; ICAM: intracellular cell adhesion molecule; LM: lamine; OP: ostéopontine; RGD: acides aminés arginine, glycine, acide aspartique; TS: thrombospondine; VCAM: vascular cell adhesion molecule; VWB: facteur Von Willebrand. Adapté de: Dedhar (1995) et Kumar (1998).

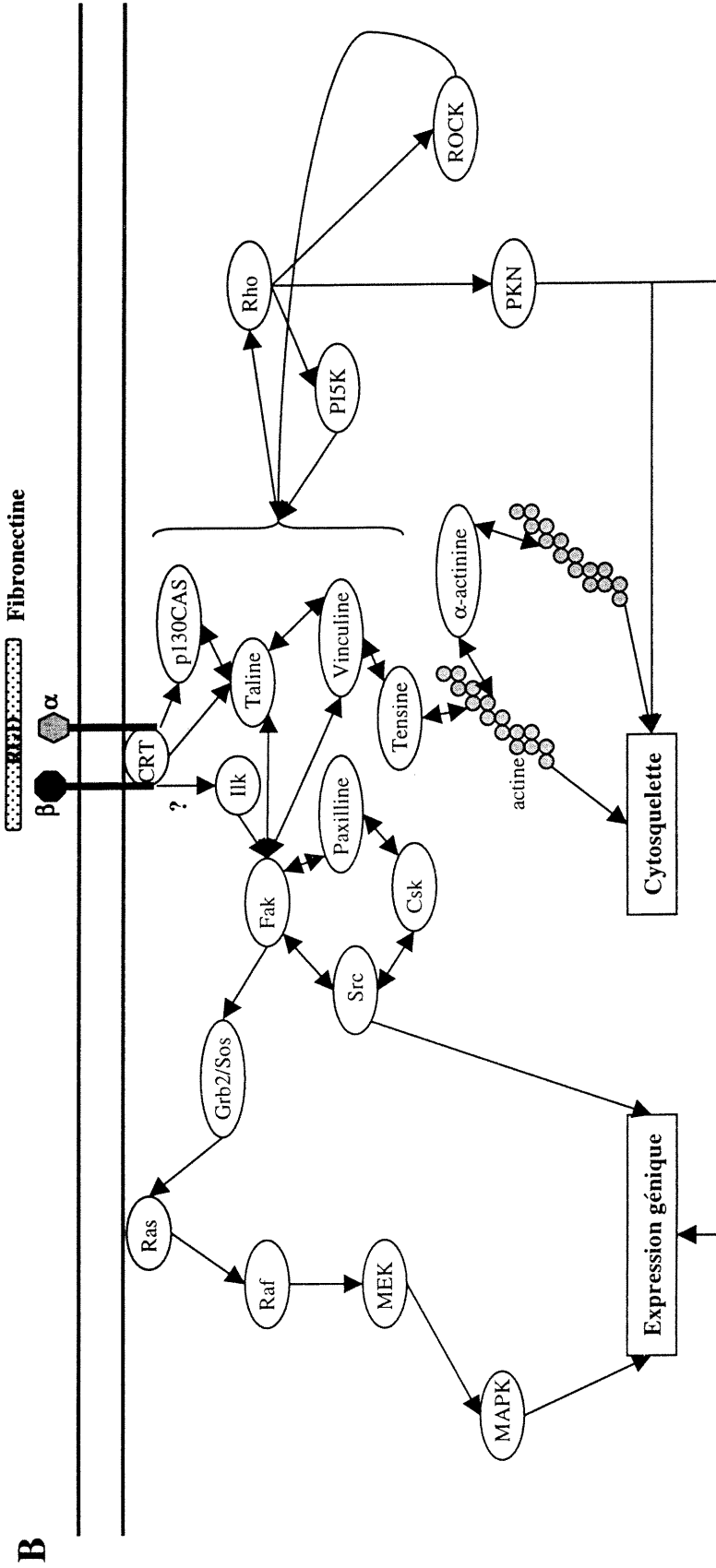


Figure 17 Famille des intégrines et voies de signalisation (suite)
B Représentation schématique des voies de signalisation des intégrines. Suite à la liaison des protéines de l'ECM aux intégrines, il y a formation de plaques d'adhésion (α -actinine, paxilline, vinculine, taline, paxilline, Src, calréticuline [CRT] et le substrat associé aux cadhérines [CAS]) et réorganisation du cytosquelette d'actine. Les voies de Fak et de Rho sont alors activées. Les protéines effectrices de Rho (ROCK et PI5K) peuvent retourner le signal vers le complexe de plaques d'adhésion. Le rôle exact de la TK Ilk demeure encore inconnu. Adapté de: Dedhar et Hannigan (1996); Otey (1996); Schlaepfer et Hunter (1996); Giancotti (1997); Vuori (1998).

Cette kinase serait la première étape entre Fak et les intégrines β menant à l'association de Fak avec les protéines du cytosquelette, avec la protéine adaptatrice Grb2 qui active la voie de Ras, ainsi qu'avec les membres de la famille de Src ou Cas (Dedhar, 1995; Hannigan *et al.*, 1996). Il est postulé qu'Ilk pourrait aussi interagir avec une p70 qui irait alors activer le facteur de transcription NF κ B. De plus, Ilk agirait sur les protéines MEK ou directement sur d'autres facteurs de transcription (Dedhar, 1995). Néanmoins, l'hypothèse la plus considérée présentement est celle où les intégrines se lient directement à Fak ou à des protéines du cytosquelette (taline ou vinculine) qui peuvent s'associer avec des filaments d'actine, avec l' α -actinine, la paxilline et la tensine (Clark et Brugge, 1995). Il semble aussi que les intégrines puissent se lier à certains membres de la famille de Src (notamment Src, Fyn et Syk), à la cortactine, à un récepteur du FGF (Flg), à l'EGF-héparine, à la calréticuline (impliquée dans la voie de signalisation du calcium), à la PTP-1D, ainsi qu'à de nombreuses autres molécules intermédiaires (Yamada et Miyamoto, 1995). De plus, les intégrines interagissent avec p21Rho, un membre de la famille des petites protéines G, afin d'amener des changements au niveau du cytosquelette (Clark et Brugge, 1995). La nécessité des membres de la famille de Src pour la transmission du signal généré par les intégrines a été établie en utilisant des cellules déficientes de certains membres de la famille de Src, soient Src, Yes et Fyn (Klinghoffer *et al.*, 1999). Les intégrines sont aussi impliquées dans l'activation du TGF β 1 (Munger *et al.*, 1999), l'angiogénèse (Friedlander *et al.*, 1995; Eliceiri *et al.*, 1998) et la prévention de l'apoptose (Brassard *et al.*, 1999; Perks *et al.*, 1999).

Dans les lignées cellulaires cancéreuses de la prostate, l'expression des intégrines a été mesurée par analyse de fluorescence (FACS) et par migration électrophorétique. Les points à souligner sont que les LNCaP expriment bien certaines sous-unités α des intégrines, mais celles-ci présentent probablement des anomalies telles que mises en évidence par leur migration électrophorétique (Witkowski *et al.*, 1993). Ceci est appuyé par d'autres expériences démontrant que l'adhésion des LNCaP à la vitronectine est fortement augmentée à la suite de

leur transfection avec β_3 (Zheng *et al.*, 1999). De plus, les LNCaP n'expriment pas le couple d'intégrines $\alpha_6\beta_4$, spécifique à la laminine (Rokhlin et Cohen, 1995). Enfin, il semble que la perte d'expression de l'intégrine α_4 soit parallèle à la progression du CaP, telle que démontré par les caractéristiques des différentes lignées cellulaires prostatiques humaines (Haywood-Reid *et al.*, 1997). Dans la troisième étude, aucun résultat avec la lignée LNCaP n'est montré étant donné que les auteurs n'arrivaient pas à obtenir une préparation de cellules individuelles (Haywood-Reid *et al.*, 1997). Ceci est peut-être causé par l'expression de la cadhérine-E par ces cellules, favorisant ainsi de plus fortes interactions cellule-cellule.

3.4.1.5. Cadhérines (cellule - cellule)

Les cadhérines sont des glycoprotéines membranaires, dépendantes du calcium, impliquées dans l'adhésion homotypique entre cellules. On peut les diviser en trois groupes: les cadhérines typiques, les cadhérines non-typiques et enfin, les proto-cadhérines (Blaschuk *et al.*, 1995). La cadhérine la plus étudiée est la cadhérine-E, retrouvée dans les cellules d'origine épithéliale. Les cadhérines contiennent un domaine extracellulaire, une région transmembranaire, ainsi que deux domaines cytoplasmiques. Leur domaine extracellulaire est divisé en cinq régions à peu près identiques. La première région est celle qui est responsable des interactions avec les autres cadhérines situées sur d'autres cellules. Ces interactions forment une jonction étroite entre les cellules. Il a été démontré par cristallographie que les cadhérines de deux cellules se rejoignent, par leur premier domaine extracellulaire, en un étroit ruban semblable à une fermeture éclair (Gumbiner, 1996). Les cadhérines sont associées, par leur domaine cytoplasmique, à un complexe trimérique composé des caténines α , β et γ . Les caténines relient les cadhérines à l'actine, principalement par la caténine α (Gumbiner, 1995). La caténine β est un substrat de différentes TK et elle peut aussi interagir avec le récepteur de l'EGF (Hoschuetzky *et al.*, 1994; Gumbiner, 1995).

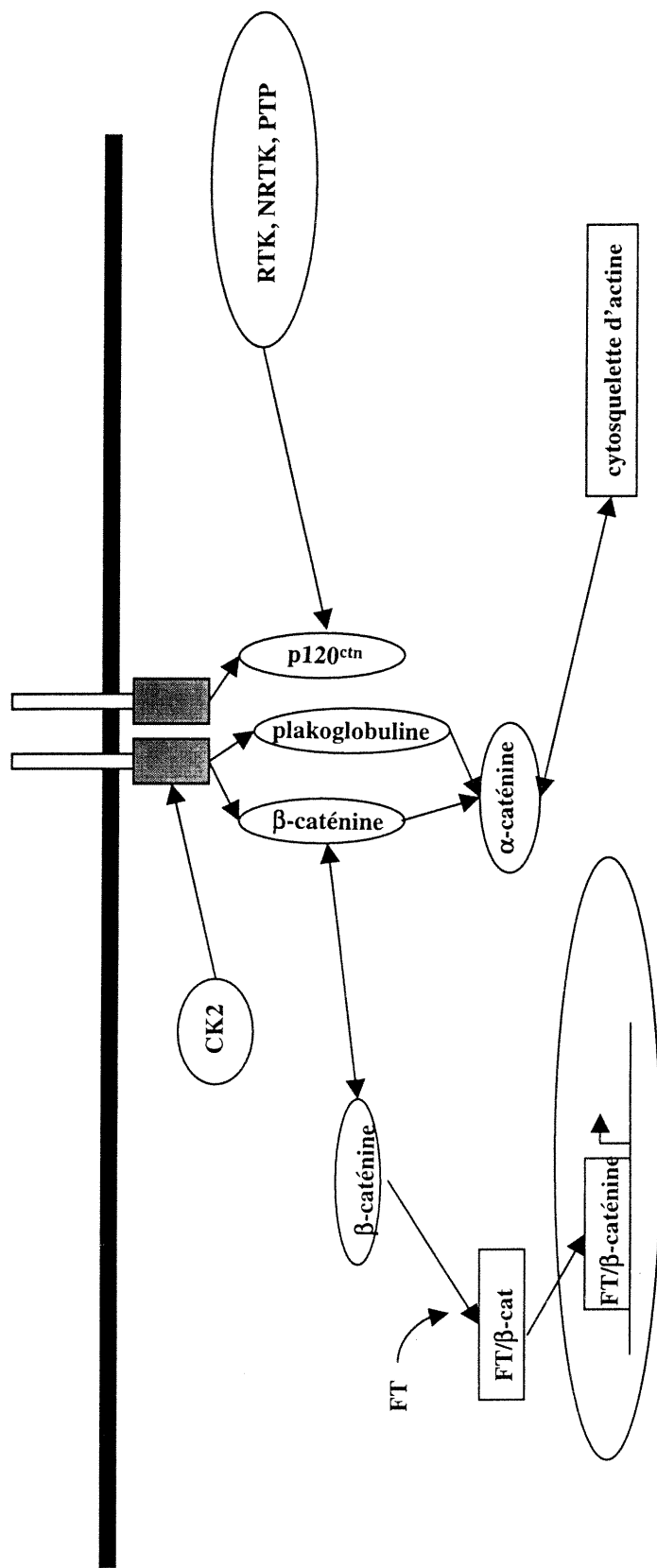


Figure 18 Voie de signalisation des cadhérines

Représentation schématique des voies de signalisation des cadhérines. Les caténines (α -caténine, β -caténine, plakoglobuline et $p120^{ctn}$) se lient aux cadhérines. La β -caténine et la plakoglobuline ne semblent pas pouvoir se lier en même temps aux cadhérines. La β -caténine non-liée peut aussi s'associer avec un facteur de transcription et activer les gènes-cibles. Les caténines liées aux cadhérines sont la cible de tyrosine kinases et de tyrosine phosphatases. RTK: récepteur tyrosine kinase; NRTK: tyrosine kinase de type non-récepteur (Fer, Src, etc.); PTP: phosphotyrosine phosphatase; b-cat: β -caténine; FT: facteur de transcription; CK2: caséine kinase II. Adapté de: Daniel et Reynolds (1997) et Pötter *et al.* (1999).

La signalisation par les cadhérines peut être illustrée par le cas de la cadhérine-E (figure 18), interagissant avec une autre cadhérine-E située sur une cellule voisine. À l'intérieur de la cellule, les caténines α , β et γ (plakoglobuline) s'associent entre elles et à la portion cytoplasmique de la cadhérine-E. D'autres protéines, telle la p120Cas et la TK Fer, viennent se lier au complexe, qui peut aussi lier l'actine (Gumbiner, 1995). De plus, la caténine β a la capacité de se lier au produit du gène suppresseur de tumeur APC ("adenomatous polyposis coli"), celui-ci compétitionnant avec la cadhérine-E pour la liaison à la caténine β (Rubinfeld *et al.*, 1993; Hulsken *et al.*, 1994). Il est important de mentionner que le complexe cadhérine-caténine doit être déphosphorylé afin de faciliter les interactions cellule-cellule (Brady-Kalnay et Tonks, 1995). Par ailleurs, la déphosphorylation est probablement régulée par la phosphatase PTP μ dans les cellules normales (Brady-Kalnay et Tonks, 1995). La phosphorylation du complexe cadhérine-caténine amène une perte de contact entre les cellules. Cette phosphorylation peut aussi contribuer à la transformation des cellules et à la formation de métastases (Brady-Kalnay et Tonks, 1995). Il est à noter que de nombreuses tumeurs montrent une perte d'expression de la cadhérine-E. Il existerait une corrélation inverse entre la présence ou l'absence de cadhérine-E dans la tumeur et un pronostic favorable ou défavorable, respectivement (Pötter *et al.*, 1999).

Il est ainsi possible de classer la cadhérine-E parmi les gènes suppresseurs de tumeur (Frixen *et al.*, 1991). C'est notamment le cas dans la prostate où la perte d'expression de cette cadhérine a été démontrée dans les lignées cellulaires (agressives vs non-agressives) et dans la prostate humaine en fonction du degré de différenciation des cellules tumorales (Rokhlin et Cohen, 1995; Murant *et al.*, 1997). La cadhérine-P, un marqueur spécifique aux cellules basales, est aussi perdue dans le CaP (Jarrard *et al.*, 1997), tout comme la caténine- α (Murant *et al.*, 1997).

3.4.2. Enzymes

Les principales enzymes impliquées dans le mouvement des cellules sont les métalloprotéinases et l'urokinase.

3.4.2.1. Métalloprotéinases

Il existe environ seize métalloprotéinases (MMP), aussi nommées matrixines (Nagase, 1997). Leur inhibiteur est l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases, le TIMP. Les MMP sont synthétisées sous forme de pré-pro-enzymes et leurs substrats sont généralement les protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, gélatines, élastine, fibronectine, laminine, vitronectine, *etc.*), ainsi que des facteurs impliqués dans la formation et le maintien du stroma tumoral (Basset *et al.*, 1997). La capacité des cellules à envahir la matrice extracellulaire résulterait de l'équilibre entre l'expression respective des MMP et des TIMP (Denhardt *et al.*, 1993), tel que reflété par le potentiel invasif de différents types de cancer (Wood *et al.*, 1997). L'activation des MMP, favorisée par l'interaction d'un ion zinc avec l'eau dans leur site catalytique, se produit par clivage protéolytique qu'elles engendrent, par le biais des membres de leur famille ou par d'autres protéases (Nagase, 1997). En raison de leur action au niveau de la dégradation de l'ECM, ces enzymes jouent des rôles importants dans les processus d'invasion et de formation de métastases, mais aussi dans l'arthrite et l'athérosclérose, en plus d'être impliquées dans l'angiogénèse, le développement embryonnaire et la morphogénèse, pour ne nommer que ceux-ci.

En ce qui concerne le CaP, les niveaux d'expression des MMP-1, -2, -3 et -9, ainsi que des TIMP-1 et -2, ont été mesurés, soit par hybridation *in situ* sur le tissu prostatique, ou par ÉLISA dans le sérum ou le plasma (Jung *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1997; Gohji *et al.*, 1998). Dans tous les cas, l'expression accrue de MMP va de pair avec la progression vers un stade avancé du cancer. Des résultats similaires ont été observés pour les TIMP, bien que les TIMP et les MMP semblent être des marqueurs indépendants (Jung *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1997). La dégradation de l'IGFBP-3, et la libération d'IGF qui s'ensuit, est associée à la

sécrétion de MMP-9 et à son activité protéolytique dans les cellules prostatiques DU145 (Manes *et al.*, 1999).

3.4.2.2. Urokinase

Comme son nom l'indique, l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) clive le plasminogène en plasmine active. L'uPA est une protéase à sérine aussi impliquée dans l'adhésion et la migration de plusieurs types de cellules (Tang *et al.*, 1998), ainsi que dans la fibrinolyse et la formation de métastases (Rabbani *et al.*, 1992). Le récepteur de l'uPA est une protéine de surface ancrée à la membrane par un groupement GPI (glycosyl-phosphatidyl inositol) et dont la signalisation dans les cellules endothéliales conduit à l'activation et la phosphorylation de Fak et des MAPK, influençant leur motilité (Tang *et al.*, 1998). Ces résultats concordent avec ceux d'autres groupes qui ont démontré, entre autre dans la prostate, que la sécrétion de l'urokinase et la présence de son récepteur sont reliés à l'angiogénèse (Evans *et al.*, 1997), à l'invasion (Hoosein *et al.*, 1991), ainsi qu'à la prolifération des cellules tumorales (Evans *et al.*, 1997). Cependant, il semble que la présence d'uPA dans les lignées cellulaires de CaP soit nécessaire mais pas suffisante au processus d'invasion (Jarrard *et al.*, 1995).

L'uPA, en plus de son domaine catalytique contient un domaine non-catalytique qui peut être sous-divisé en deux autres domaines: GFD (similaire aux FC) et Kringle (domaine replié et possédant trois ponts disulfure) (Rabbani *et al.*, 1992). La liaison de l'uPA à son récepteur se fait par son domaine GFD qui est, par ailleurs, relativement similaire à l'EGF. Les cellules PC-3 libèrent dans leur milieu conditionné un FC identique à un fragment dérivé du domaine GFD de l'uPA qui active la prolifération d'une lignée ostéoblastique, suggérant un nouveau rôle pour ce domaine (Rabbani *et al.*, 1992).

L'urokinase est inhibée par PAI-1 (inhibiteur d'activateur du plasminogène de type-1) qui est aussi une protéase à sérine (Chapman, 1997). Cet inhibiteur, PAI-1, est sensible à la chaleur et il est régulé par sa liaison avec d'autres protéines,

dont la principale est la vitronectine (Podor *et al.*, 1992). La vitronectine se lie aussi au récepteur de l'uPA (Wei *et al.*, 1994).

4. Hypothèses et but

L'état actuel des connaissances sur les mécanismes impliqués dans le développement et la progression des pathologies prolifératives prostatiques laisse encore énormément d'interrogations et par le fait même, de vastes possibilités de recherche.

Voici un court résumé des faits présentés dans les pages précédentes qui permet de poser les hypothèses à la base de mes travaux et les buts ainsi visés.

Bien que le CaP soit le cancer le plus fréquemment diagnostiqué (premier en incidence), il est présentement pratiquement impossible de le guérir si les cellules ont déjà migré hors de la prostate. Les traitements actuellement appliqués permettent de diminuer les douleurs et symptômes associés au CaP, ainsi que d'améliorer les conditions de vie des hommes qui en sont atteints. Il est aussi possible de parler de rémission, qui peut durer de quelques mois à plusieurs années. Les causes exactes du développement de l'HBP, du PIN et du CaP ne sont pas encore élucidées. Les androgènes, importants pour le développement de la prostate et le maintien de ses fonctions, ont un rôle encore incertain dans le développement des pathologies prolifératives de la prostate. Par ailleurs, il est clairement démontré que si les cellules cancéreuses répondent aux androgènes au début de la maladie, elles deviennent ensuite hormono-indépendantes. L'hypothèse retenue pour cette thèse, et de plus en plus acceptée dans la communauté scientifique, est que la prostate est composée d'une population hétérogène (en ce qui a trait à la dépendance/indépendance vis-à-vis les androgènes) de cellules épithéliales. Le traitement hormonal a des effets bénéfiques dans un premier temps, mais il permet ensuite aux cellules hormono-indépendantes de survivre et de proliférer en absence d'androgènes. Les

mécanismes menant à la progression du CaP impliquent probablement la perte de gènes suppresseurs de tumeurs, l'activation d'oncogènes et de voies de signalisation menant à la prolifération des cellules, *via* les facteurs de croissance. L'apport de FC des cellules voisines, ou même des cellules immunitaires qui se trouvent dans la prostate (défense immunitaire), contribue aussi à l'activation continue ou accrue des voies de signalisation menant à la prolifération, l'adhésion et la motilité des cellules cancéreuses. Des mécanismes associés, tel l'angiogénèse, l'adhésion des cellules, leur motilité et la formation de métastases viennent aussi s'ajouter à cet ensemble complexe et séquentiel d'événements menant à l'évolution du CaP. Comme c'est le cas pour de nombreux cancers, le déséquilibre dans l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose est un facteur important dans le développement du cancer de la prostate.

Le but de cette thèse, est donc de comprendre l'implication des facteurs de croissance dans la régulation des fonctions des cellules épithéliales prostatiques. Selon l'hypothèse mise en évidence par le laboratoire d'accueil, les cellules basales sont les cellules souches qui donnent naissance aux autres types de cellules épithéliales (sécrétrices et neuroendocrines) retrouvées dans la prostate. Ces cellules sont les seules qui prolifèrent activement, tel que reflété par les tests de prolifération *in vitro* et par le marquage à l'aide d'anticorps reconnaissant la phosphotyrosine (signe de transmission d'un signal par la voie des facteurs de croissance) sur des coupes de tissu prostatique.

Les recherches au laboratoire d'accueil avaient déjà mis en évidence le rôle primordial d'un facteur de croissance isolé du sérum (PGF) ainsi que la présence d'activité tyrosine kinase dans les cellules basales (prostate normale) ou tumorales (prostates cancéreuses). L'objectif premier des travaux présentés ici était de caractériser davantage le PGF, principalement de source humaine puisque la majorité des travaux effectués antérieurement portaient sur le PGF canin. La mise en évidence de TK associées à l'activité biologique du PGF dans le contexte de la présence d'un récepteur membranaire était le second objectif. Enfin,

l'identification de kinases, telles Fak et Flt-1, a permis de mieux comprendre le rôle des produits de sécrétion des cellules NE, dont la bombésine/GRP et le VEGF, au niveau des fonctions des cellules tumorales.

Matériels et méthodes

Les méthodes utilisées sont regroupées selon six sections: étapes de purification partielle du PGF (prostatic growth factor); culture cellulaire; évaluation de la réponse des cellules; électrophorèses; clonage par PCR; analyses statistiques. Il est à noter que l'ordre de présentation des méthodes est indépendant de leur ordre de réalisation et ne sert qu'à en faciliter la compréhension.

1. Étapes de purification partielle du PGF

Toutes les étapes suivantes sont réalisées à partir de sérum humain ou canin.

1.1. Obtention des sérums canins et humains

Le sang est prélevé des chiens adultes sacrifiés pour isoler les cellules de la prostate. Il est centrifugé à 10 000g pendant 20 min pour obtenir le sérum qui est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Quant au matériel humain, les sérums sont obtenus au département de biochimie clinique de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les sérums d'hommes âgés de plus de 51 ans considérés comme "normaux", ou sans pathologie prostatique, sont ceux pour lesquels un test de la fonction thyroïdienne (TSH), et non d'APS, avait été demandé et dont le résultat s'est avéré normal. D'autre part, les "patients APS+" sont ceux pour lesquels un test d'APS avait été demandé. Les études présentées ici sont réalisées avec des sérums humains regroupés selon l'âge des donneurs ou selon leur niveau d'APS. Tous les sérums humains sont décomplémentés en les chauffant à 56°C pendant 30 min, afin de réduire les réactions immunitaires du système du complément lorsque les sérums humains sont mis en présence des cellules canines en culture.

1.2. Acidification, extraction des peptides et délipidation

Différents sérums (humains ou canins) sont regroupés et filtrés sur papier Whatman. Le volume final est mesuré, puis le sérum est acidifié par l'ajout de 7

volumes de 0,1% acide trifluoroacétique (TFA) goutte-à-goutte sur une période de 18h, à 4°C. Le tout est agité pendant deux jours supplémentaires, toujours à 4°C. La suspension obtenue est mise dans un bain à ultrasons, permettant d'enlever les gaz et de minimiser la formation d'agrégats ou de précipités. Elle est ensuite chromatographiée sur des cartouches Sep-Pak C-18 (Waters), préalablement nettoyées avec 80% d'acétonitrile (ACN) /0,1% TFA, puis équilibrées avec une solution de 0,1% TFA. À la suite de l'élution du matériel hydrophile et le lavage des cartouches avec du TFA, le matériel hydrophobe et de nature peptidique est élué avec de l'ACN 80%/0,1% TFA. La congélation, à -20°C, des échantillons élués permet d'obtenir des phases aqueuses et organiques. Seule la phase aqueuse, contenant la fraction active, est recueillie. Elle est ensuite soumise à une étape de délipidation proprement dite, qui consiste à extraire les lipides avec un mélange de n-butanol et d'éther isopropylique (85:15), laquelle est répétée deux fois. La phase aqueuse est à nouveau chromatographiée sur une cartouche Sep-Pak C-18, mais cette fois, l'élution du matériel retenu se fait par gradient successif d'acétonitrile dans le TFA 0,1% (0%, 20%, 50%, 80%). Le matériel élué entre 50% et 80% d'acétonitrile/0,1% TFA est lyophilisé et soumis à une chromatographie sur tamis moléculaire.

1.3. Filtration sur tamis moléculaire

Cette section décrit les différentes colonnes et résines utilisées pour filtrer les échantillons sur tamis moléculaire. Ces résines permettent de séparer les composantes de l'échantillon selon leur poids moléculaire apparent. Différentes fractions sont recueillies tout au long de l'élution des échantillons. Dans tous les cas, l'absorbance des fractions recueillies est mesurée à 235 nm avec un spectrophotomètre; le tampon d'élution servant de blanc. Dans la plupart des cas, les fractions recueillies sont lyophilisées et une partie (ou la totalité) de leur contenu est testée sur les cellules prostatiques canines en cultures.

1.3.1. Bio-Gel P-30

La fraction du sérum de chien passée sur C-18 et éluée entre 50% et 80% d'acétonitrile/TFA 0,1% est resuspendue dans l'acide acétique 0,01M et séparée sur une colonne de Bio-Gel P-30 (Bio-Rad, dimension: 2,6 x 70 cm, $V_t = 356$ mL, résolution: 2500 à 40 000 Da) équilibrée dans l'acide acétique 0,01M. Chaque fraction recueillie est testée sur les cultures primaires de cellules épithéliales de prostates canines. Deux zones sont récupérées: une première, correspondant à un poids moléculaire apparent d'environ 1,5 kDa, et une seconde, sortant au volume total de la colonne. Cette dernière, plus active et plus pure (contient moins de peptides), sera utilisée subséquentement.

1.3.2. Bio-Gel P-4

Alternativement, les sérums humains et quelques sérums canins, servant de contrôle, sont séparés sur une colonne P-4 (Bio-Rad, dimension: 1,5 x 100 cm, $V_t = 163$ mL, résolution: 800 à 4 000 Da), équilibrée dans l'acide acétique 0,01M.

1.3.3. Bio-Gel P-2

L'équivalent de 20mL de sérum canin ultrafiltré sur PM-30 (voir méthode suivante) et lyophilisé est dissout dans de l'acide acétique 1mM et chromatographié sur une colonne de Bio-Gel P-2 (Bio-Rad, dimension: 1,5 x 75 cm, $V_t = 129$ mL, résolution: 100 à 1 800 Da), équilibrée dans l'acide acétique 1mM.

1.4. Ultrafiltration des sérums (humains et canins)

Le sérum décongelé et décomplémenté est ultrafiltré sur une membrane PM-30 (de porosité de 30 kDa) dans une cellule Amicon sous pression d'azote. Le concentré ($C > 30$; composés de plus de 30 kDa), est lavé à deux reprises avec de l'eau. Par la suite, il est lyophilisé et reconstitué au volume original de sérum. Les ultrafiltrats recueillis ($U < 30$; composés de moins de 30 kDa) sont regroupés et lyophilisés.

1.5. Hydrolyse acide

De l'U<30 de sérum canin est lyophilisé, puis repris dans de l'HCl 6N dans des tubes à hydrolyse en verre. La réaction d'hydrolyse a lieu en chauffant l'échantillon à 110°C sous vide pendant 16h. L'échantillon contrôle est aussi repris dans l'HCl 6N, mais est conservé à 4°C pendant 16h. L'HCl est ensuite évaporé sous un jet d'azote, puis les échantillons sont repris dans du milieu de culture et leur activité biologique est testée sur les cultures primaires de cellules épithéliales prostatiques canines.

2. Culture cellulaire

Cette section regroupe les diverses méthodes de culture des cellules (selon qu'elles soient primaires ou de lignées cellulaires) ainsi que toutes les méthodes reliées au traitement des cellules (préparation de matrice extracellulaire, traitement des cellules, extraction des protéines cellulaires, préparation d'extraits membranaires, marquage métabolique et finalement le dosage des protéines et peptides).

2.1. Isolation des cellules épithéliales de prostates canines

Les prostates sont prélevées lors du sacrifice de chiens mâles adultes de diverses races. Après avoir enlevé le tissu adipeux, la capsule et l'urètre, les prostates sont émincées et les cellules dissociées par des traitements successifs à la Collagénase (Gibco) à 37°C, tel que déjà établi (Chevalier *et al.*, 1984). Les cellules ainsi obtenues sont centrifugées à faible vitesse (800g) pour en retirer les débris. À ce moment (et au besoin), les cellules épithéliales peuvent être obtenues par centrifugation dans un gradient de Percoll de 27,5% (Pharmacia), afin de séparer les cellules basales (densité: 1,05-1,06 g/mL) des cellules sécrétrices (densité: 1,02-1,03 g/mL) et des érythrocytes (densité: > 1,08 g/mL) (Chevalier *et al.*, 1980). La centrifugation a lieu à 20 000g pendant 30 min, à 4°C. Les cellules basales sont alors récoltées et nommées cellules au repos (J0). De façon générale, les cellules sont plutôt directement mises en culture sans l'étape du gradient de

Percoll. Cette étape est régulièrement éliminée puisqu'il a déjà été démontré que se sont les cellules basales plutôt que les cellules sécrétrices qui adhèrent et composent initialement la monocouche de cellules (Chevalier *et al.*, 1981). L'étape d'adhésion et d'étalement de ces cellules est sous le contrôle de la vitronectine sérique, une protéine de la matrice extracellulaire contenue dans le sérum de veau foetal dialysé (Chevalier et Chapdelaine, 1991).

2.2. Culture primaire de cellules épithéliales canines

Les cellules sont ensemencées sur des pétris NUNC dans du milieu minimum essentiel (MEM) additionné de 10% de sérum de veau foetal dialysé (SVFd) et de 1% d'une solution d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine) et d'antifongique (Fungizone) (PSF), tous provenant de chez Gibco. Les cellules sont d'abord cultivées pendant 3 jours à 37°C sous 5% CO₂ afin de permettre l'adhésion sélective (contrôlée par la vitronectine) des cellules épithéliales basales (Chevalier et Chapdelaine, 1991). Le milieu est alors remplacé pour du MEM-PSF, additionné de 10% de sérum de chien ou de l'échantillon à tester (dans du milieu sans sérum) et la culture est poursuivie pour le temps indiqué, habituellement de 5 à 7 jours supplémentaires.

2.3. Culture de lignées cellulaires

Les différentes lignées cellulaires prostatiques (provenant de l'American Type Culture Collection) sont cultivées dans du RPMI 1640 (Gibco), additionné de 5% de sérum foetal bovin (FBS; Gibco) et de 1% PSF, à 37°C sous 5% CO₂. De façon générale, les cellules sont utilisées lorsque les feuillets atteignent 70-80% de confluence. Les cellules HMEC (cellules endothéliales des microvaisseaux humains) proviennent du Dr Anie Philip de l'hôpital général de Montréal. Elles sont cultivées dans du milieu MCDB (milieu Ham F12K contenant 0,1 mg/mL héparine, 0,03 mg/mL supplément pour la croissance des cellules endothéliales (ECGS)) auquel sont ajoutés 10ng/mL EGF, 1µg/mL hydrocortisone, 10% FBS et 1X glutamine.

2.4. Préparation de matrice extracellulaire naturelle

Les cellules prostatiques en culture synthétisent de la matrice extracellulaire naturelle qu'elles déposent au fond du pétri (Chevalier et Chapdelaine, 1991). Pour obtenir de l'ECM (matrice extracellulaire naturelle) à partir des cellules PC-3 ou LNCaP, celles-ci sont cultivées à confluence dans des pétris de 100mm X 25mm. Les feuillets sont rincés avec du PBS (phosphate-buffered saline: 150mM NaCl et 50mM NaH₂PO₄, pH 7,4) froid et les cellules sont solubilisées par agitation, pendant 30 min à la température ambiante, à l'aide d'une solution de 0,5% triton X-100 dans du PBS. Le détergent est retiré et le matériel insoluble est incubé en présence d'une solution d'hydroxyde d'ammonium 0,025N pendant 3 min, afin d'éliminer les organelles et les débris cellulaires résiduels. Les matrices, rincées avec du PBS, peuvent être conservées stérilement pendant 3 mois à 4°C (Chevalier et Chapdelaine, 1991). Pour les utiliser, il suffit d'y ensemercer les cellules désirées.

2.5. Traitement des cellules

Avant tout traitement, les feuillets sont rincés avec le milieu de culture approprié (MEM ou RPMI 1640) ne contenant pas de sérum, puis incubés dans leur milieu de culture respectif dépourvu de sérum pour une période de 16 à 24h. Le composé à tester est alors dilué à la concentration désirée soit dans du MEM, soit dans du RPMI 1640 et mis en présence des cellules en feuillets, à 37°C, pour le temps indiqué. Les pétris sont ensuite posés sur glace, afin d'arrêter tout processus de signalisation.

2.6. Extraction des protéines cellulaires

Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS contenant 1mM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄), un inhibiteur de tyrosine phosphatases. Dans tous les cas, les protéines sont extraites avec un tampon de solubilisation (TS: 50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1% NP-40, 0,25% désoxycholate de sodium, 10µg/mL aprotinine, 1µg/mL leupeptine, 1µg/mL pepstatine). Afin d'obtenir le maximum de solubilisation, les extraits de

protéines sont incubés pendant 1h à 4°C, puis clarifiés par centrifugation à 4°C (10 000g, 10 min), et conservés à -80°C.

2.7. Préparation d'extrait de protéines membranaires à partir du placenta humain

Le placenta humain, généreusement fourni par le Dr Louis R. Bégin, pathologiste à l'hôpital général Juif de Montréal, maintenant à l'hôpital Sacré-Cœur de Montréal, est rapidement disséqué sur glace en morceaux et congelé à -80°C. Environ 1g de tissu est homogénéisé au Polytron dans du tampon de fractionnement froid (25mM HEPES pH 7,4, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 200mM KCl, 0,1mM Na₃VO₄, 5mM DTT, 5µg/mL leupeptine, 5mM benzamidine, 1mM PMSF, 10µg/mL aprotinine, 5µg/mL pepstatine), puis centrifugé à 3000g, à 4°C pendant 3 min. Le surnageant est recueilli, puis est centrifugé à 105 000g, à 4°C pendant 60 min. Le nouveau surnageant est considéré comme l'extrait cytosolique. Le culot, quant à lui, est resuspendu dans le tampon de fractionnement contenant 0,5% CHAPS, un détergent non-ionique, et laissé sur glace pendant 45 min, en agitant régulièrement. Après une seconde centrifugation à 105 000g, à 4°C pendant 60 min, le surnageant est recueilli et considéré comme l'extrait de protéines membranaires de placenta humain.

2.8. Marquage métabolique aux acides aminés soufrés-³⁵S

Le marquage métabolique consiste à incorporer, lors de la synthèse de nouvelles protéines, les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) marqués au radioisotope ³⁵S. Des cellules PC-3 et LNCaP sont cultivées jusqu'à 70-80% de confluence et les feuillets sont rincés au PBS. Les cellules sont alors incubées dans du RPMI sans méthionine et sans cystéine (ICN) pendant 2h, à 37°C. La réaction de marquage métabolique a lieu dans du RPMI sans méthionine et sans cystéine contenant 10% FBS et 50µCi/mL de la solution radioactive (³⁵S-TRANS-Label, ICN), à 37°C pendant 16h. Le milieu est retiré, les cellules rincées au PBS-vanadate et les protéines extraites avec du TS tel que décrit plus haut.

Pour les immunoprécipitations des protéines radioactives, 500µg de protéines sont incubées avec l'anticorps contre Fak (tel que décrit à la section 4.1.), puis séparées sur un grand gel (1,5 mm épaisseur, 12 cm x 16 cm) de 7,5% polyacrylamide (voir section 4.2.). Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie (0,1%(p/v) bleu de Coomassie, 10% méthanol, 10% acide acétique), puis décolorées (10% méthanol, 10% acide acétique). Afin d'intensifier le signal radioactif, le gel est traité avec la solution En³Hance (NEN), séché et exposé à un film à autoradiographie à -80°C, en présence d'un écran intensifiant. Des immunoprécipités contrôles sont effectués avec des IgGs de souris (Sigma), dans les mêmes conditions et en même temps que les immunoprécipitations avec l'anticorps contre Fak.

2.9. Dosage de protéines et de peptides

Les concentrations de protéines et de peptides des diverses préparations sont quantifiées en utilisant la trousse de détection au BCA de Pierce (Smith *et al.*, 1985). Cette méthode fait intervenir l'acide bicinchoninique (BCA) et la réduction du Cu²⁺ en Cu¹⁺ par les protéines en milieu alcalin. En fait, la couleur vient de l'interaction entre deux molécules de BCA et un ion Cu¹⁺ et l'intensité de la réaction est fonction de la structure macromoléculaire des protéines, du nombre de liens peptidiques et de la présence de certains acides aminés (cystéine, tryptophane, tyrosine). Du point de vue méthodologique, les échantillons, dilués dans la solution de BCA, sont incubés à 56°C pendant 20 min. Leur absorbance est lue à 592 nm contre un blanc ne contenant que de l'eau et la solution de BCA. La courbe de référence est faite avec de l'insuline, dans le cas d'un dosage de peptides. Dans le cas de protéines, la courbe de référence est plutôt établie avec de l'albumine bovine sérique.

3. Évaluation de la réponse des cellules

Diverses techniques, adaptées et comparées sont brièvement décrites dans cette section.

3.1. Coloration des cellules au bleu de méthylène

Le protocole suivi est une adaptation de la méthode d'Oliver et ses collègues (Oliver *et al.*, 1989), consistant à fixer les cellules à la glutaraldéhyde 4% puis à les incuber en présence de bleu de méthylène 1% (p/v) dans un tampon borate de sodium 10mM, pH 8,5. Ce pigment se lie aux protéines cellulaires. Les feuillets sont ensuite rincés avec le tampon borate et séchés. L'intensité de la captation du colorant peut alors être évaluée de façon qualitative (selon une échelle allant de 0 à 10+ [dépendamment de la réponse de la culture] lue par plusieurs personnes et à l'aveugle) en comparant la coloration des échantillons à celle de cellules contrôles (sans sérum ou cultivées en présence de quantités croissantes de sérum de chien, 0 à 10%). Alternativement, la réponse peut être quantifiée par la dissolution du bleu de méthylène dans une solution de 0,1N HCl-100% éthanol (1:1), suivie de la lecture de l'absorbance de chacun des échantillons à 650 nm.

3.2. Mesure de la synthèse d'ADN

Des études antérieures de cinétique d'induction de la synthèse d'ADN ont permis de démontrer que les cellules prostatiques fraîchement isolées n'incorporent pas de thymidine-³H, alors que les cellules en feuillets depuis 3 jours sont très actives à cet égard (Chevalier *et al.*, 1981).

3.2.1. Évaluation de la réponse après trois jours de culture

Les cellules épithéliales canines sont donc cultivées pendant 3 jours selon les conditions décrites précédemment. Les feuillets sont rincés avec du MEM sans sérum, puis privés de sérum pendant 0 à 24h (incubation avec du MEM sans sérum). Les différentes fractions à tester sont ensuite ajoutées, dans du MEM frais, toujours sans sérum. À moins d'indication contraire, la période d'incubation en présence de PGF dure de 15 à 18h à 37°C, et la thymidine-³H (2μCi/mL;

4 μ Ci/pétri) est ajoutée au cours des dernières heures de culture (1 à 3h dernières heures). L'incorporation de thymidine à l'ADN est arrêtée en déposant les pétris sur glace et en retirant les surnageants. Les feuillets sont solubilisés avec une solution de 0,4N NaOH, les solubilisats transférés dans des tubes contenant une solution de 20% (p/v) TCA froid et le matériel TCA-insoluble, dont l'ADN, est précipité pendant au moins 1h à 4°C. Chaque précipité est recueilli sur filtre Whatman 934-AH et rincé avec une solution de 10% (p/v) TCA froid (3 x 5 mL) puis avec de l'éthanol 95% (1 x 5 mL). Les filtres asséchés sont recouverts de liquide à scintillation (Formula 989, DuPont NEN) et la radioactivité incorporée à l'ADN est déterminée par scintillation à l'aide d'un compteur β . Les résultats sont exprimés en dpm (désintégration par minute).

3.2.2. Évaluation de la réponse lorsque les cellules sont cultivées moins de trois jours

Dans le cas où la synthèse d'ADN est mesurée entre les temps 18 et 72h de culture (cinétique d'expression de tyrosine kinases), aucune période de privation de sérum n'est effectuée, la thymidine (2 μ Ci/mL) est ajoutée directement au pétri pendant les 3h qui précèdent l'arrêt de la culture. Les feuillets sont alors lavés avec du PBS froid, puis l'ADN est précipité avec une solution de 10%(p/v) TCA froid, pendant 30 min à 4°C. Le précipité est lavé avec 10%(p/v) TCA, puis il est solubilisé avec 0,5N NaOH, pendant 30 min à 4°C. La solution de NaOH contenant l'ADN marqué est transférée dans une fiole à laquelle du liquide à scintillation est ajouté. Le tout est compté au compteur β lorsque tous les échantillons sont recueillis. Les résultats sont exprimés en dpm (désintégration par minute).

3.3. Comptage des cellules

À la fin des cultures primaires, le milieu est prélevé et dilué avec de l'Isoton (BDH). Les cellules épithéliales canines retrouvées en suspension dans le milieu de culture sont dénombrées au Coulter, modèle Zm. Ceci permet d'évaluer le nombre de cellules issues du feuillet et relarguées dans le milieu au cours de la

culture (généralement <10% du nombre total de cellules). Les cellules en feuillets sont rincées avec une solution saline (HBSS) contenant 1mM EDTA, puis incubées à 37°C dans une solution de 0,25% (p/v) trypsine, 1mM EDTA et 1mM EGTA (Chevalier *et al.*, 1984). Les cellules sont ensuite diluées dans l'Isoton, resuspendues vigoureusement pour minimiser leur agrégation et elles sont comptées tel que mentionné ci-haut.

Alternativement, les feuillets des lignées cellulaires prostatiques humaines sont rincés au PBS et incubés à 37°C suite à leur contact avec une solution de 0,25% (p/v) trypsine, 1mM EDTA. Les cellules sont resuspendues dans du RPMI 1640, recueillies par centrifugation à faible vitesse et resuspendues dans du RPMI 1640. Un aliquot est prélevé et compté à l'hémacymètre.

3.4. MTT

Cette méthode, qui reflète l'action d'une déshydrogénase mitochondriale sur le substrat MTT (bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényl-tétrazolium), est un test de viabilité des cellules fréquemment utilisé pour mesurer leur croissance (Romijn *et al.*, 1988). Les cellules sont cultivées dans des plaques à 96 puits. Avant l'arrêt de la culture, 40µL de la solution de MTT (5mg/mL dans du PBS) sont ajoutés aux cellules et le tout est incubé pendant 4h supplémentaires, à 37°C. Le milieu est alors doucement retiré et les cristaux de formazan formés sur les cellules sont dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) et l'absorbance de la solution résultante est déterminée à 540 nm sur un lecteur de plaques ELISA; un puits ne contenant que du DMSO (c'est-à-dire sans cellules et sans MTT) sert de blanc (Romijn *et al.*, 1988).

3.5. Quantification de l'ADN cellulaire par spectrofluorimétrie

À la fin de la période de culture (plaques à 96 puits), les feuillets de cellules épithéliales prostatiques de chien sont rincés au PBS et congelés à sec à -80°C. Les cellules sont perméabilisées par des périodes successives de gel/dégel en présence d'eau (Rago *et al.*, 1990). Différents agents pouvant s'intercaler entre les

bases de l'ADN et émettre de la fluorescence sont testés: Hoechst 33258 et 33342 (ce dernier est testé sur des cellules n'ayant pas été congelées), l'éthidium homodimère-1 et le YO-PRO. L'intensité de la fluorescence émise est lue sur un appareil Cytofluor de Millipore aux longueurs d'ondes d'excitation/émission suivantes:

Tableau 2 Caractéristiques des agents fluorescents utilisés pour quantifier l'ADN

Agent fluorescent	Concentrations	λ excitation/émission (nm)
Hoechst 33258	1 μ g/mL	360 / 460
Hoechst 33342	1 μ g/mL	360 / 460
éthidium homodimère-1	3,75 μ M	485 / 645
YO-PRO	0,2 μ L/mL	485 / 530

Dans chacune des plaques, une courbe standard d'ADN de thymus de veau (0 à 1000ng / puits) est incluse, permettant ainsi de rapporter les valeurs relatives de fluorescence en concentration d'ADN ou en nombre de cellules, considérant qu'une cellule prostatique canine contient approximativement 7pg d'ADN (Blaheta *et al.*, 1991).

3.6. Test d'invasion

Le principe de cette technique est de permettre aux cellules, en présence ou non d'un stimulant, de traverser une membrane poreuse recouverte d'une mince couche de protéines de la matrice extracellulaire (Matrigel). Il s'agit ensuite de compter le nombre de cellules ayant traversé le Matrigel et se retrouvant de l'autre côté de la membrane. Les cellules PC-3, cultivées à environ 80% de confluence, sont privées de sérum 24h précédant l'expérience, puis trypsinisées (0,25%(p/v) trypsine, 1mM EDTA), comptées et diluées à la concentration voulue dans du RPMI 1640 sans sérum. Du Matrigel (50 μ g) est déposé sur des filtres de polycarbonate de 13mm de diamètre ayant des pores de 12 μ m (CoStar) et les filtres sont séchés à l'air libre dans la hotte biologique. Ils sont réhydratés avec du RPMI 1640 sans sérum juste avant leur utilisation. Sauf indication contraire, la chambre inférieure des chambres de Boyden est remplie avec une solution de

100µg/mL Matrigel, 10% SVFd dans du RPMI 1640 et est recouverte de la membrane de polycarbonate, côté avec le Matrigel vers le dessus. La chambre supérieure est installée et les cellules sont ajoutées, à la concentration indiquée, avec ou sans stimulus (en général 5 à 10nM bombésine, diluée dans du PBS). Les chambres de Boyden sont incubées à 37°C, sous 5% de CO₂, pour des périodes variant selon les expériences (5 à 72h). À la fin de la période d'incubation, la chambre du haut est démontée et les cellules déposées à la surface de la membrane sont enlevées avec un coton-tige. Les cellules ayant traversé la membrane sont fixées à la membrane avec une solution de 4% glutaraldéhyde, puis colorées au cristal violet (0,1% (p/v) dans 0,1M borate de sodium pH 9,0, 2% éthanol). Les membranes séchées à l'air sont montées entre lame et lamelle et le nombre de cellules ayant envahi la couche de Matrigel est déterminé par comptage, au microscope (40 ou 100X), de trois champs représentatifs couvrant environ 90% de la surface de la membrane exposée aux cellules. Chaque expérience est réalisée en triplicatas pour chacune des conditions testées.

4. Électrophorèses

Divers types d'électrophorèse ont servi à la réalisation des résultats présentés dans cette thèse. Cette section regroupe et décrit les méthodes d'électrophorèse ainsi que celles qui y sont reliées (immunoprécipitation, immunodétection, coloration et renaturation).

4.1. Immunoprécipitation

Les extraits sont préparés tel que décrits à la section «extraction des protéines cellulaires» et quantifiés tel que décrit à la section «dosage de protéines et de peptides». Dans un premier temps, 500µg de protéines, diluées dans 500µL de TS, sont incubées avec 20µL de protéine G-sépharose (Pharmacia), afin d'éliminer les protéines cellulaires se liant de façon non-spécifique aux billes de protéine G, pendant 1h à 4°C. Les billes sont ensuite éliminées par centrifugation (3000g, 5 min) et les échantillons transférés de tubes. Les anticorps (4 µg, voir tableau 3

pour leurs différentes caractéristiques) sont alors ajoutés aux protéines et le tout est incubé pendant environ 18h, à 4°C, avec une légère agitation. De nouvelles billes de protéine G-sépharose sont ensuite ajoutées (20µL) et l'incubation poursuivie pendant 2h afin de précipiter (par centrifugation 3000g, 5 min) les complexes antigène-anticorps à l'aide des billes. Le matériel adsorbé sur les billes est lavé 3 fois (500µL) avec du TS froid. Finalement, les complexes antigène-anticorps sont extraits à l'aide de 30µL de tampon d'échantillon SDS-PAGE (TpE: 62,5mM TRIS-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% β-mercaptoéthanol et 0,001% bleu de bromophénol) selon la procédure de Laemmli (1970) et chauffés à 100°C pendant 3 min. Les protéines d'intérêt ainsi récupérées dans le surnageant sont déposées sur un gel de polyacrylamide.

4.2. Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les conditions utilisées pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire sont telles que décrites par Laemmli (1970). Brièvement, les protéines, provenant d'immunoprécipitations ou de lysats cellulaires (20µg), sont diluées dans le TpE, bouillies, concentrées dans un gel de 4% acrylamide (0,125M TRIS-HCl pH 6,8, 0,1% SDS), puis séparées sur un gel de 7,5% acrylamide (0,375M TRIS-HCl pH 8,8, 0,1% SDS). Le tampon d'électrode (SDS-PAGE) est constitué de 192mM glycine, 50mM TRIS, 0,1% SDS et les protéines sont séparées avec un courant électrique de 25mA/gel. De façon générale, les gels ont un épaisseur de 1,5 mm.

4.3. Gel de peptides

Les fractions à utiliser sont lyophilisées, reprises dans un tampon d'échantillon (25mM TRIS-HCl pH 6,8, 0,5% SDS, 2,5% β-mercaptoéthanol, 15% glycérol, 0,005% bleu de bromophénol), bouillies 2 min et déposées sur un gel de concentration (140mM TRIS-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 5% acrylamide) suivi d'un gel de séparation (766mM TRIS-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 22% acrylamide). Les peptides sont séparés avec un courant de 90mA/gel, dans le tampon d'électrode décrit plus haut (SDS-PAGE). Le gel de séparation est coloré à l'argent afin de visualiser les peptides (voir section 4.8.).

4.4. Électrophorèse en conditions non-dénaturantes (ND-PAGE)

Les conditions d'électrophorèse non-dénaturante sont les mêmes que celles en milieu dénaturant (SDS-PAGE) excepté pour le β -mercaptoéthanol et le SDS qui sont omis (échantillons et gels). De façon générale, ces gels ont un épaisseur de 0,75 mm.

4.5. Focalisation isoélectrique

La focalisation isoélectrique permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (O'Farrell, 1975). La focalisation se fait dans des boudins (longueur: 12 cm) de polyacrylamide (4% acrylamide, 2% NP-40, 9M urée, 2% ampholines) pendant environ 18h à un voltage de 400V. Le mélange d'ampholines (Bio-Rad) est fait à parts égales de solutions d'ampholines 3-10, 5-7 et 7-9, pour une courbe s'échelonnant du pH 4,5-5,5 à 8,0-9,0. Des boudins contenant seulement du tampon de lyse (sans extrait protéique) servent de contrôle pour établir la courbe de pH. Celle-ci est établie en coupant les boudins contrôles à tous les 0,5 cm et en incubant les morceaux dans de l'eau ultra-pure pendant quelques heures afin de laisser les ampholines diffuser dans l'eau. Le pH des solutions obtenues est mesuré dans chacun des tubes, permettant d'établir la courbe de séparation.

Les protéines sont d'abord précipitées à l'acétone (5 à 9 volumes d'acétone froid, -80°C , 20 min), reprises dans le tampon de lyse (9,5M urée, 2% NP-40, 2% ampholines, 5% β -mercaptoéthanol), puis déposées sur les boudins. Les échantillons sont recouverts de tampon ("sample overlay": 9M urée, 2% ampholines) et de 0,01M H_3PO_4 pour une migration se faisant du côté acide vers le côté basique. Les cuves du haut et du bas sont remplies de 0,01M H_3PO_4 et de 0,02N NaOH, respectivement. À la fin de la migration (environ 18h), les boudins sont extraits des tubes de verres, déposés à l'horizontale sur un gel SDS-PAGE et maintenus en place par de l'agarose. La séparation dans la deuxième dimension se fait telle que décrite dans la section SDS-PAGE.

4.6. Transfert

Lorsque la séparation de protéines est terminée, le gel est rincé dans le tampon de transfert (192mM glycine, 25mM TRIS, 20% méthanol). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) avec un voltage de 16-20V, à 4°C, pendant environ 18h. Afin de vérifier l'efficacité du transfert, les membranes sont toujours colorées avec une solution de rouge ponceau (0,2%(p/v) Ponceau S, 3,5% TCA) et décolorées à l'aide de TTBS (0,05% Tween-20, 20mM TRIS-HCl pH 7,4, 150mM NaCl). Dans certains cas, suite à l'immunodétection, les membranes peuvent être colorées de nouveau, mais avec un pigment plus stable et plus sensible que le rouge ponceau (0,1%(p/v) amido black, 50% méthanol, 10% acide acétique) afin d'examiner la quantité de protéines dans chacun des puits.

4.7. Immunodétection (Western blot)

Après leur coloration/décoloration au rouge ponceau, les membranes sont incubées pendant 2h à la température de la pièce, sous agitation, avec une solution de 5% de lait écrémé dans du TTBS. Ceci permet de bloquer les sites encore disponibles sur la membrane et réduire les liaisons non spécifiques de l'anticorps à la membrane. La membrane est par la suite incubée dans une solution contenant les anticorps appropriés (voir tableau 3) pendant 2h à la température de la pièce, toujours sous agitation. Afin d'éliminer le plus possible de liaison non spécifique, la membrane est lavée trois fois avec du TTBS. La liaison de l'anticorps aux protéines est détectée par l'incubation de la membrane avec une solution contenant un anticorps secondaire approprié (chèvre anti-lapin, chèvre anti-souris, chèvre anti-poulet) couplé à la peroxydase (HRP: horseradish) (voir tableau 3). Après une seconde série de trois lavages au TTBS, les complexes immuns sont révélés avec un système de chimioluminescence (ECL; Amersham) qui produit un signal lumineux lorsque le substrat entre en contact avec la peroxydase. Ce signal est détecté sur films Fuji.

Tableau 3 Caractéristiques des différents anticorps utilisés pour immunodétection

Protéine reconnue	Compagnie	Type	Dilution	% (p/v) de la solution de lait écrémé/TTBS
Fak	Upstate Biotech. Inc. (UBI)	souris	1µg/mL	1
pY	UBI	lapin	1µg/mL	1
Fer	produit au labo	lapin	1/4000	5
Csk	Transduction Laboratories	souris	1/1000	5
Src-1 (Mab-327)	Oncogene	souris	1/1000	5
Src-2 (LA074)	Quality Biotech	souris	1/2000	5
FGF-R1	Transduction Laboratories	souris	1/4000	5
KGF-R	produit au labo	lapin	1/1000	5
Flt-1 (1)	Santa Cruz Biotech	lapin	0,1µg/mL	5
Flt-1 (2)	UBI	poulet	1µg/mL	5
Lyn	UBI	lapin	1/4000	5

4.8. Coloration à l'argent

Cette technique très sensible permet de détecter aussi peu que 0,01 ng de protéine par mm². Seuls les temps de développement doivent être ajustés en fonction du matériel à visualiser. Dans un premier temps, les peptides sont pontés au gel par trois solutions successives (1er pré-fixateur: 50% méthanol, 10% acide acétique; 2e pré-fixateur: 5% méthanol, 7% acide acétique; fixateur: 10% glutaraldéhyde). L'excès de glutaraldéhyde est enlevé par une série de lavages à l'eau. Le gel est ensuite incubé dans une solution de dithiothréitol (DTT; 5µg/mL) puis dans le nitrate d'argent (0,1%(p/v) AgNO₃). La coloration est révélée avec le développeur (3%(p/v) carbonate de sodium, 0,02% formaldéhyde) et est arrêtée, lorsque l'appréciation visuelle est satisfaisante, par l'ajout d'une solution d'acide citrique 2,3M. Enfin, pour préserver la coloration, le gel est incubé dans une solution de carbonate de sodium 0,03% (p/v) avant d'être scellé dans un sac de

plastique et conservé à la température ambiante. Cette technique est une adaptation de celle de Morrissey (1981).

4.9. Renaturation

Cette technique est couramment utilisée au laboratoire pour étudier l'activité des kinases après leur séparation sur gel, selon leur poids moléculaire apparent (Durocher *et al.*, 1992). Les protéines de lysats cellulaires sont séparés sur un gel de polyacrylamide 7,5% (voir section SDS-PAGE) contenant 100µg/mL de poly(Glu, Tyr), un substrat synthétique des tyrosine kinases (Sigma). Le gel est ensuite débarrassé du SDS par deux lavages successifs (50mM imidazole, 28mM acide iminodiacétique; le premier contenant 20% propanol, le deuxième 10mM β-mercaptoéthanol). Les protéines sont dénaturées avec 8M guanidine-HCl, 50mM imidazole, 28mM acide iminodiacétique et 10mM β-mercaptoéthanol. Elles sont ensuite incubées, à 4°C, dans une solution permettant leur renaturation (25mM imidazole, 14mM acide iminodiacétique, 20mM KCl, 10mM β-mercaptoéthanol, 0,04% Tween-20, 10% (p/v) sucrose). L'autophosphorylation des kinases ou la phosphorylation du poly(Glu, Tyr) est effectuée en présence d'ATP-γ³²P (500 ou 100µCi, selon que la renaturation est suivie ou pas de l'analyse des acides aminés phosphorylés) dans un tampon de phosphorylation (10mM HEPES pH 7,4, 10mM β-mercaptoéthanol, 20mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 100µM Na₃VO₄). L'excédent de phosphate radioactif est lavé par l'ajout d'une solution de 5% (p/v) TCA, 1% (p/v) Na₄P₂O₇, 1% (p/v) NaH₂PO₄. Les protéines sont ensuite pontées au gel par un traitement avec 10% glutaraldéhyde (Bourassa *et al.*, 1988), puis colorées au bleu de Coomassie 0,1% (p/v) dans 10% méthanol et 10% acide acétique. Afin d'enrichir la préparation en protéines phosphorylées sur tyrosine (les sérine/thréonine phosphates, composantes majeures de l'activité kinasique des cellules, étant plus labiles) les gels sont incubés à 56°C dans une solution de 1N KOH pendant 2h. Les gels sont ensuite séchés et l'activité kinasique (³²P ajouté aux protéines) est révélée par l'exposition à -80°C, en présence d'un écran intensifiant sur un film à autoradiographie.

4.10. Analyse des acides aminés phosphorylés

Afin de déterminer la nature des enzymes renaturées (tyrosine, sérine ou thréonine kinases), les bandes d'intérêt sont découpées du gel, réhydratées et partiellement hydrolysées (6N HCl, 90 min à 110°C). Le matériel hydrolysé est purifié sur des colonnes Sep-Pak C-18 et QMA (Millipore). Par la suite, les acides aminés phosphorylés sont séparés par une électrophorèse bi-dimensionnelle sur couche mince («thin-layer electrophoresis», TLE), sur des plaques de cellulose (Baker). La première dimension se fait à pH 1,9 (2,5% acide formique, 7,8% acide acétique) et la deuxième à pH 3,5 (0,5% pyridine, 5% acide acétique). Les plaques sont séchées et les positions de migration de phosphotyrosine, phosphosérine et phosphothréonine (ajout de 4µg de chacun afin d'identifier la région appropriée) sont révélées à la ninhydrine (0,25% (p/v) dans de l'acétone). La présence d'acides aminés phosphorylés est déterminée par l'exposition des plaques à un film à autoradiographie, à -80°C en présence d'un écran intensifiant (Durocher et Chevalier, 1994).

5. Clonage de kinases par PCR

Le principe de cette stratégie décrite par Wilks (1989) est d'identifier des kinases (tyrosine ou sérine/thréonine) en se servant de régions ultraconservées dans leur domaine catalytique comme amorces pour la réaction de PCR. Les amorces choisies correspondent aux sous-domaines VI et IX du domaine catalytique des kinases.

5.1. Isolation de l'ARNm et synthèse de l'ADNc

Les cellules épithéliales de prostate de chien sont cultivées en culture primaire pour une période de 4 à 7 jours. L'ARNm est extrait et isolé des cellules en utilisant le "Quickprep mRNA purification kit" (Pharmacia) où l'ARNm est séparé de l'ADN et de l'ARN total par une colonne d'oligo(d)T, ce qui permet de retenir l'ARNm par son extrémité poly A+. L'ARNm obtenu est ensuite précipité avec du glycogène, du sel et de l'éthanol. L'ARNm du culot, resuspendu dans l'eau, est

quantifié par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes 260 et 280 nm. La synthèse de l'ADNc avec la transcriptase réverse contenue dans le "First strand cDNA synthesis kit" (Pharmacia) est faite à partir de 2µg d'ARNm.

5.2. Réaction de PCR

La réaction de PCR est effectuée dans un volume total de 100µL dans le tampon de PCR fourni avec l'enzyme Vent DNA polymérase (10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM TRIS-HCl pH 8,8, 2mM MgSO₄, 200µM de chaque dNTP, 0,1% Triton X-100; New England Biolabs), auquel est ajouté l'enzyme (1U), 5µL de la réaction de synthèse de l'ADNc et 1µg de chaque amorce. Ces amorces sont PTK I (5'-ATCCACMGNGAYYT-3') et PTK II (5'-CCAWAGGACCASA-3'). Elles ont été synthétisées au centre de biotechnologie Sheldon de l'université McGill. Les conditions de PCR utilisées sont celles déterminées par Wilks (1989), soit: 1,5 min à 95°C (dénaturation), 2 min à 37°C (liaison des amorces), 3 min à 65°C (élongation). Ces étapes sont répétées pendant 23 cycles. De plus, un "hot start", étape additionnelle de 5 min à 95°C avant d'ajouter l'enzyme, est effectué dans le but de maximiser la pureté du produit de la réaction de PCR. Le résultat de la réaction de PCR est ensuite analysé sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (environ 2 µg) pour visualiser, sous lampe UV, l'ADN amplifié. La bande représentant le fragment d'intérêt (environ 200pb) est découpée du gel et électroéluée à l'aide d'un appareil Extraphor (Pharmacia LKB). L'ADN ainsi extrait est précipité à l'éthanol 100% (2 volumes) et au glycogène (10mg/mL) (-80°C, 15 min). Le culot est resuspendu dans un tampon TE (10mM TRIS pH 7,5, 1mM EDTA).

Deux autres séries d'amorces ont aussi été utilisées. Dans le cas de la première série, il s'agit d'amorces très conservées: PTK IA (5'-ATCCACAGNGACCT-3') et PTK IIA (5'-CCAAAGGACCAGACGTC-3'). La deuxième série d'amorces est, au contraire, très dégénérée: PTK IB (5'-RTNCAAYMRNGAYYT-3'), PTK IC (5'-GAYYTNVSNCGCNVSNA-3') et PTK IIW (5'-

CCNDANGMCCANACRTCNGA-3'). Les conditions de PCR sont identiques dans tous les cas. Il en va de même pour toutes les étapes qui suivent.

5.3. Clonage et transformation des bactéries

Le produit de la réaction de PCR est cloné dans le plasmide pCR-Script SK(+) au site *srfI* en utilisant le matériel et le protocole du “pCR-Script SK(+) Cloning Kit” de Stratagene. Ce plasmide contient un gène de résistance à l’ampicilline, permettant une sélection positive des bactéries sur un milieu contenant cet antibiotique. De plus, le plasmide contient le promoteur inductible du gène *lacZ* permettant une sélection bleue-blanche. Le site de clonage multiple, utilisé ici avec l’enzyme *srfI*, est situé à l’intérieur du gène *lacZ*. Lorsqu’il y a insertion d’un fragment de PCR, le gène est interrompu et ne peut plus exprimer la β -galactosidase. Les bactéries sont donc incapables de métaboliser le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside) et l’IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) et demeurent blanches. Par contre, s’il n’y a pas eu d’insertion, la β -galactosidase est exprimée et les bactéries métabolisent le X-gal et l’IPTG et prennent une coloration bleutée. Les bactéries utilisées, *E. Coli* XLT-Blue (supercompétentes) sont transformées en suivant le protocole fourni par la compagnie Stratagene. Elles sont ensuite mises en culture sur des pétris de milieu solide LB_{amp} (100 μ g/mL) contenant 1mg de X-gal et 100 μ L d’IPTG 0,1M, à 37°C pendant une nuit. Les colonies blanches sont sélectionnées, repiquées et mises en culture dans du LB_{amp} (100 μ g/mL) liquide pendant 18h, à 37°C.

5.4. Isolation et dénaturation des plasmides

Les plasmides sont isolés des bactéries en utilisant le “QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit” de QIAGEN. Cette méthode peut être décrite en quelques mots: les bactéries sont lysées et les membranes précipitées par les solutions fournies par la compagnie mais qui sont généralement composées de NaOH et SDS, respectivement. L’ADN génomique bactérien est ainsi précipité car il est associé aux membranes. Les plasmides, en suspension, sont récoltés, purifiés sur une membrane QIAprep et élués avec du TE. La quantification des plasmides se fait

par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes 260 et 280 nm. Afin de vérifier la présence d'une insertion dans les plasmides et éliminer les faux positifs, 1µg de chaque clone obtenu est digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI*, dont les sites de restriction sont situés de part et d'autre du site d'insertion. Le résultat de la digestion est visualisé sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium. Chaque clone ainsi sélectionné est ensuite dénaturé avec une solution de 2N NaOH, 2mM EDTA à 37°C, 30 min. L'ADN (1µg) est précipité avec une solution d'acétate de sodium 3M et d'éthanol 100%, à -80°C, 15-20 min. Le culot d'ADN, récupéré par centrifugation, est resuspendu dans de l'eau et est prêt à être séquencé.

5.5. Séquençage

Les réactions de séquençage sont effectuées avec le "Sequanase Version 2.0 DNA Sequencing Kit" de la compagnie Amersham et sont basées sur la méthode des didésoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977). Les séquences sont visualisées sur gels dénaturants (8% acrylamide, 8M urée) grâce au dATP- $\gamma^{35}\text{S}$ (DuPont NEN) et les réactions de séquençage initiées par l'amorce T3, dont la région complémentaire est située en amont du site d'insertion des fragments de PCR dans le plasmide pCR-Script SK(+). L'amorce T7 a également été utilisée dans le but de confirmer les résultats obtenus en séquençant l'autre brin. Toutes les séquences obtenues sont comparées aux données du NCBI afin de déterminer le taux d'homologie des séquences obtenues avec celles de protéines connues.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel SPSS, version 8.0. Les régressions sont appliquées selon le modèle développé par Neter (Neter *et al.*, 1990). De façon générale, les plans expérimentaux ne permettent pas de générer des conclusions applicables à de larges populations étant donné le faible échantillonnage. Pour l'ensemble des analyses de variance, trois suppositions sont

faites: 1- le paramètre à analyser est une variable distribuée normalement; 2- la variance est la même pour l'ensemble des moyennes, ce qu'on nomme homoscédasticité; 3- chaque réplicat au sein des blocs constitue une observation indépendante. Quoiqu'on peut tester les deux premières suppositions, on ne peut le faire ici en raison du nombre insuffisant de données. Ce qui fait que dans la majorité des cas, les conclusions ne sont applicables qu'au matériel utilisé.

L'analyse densitométrique des bandes obtenues lors des immnuobuvarpages pourrait permettre une certaine quantification de l'effet observé. Cependant, les nombreux paramètres entrant en ligne de compte (par exemple, surface sélectionnée, bruit de fond inégal, bandes d'aspect inégal) font que cette analyse, quoique semblant intéressante, s'avère insatisfaisante et peu apte à fournir des données qui influencent significativement les résultats.

Résultats

Cette partie regroupe quatre sections présentant chacune des résultats sur des molécules ayant un rôle à jouer dans le contrôle des fonctions des cellules épithéliales prostatiques: des études sur le PGF et sa kinase, la caractérisation de tyrosine kinases (TK) impliquées dans la régulation de l'adhésion, l'étalement et la prolifération des cellules épithéliales canines en culture primaire, et enfin le rôle des cellules neuroendocrines dans la progression du cancer de la prostate.

1. Études sur le PGF

Le PGF a toujours occupé une place importante parmi les projets en cours dans le laboratoire d'accueil. La purification du PGF canin en vue de son identification est un projet en soi et plusieurs personnes y participent. Dans un premier temps, l'activité mitogénique du PGF humain est comparée à celle du PGF canin afin de déterminer si les deux types de PGF ont des propriétés similaires (basées sur leur comportement chromatographique). Dans le même ordre d'idées, l'activité mitogénique des sérums d'hommes ayant des pathologies prostatiques est évaluée. Dans un deuxième temps, le développement de plusieurs méthodes pour évaluer l'effet du PGF de façon quantitative est présenté, de même que l'effet du PGF sur les lignées prostatiques cancéreuses humaines, suivi de la mise au point d'un système d'électrophorèse en deux dimensions servant à évaluer la pureté du PGF.

1.1. Activité mitogénique du PGF

Cette section décrit l'homologie entre le PGF canin et le PGF humain (purification partielle du PGF humain) et compare leurs activités respectives (fractions totales, libres et liées).

1.1.1. Purification partielle du PGF humain

La mise au point des étapes de purification du PGF a majoritairement été effectuée à partir de matériel canin. La quantité de matériel requis ainsi que les limitations quant à la disponibilité du matériel humain justifiaient l'utilisation du matériel canin. Il apparaissait cependant important de caractériser l'activité PGF chez l'humain. À cette fin, des sérums d'hommes de 20 à 40 ans ont été regroupés et ont servi à étudier le PGF humain. La quantité totale de sérum disponible pour cette étude étant peu abondante, seules les six premières étapes du protocole de purification ont pu être réalisées (soient l'extraction (acidification et chromatographie sur C-18), les deux étapes de délipidation, la chromatographie séquentielle sur C-18, ainsi que la chromatographie sur Bio-Gel P-4). Les résultats ainsi obtenus utilisant les cultures primaires canines à titre de bioessai (non montrés) indiquent que le PGF humain possède des propriétés identiques à celles du PGF canin: tous deux sont hydrophobes et l'activité (évaluée par coloration des feuillets de cellules épithéliales canines en cultures primaires) se retrouve dans la zone éluée entre 50% et 80% d'acétonitrile lorsque chromatographié sur des colonnes hydrophobes Sep-Pak C-18 (résultats non montrés). La figure 19 montre que le matériel ainsi extrait de colonnes C-18 possède une activité mitogénique qui migre à la position du standard de 1,5 kDa (le peptide bacitracine) sur un tamis moléculaire de Bio-Gel P-4. Ceci est en accord avec les résultats déjà obtenus avec la fraction libre du PGF canin (Chevalier *et al.*, 1991; 1993).

La fraction libre du PGF humain, purifiée par extraction du sérum total, a donc un comportement similaire à celle du PGF canin, laissant supposer qu'il s'agisse d'un peptide de nature et de poids moléculaire semblable.

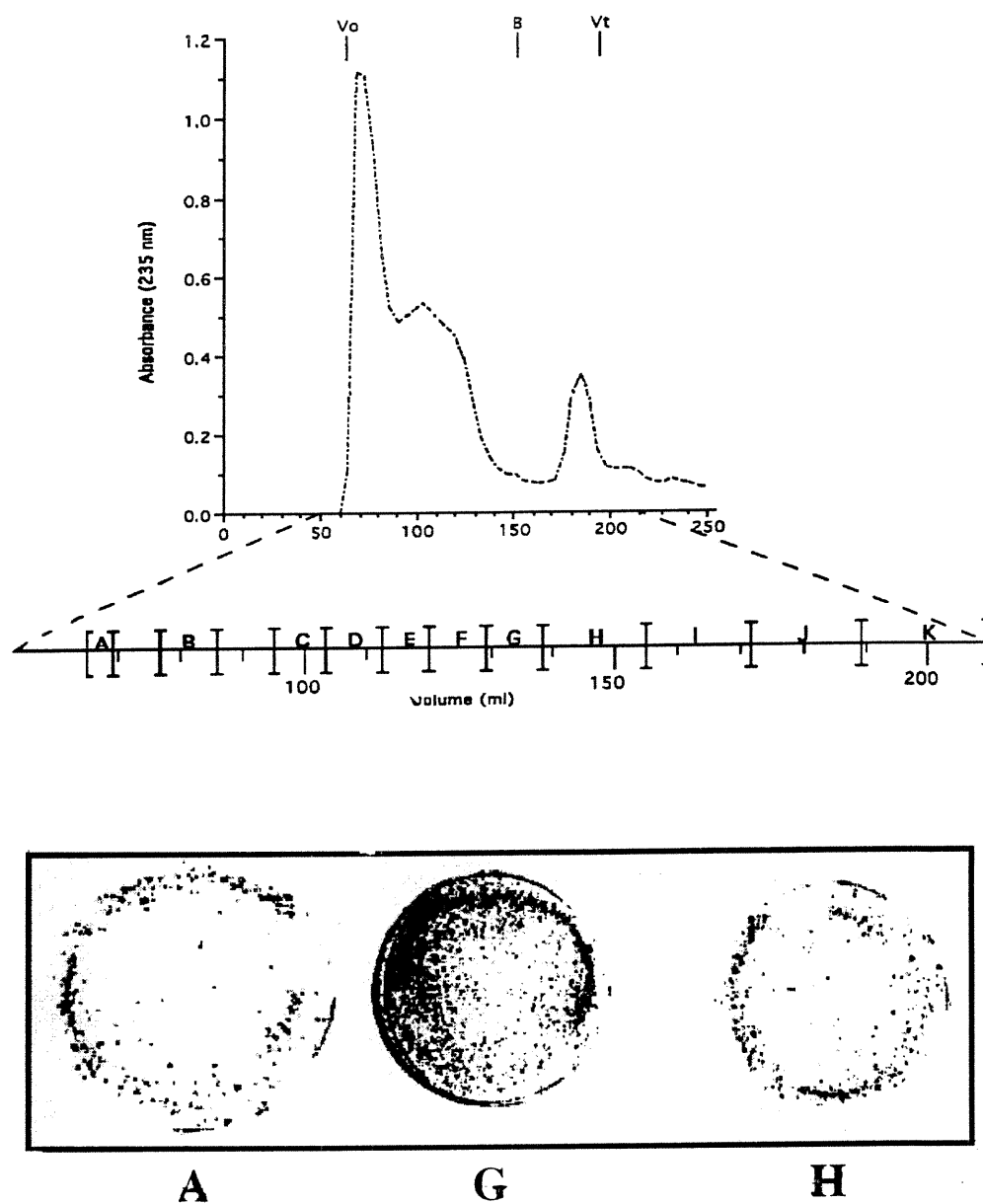


Figure 19 Détermination du poids moléculaire apparent du PGF humain

Du sérum humain est purifié selon le protocole établi pour le sérum canin (acidification, colonnes C-18, délipidation). La fraction ACN 50% (éluée entre 20% et 50% d'acétonitrile/TFA) est chromatographiée sur un tamis moléculaire de Bio-Gel P-4. Les fractions recueillies sont regroupées en 11 fractions (A à K) et testées pour leur activité mitogénique sur les cultures primaires de cellules épithéliales prostatiques canines. L'activité des fractions est révélée par coloration des feuillets au bleu de méthylène. La fraction active, G, est représentée, accompagnée de deux fractions inactives (A et H). V_0 = volume mort de la colonne; B = position d'éluée de la bacitracine (1,5 kDa); V_t = volume total de la colonne.

1.1.2. Comparaison de l'activité PGF totale, liée et libre des sérums de chien et d'humain

L'effet dose-réponse des sérums d'hommes de 20 à 40 ans et de chien adultes sur les cultures de cellules prostatiques canines est comparé à la figure 20. Des résultats typiques sont présentés, puisque, tel que déjà rapporté (Chevalier *et al.*, 1993), le pourcentage d'adhésion pour un même nombre de cellules ensemencées varie avec chacune des cultures primaires (reflétant la proportion variable des cellules souches isolées). Ceci affecte ainsi l'étendue de la réponse des cellules au sérum. La réponse est évaluée 7 jours après l'addition de sérum, soit par comptage des cellules au Coulter (figure 20A) ou par coloration des feuillets au bleu de méthylène (figure 20B).

Dans le premier cas, et en présence de sérum de chien, le nombre de cellules comptées augmente avec la dose. Cet effet (95%) est maximal à 5% de sérum et constant jusqu'à 20% ($P = 0,08$). Cependant, dans le cas du sérum humain, aucune stimulation n'est observée. L'analyse statistique confirme l'effet significatif du sérum canin par rapport au sérum humain ($P = 0,001$).

La coloration de feuillets au bleu de méthylène (figure 20B) fait ressortir des effets importants de stimulation avec les sérums des deux espèces. Cet effet est dose-dépendant pour le sérum de chien. Dans le cas du sérum humain, cet effet est détecté dès 5% de sérum, maximal à 10% et diminue ensuite.

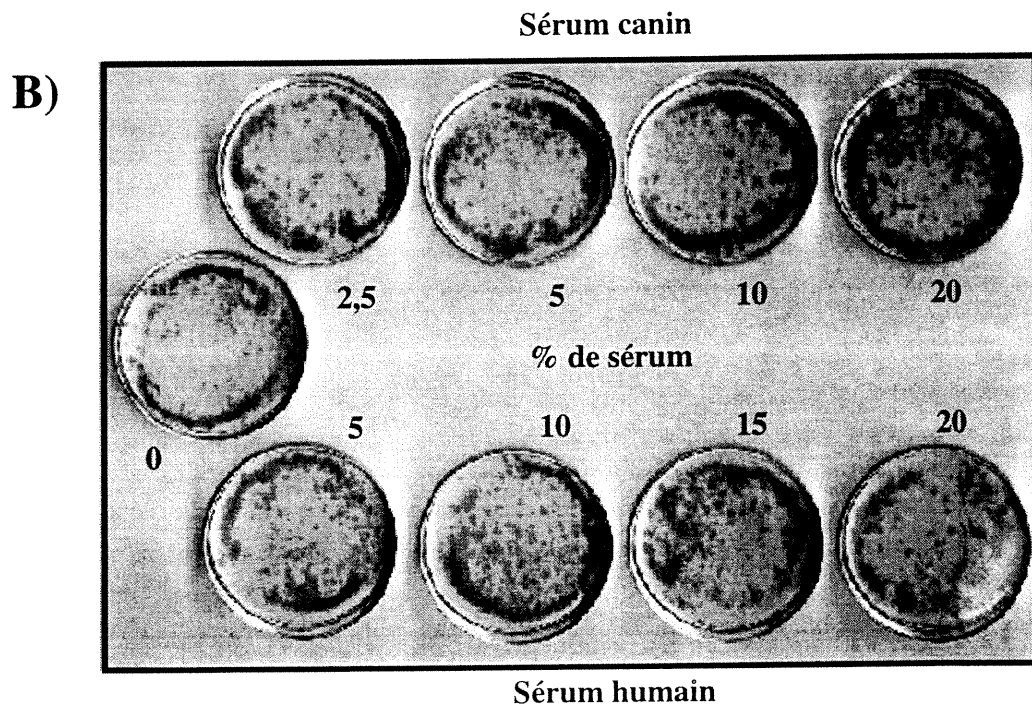
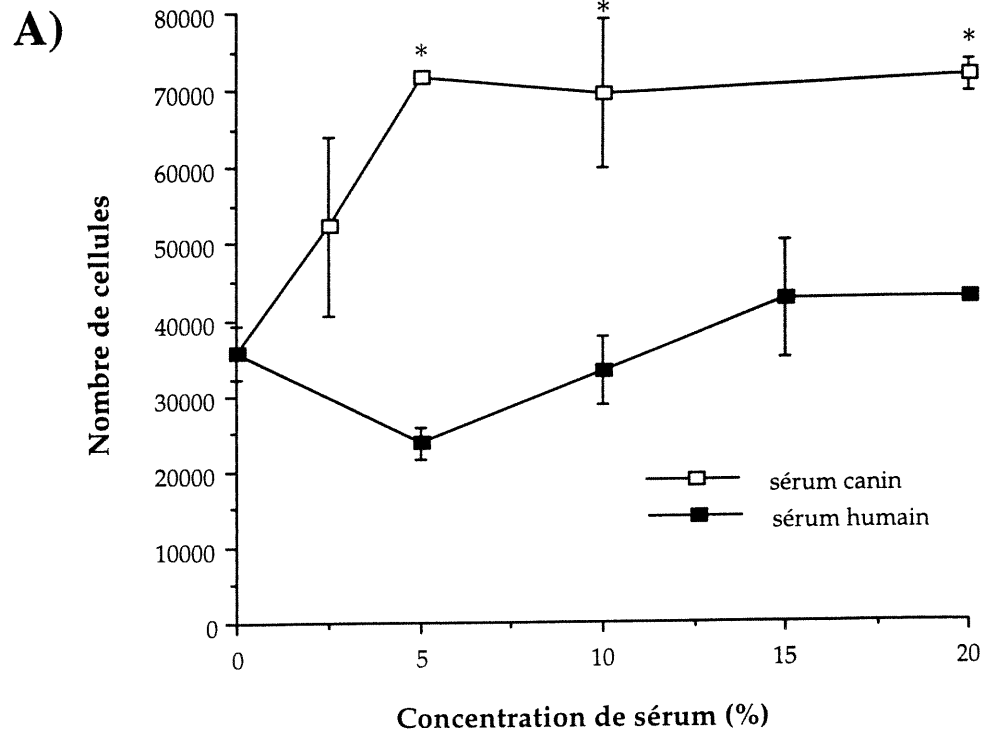


Figure 20 Effet des sérums canin et humain

A L'activité mitogénique des sérums canin et humain, testés à des doses croissantes, est évaluée par comptage des cellules au Coulter (moyenne des triplicata \pm écart-type). Résultat représentatif de 3 expériences distinctes (* $P = 0,08$). **B** Activité mitogénique de ces mêmes sérums telle que révélée par la coloration des feuillettes au bleu de méthylène.

Cette figure illustre bien le problème d'ordre technique relié au comptage des cellules primaires au Coulter. De fait, le dénombrement des cellules en suspension est sous-estimé puisqu'elles restent agrégées, en dépit de la trypsinisation, en raison de l'augmentation des contacts cellule-cellule et cellule-ECM, régulés par le sérum et la durée de la culture (Chevalier et Chapdelaine, 1991).

Dans un premier temps, nous avons poursuivi nos travaux sur les cellules prostatiques primaires en utilisant, la coloration au bleu de méthylène comme méthode alternative. Il est à noter que dans nos études préliminaires sur l'activité mitogénique des sérums, nous avons observé que la présence de lipides dans le sérum (extraction au solvant) causait aussi le détachement des cellules des feuillets. Cet effet, plus important avec le sérum humain qu'avec le sérum canin et augmentant avec la dose, pouvait être toxique et responsable de la diminution du nombre de cellules (par exemple, figure 20B: diminution de l'intensité de coloration observée).

Tel que déjà mentionné, le PGF canin se retrouve à la fois sous une forme libre et sous une forme liée (Chapdelaine et Chevalier, 1985; Chevalier *et al.*, 1993). Afin de vérifier si le PGF humain avait un comportement similaire et de valider la méthode de coloration au bleu de méthylène, nous avons comparé les résultats de fractionnement des sérums par ultrafiltration. À cette fin et pour obtenir une idée de leur activité relative, une membrane de porosité de 30 kDa a été utilisée, ce qui permet de séparer le PGF libre ($U < 30$) du PGF lié ($C > 30$). Dans ces conditions, les lipides demeurent associés aux protéines ($C > 30$). Les activités résultantes sont illustrées à la figure 21. L'activité du PGF lié du sérum de chien est très importante comparativement à celle de sa portion libre (figure 21A). En effet, des doses de l'ordre de 20% à 30% sont requises pour observer un faible effet mitogénique de l' $U < 30$ canin. Ces résultats sont en accord avec les résultats antérieurs obtenus par comptage (Chevalier *et al.*, 1993). Le sérum d'hommes normaux, fractionné de façon similaire, montre une plus grande activité mitogénique associée à la portion liée (figure 21B, au centre).

Considérant la possibilité que le PGF circulant puisse refléter la présence de pathologies prostatiques, nous avons analysé des sérums de patients (regroupés) dont les niveaux d'APS sérique étaient élevés. La comparaison de l'activité mitogénique des fractions libre et liée des sérums de ces patients APS+ (figure 21B, à droite), montre que l'activité du PGF libre est plus élevée que celle du PGF lié, suggérant un changement dans cette distribution. Cette même distribution est observée lorsque les fractions sont testées à d'autres doses (non montré). De plus, l'activité globale des fractions des sérums des patients APS+ apparaît supérieure à celle des fractions sériques d'hommes normaux.

Cette observation, par coloration au bleu de méthylène, d'une activité potentiellement différente des sérums humains sur des cellules prostatiques canines a conduit à la comparaison de l'activité mitogénique de sérums d'hommes regroupés selon différents groupes d'âge, sans évidence de pathologies prostatiques. Selon les données épidémiologiques, les hommes âgés de plus de 50 ans ont une plus forte probabilité de développer un CaP ou l'HBP (Oesterling *et al.*, 1997). La figure 22 illustre que l'activité des sérums d'hommes normaux est similaire, quel que soit l'âge. Cependant, l'activité des sérums APS+ est supérieure à celle des sérums contrôles du même groupe d'âge (51 à 65 ans et >66 ans). Ces résultats appuient ceux présentés à la figure 21 où l'activité globale des sérums est plus élevée chez les hommes ayant des pathologies prostatiques. L'ensemble de ces résultats suggère que le PGF a soit une activité mitogénique accrue, ou alors qu'il est présent en quantité plus abondante dans le sérum des patients.

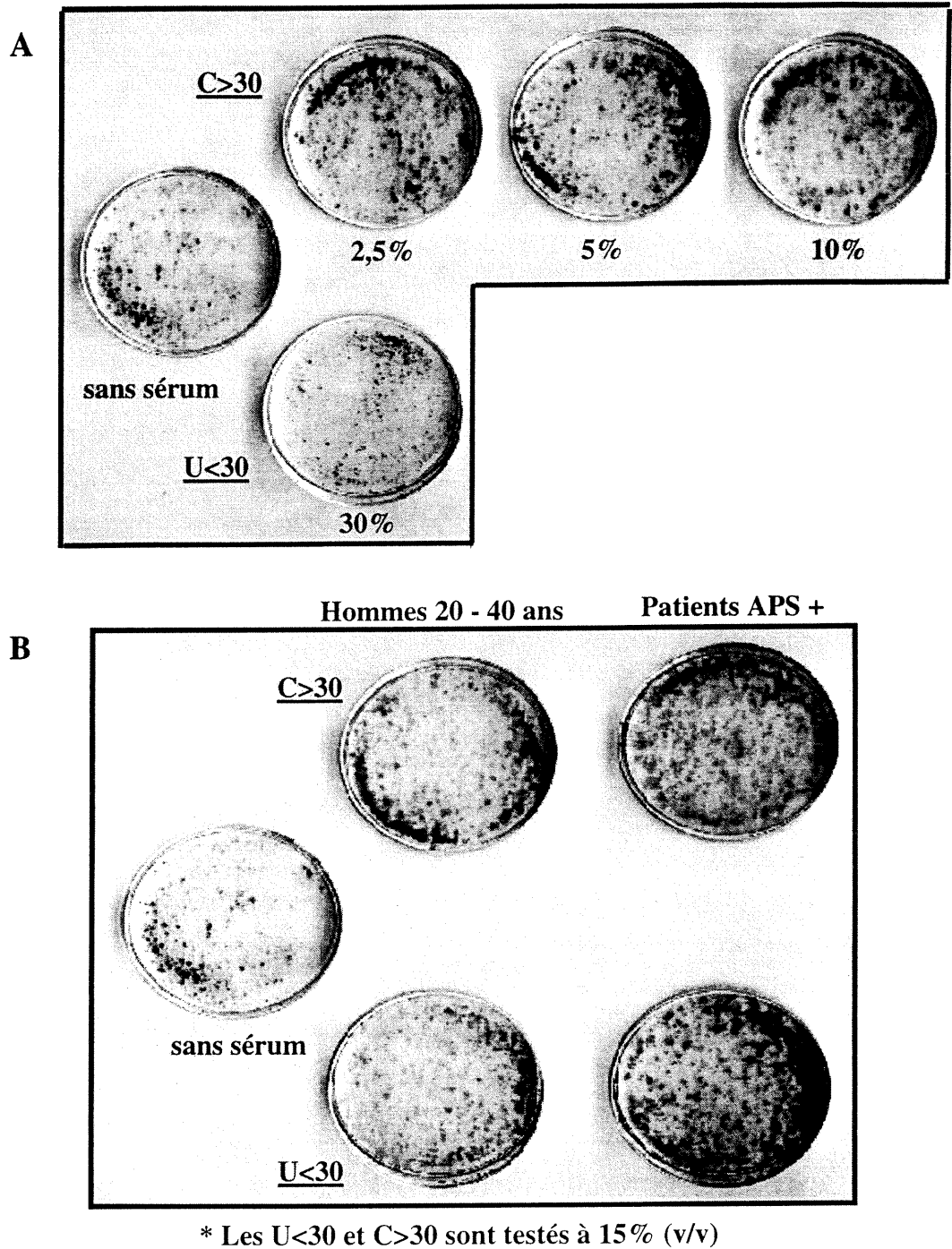


Figure 21 Fractionnement des sérums par ultrafiltration

A Effet d'un U<30 et de son C>30 d'un pool de sérums de chiens normaux.

B Effet des U<30 et C>30 de pools de sérums d'hommes de 20-40 ans (normaux) ou de patients pour qui le test d'APS avait été demandé (taux d'APS >4ng/mL). Coloration des feuillets au bleu de méthylène après 7 jours de culture en présence des différentes fractions à tester.

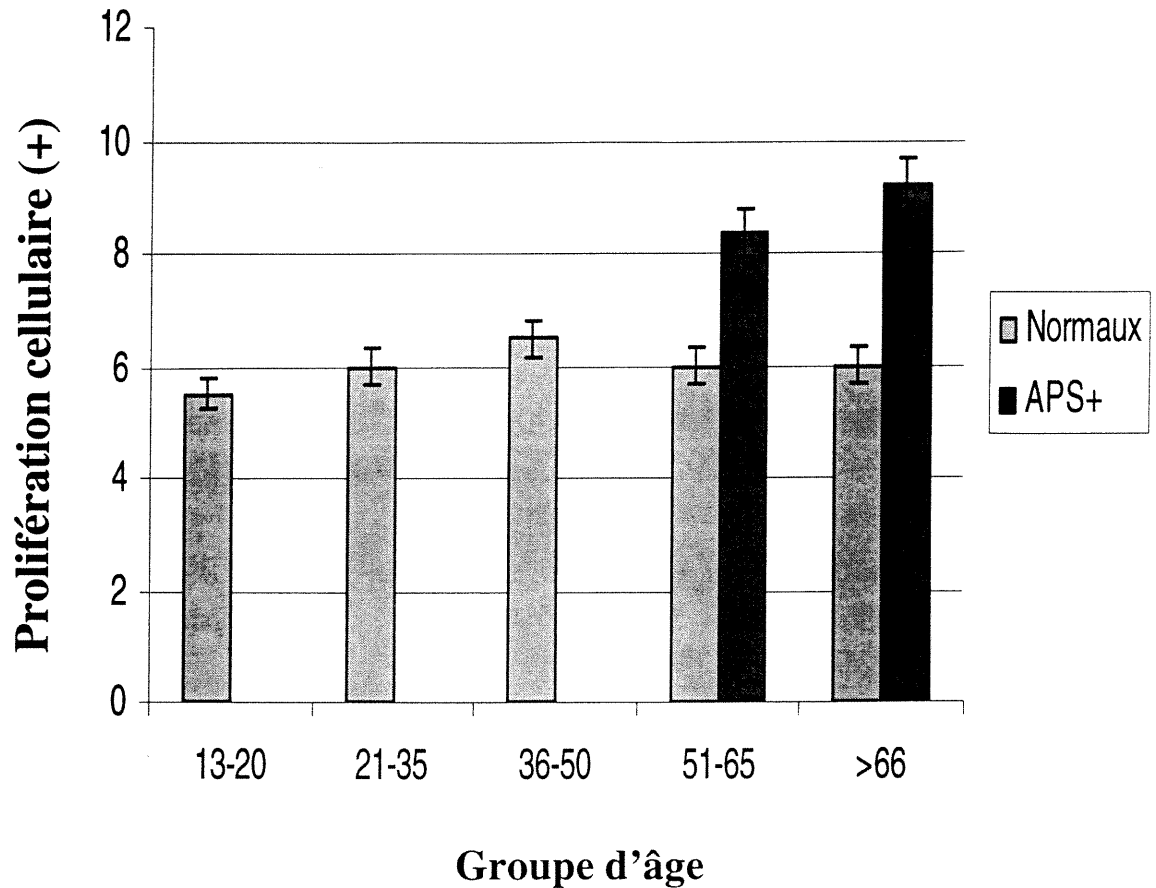


Figure 22 Effet des sérums humains

Sérums d'hommes regroupés selon l'âge. Normaux: considérés normaux, ie sans pathologies prostatiques; APS+: taux d'APS sérique >4ng/mL. L'activité mitogénique des sérums (15%) est évaluée (après 7 jours en culture en présence des différentes fractions à tester) par la captation du bleu de méthylène des feuillets de cellules épithéliales prostatiques canines selon une échelle de 0 à 10+ (l'activité maximale obtenue dans cette culture avec le sérum canin). Évaluation à l'aveugle et indépendante par 4 personnes.

1.2. Mise au point de tests permettant la quantification de l'activité du PGF

La mesure de l'activité mitogénique du PGF par la détermination du nombre de cellules (comptage au Coulter après trypsinisation) possède des limites, notamment au niveau de la sous-estimation du nombre de cellules. Ces limites, tel qu'illustré avec le sérum humain (figure 20), peuvent même masquer l'activité du sérum (attribuée au PGF) pourtant observée lors de l'examen des cultures au microscope de même que par la visualisation des feuillets colorés au bleu de méthylène.

En principe, le bleu de méthylène réagit avec les protéines (Oliver *et al.*, 1989). Nous avons voulu vérifier si l'augmentation observée de la coloration puisse provenir d'une élévation de la quantité de protéines par cellule ou encore, de protéines sériques adsorbées ou captées par les cellules.

Tableau 4 Détermination de la concentration de protéines par cellule canine¹

Pourcentage de sérum canin (%)	Nombre de cellules	Quantité de protéines (µg)	Protéines / cellule (pg)
0	2 833 333 +/- 166 667	213,7 +/- 30,7	75,4
0,5	3 833 333 +/- 944 444	261,1 +/- 30,4	68,1
2,5	5 166 667 +/- 888 889	390,3 +/- 51,9	75,5
5	4 722 222 +/- 777 778	487,8 +/- 56,3	103,3
10	6 111 111 +/- 1 388 889	536,0 +/- 73,3	87,7

¹Le nombre de cellules épithéliales prostatiques canines par pétri a été déterminé en les comptant à l'hémacymètre et la quantité de protéines par dosage colorimétrique (BCA). Les cellules sont cultivées pour une période totale de 10 jours, soit 3 jours en présence de SFVd et 7 jours en présence/absence de sérum canin.

Tel que représenté dans le tableau 4, et tenant compte des écarts sur les mesures, la quantité de protéines par cellule fluctue avec la concentration en sérum canin ($P = 0,05$) mais l'analyse suggère qu'en dépit d'un certain effet, l'augmentation de la captation du bleu de méthylène observée ne peut qu'être

attribuable qu'à une augmentation de la quantité de protéines (IC 95 % = 0,000 à 0,254 pg/cellule/% de sérum) mais reflète aussi l'effet mitogénique.

D'autres méthodes ont été optimisées pour quantifier l'activité biologique du PGF, mesurée à deux niveaux: soit son effet rapide sur la synthèse d'ADN ou phase S du cycle cellulaire (après quelques heures de stimulation) ou encore sur la prolifération des cellules ou mitose (après quelques jours de stimulation).

1.2.1. Effet du PGF canin sur la synthèse d'ADN: optimisation des conditions expérimentales

Le bioessai utilisé pour quantifier l'effet mitogénique du PGF suppose que les cellules épithéliales prostatiques canines quiescentes doivent entrer dans le cycle cellulaire (phases G₀, G₁) lorsqu'elles sont mises en culture et traverser les phases S et G₂ pour ensuite se diviser (phase M). Des travaux antérieurs (Chevalier *et al.*, 1981) ont déjà démontré que ces cellules atteignent un maximum de synthèse d'ADN après trois jours de culture primaire. L'optimisation des conditions expérimentales est donc effectuée avec de telles cellules. À cette fin, la source de PGF utilisée provient d'ultrafiltrat (U<30) de sérum de chien, testé à un équivalent de 15% à 20% de sérum.

La figure 23A montre que l'incorporation de thymidine marquée dans l'ADN des cellules prostatiques augmente en fonction du temps. Cette augmentation est linéaire pendant 10h, est moins rapide de 10h à 30h, puis diminue jusqu'à 80h. La présence de PGF (U<30) augmente l'incorporation de thymidine tritiée dès 6h, mais l'effet est plus marqué entre 10h et 24h. La détermination du nombre de cellules de façon parallèle, indique une augmentation du nombre de cellules, en présence d'U<30, après 30h de culture (figure 23B). Ces résultats suggèrent que les cellules sont relativement synchrones à la suite de leur adhésion et étalement, puis qu'elles traversent effectivement la phase de synthèse d'ADN (phase S) pour ensuite entrer en mitose et se diviser (phase M).

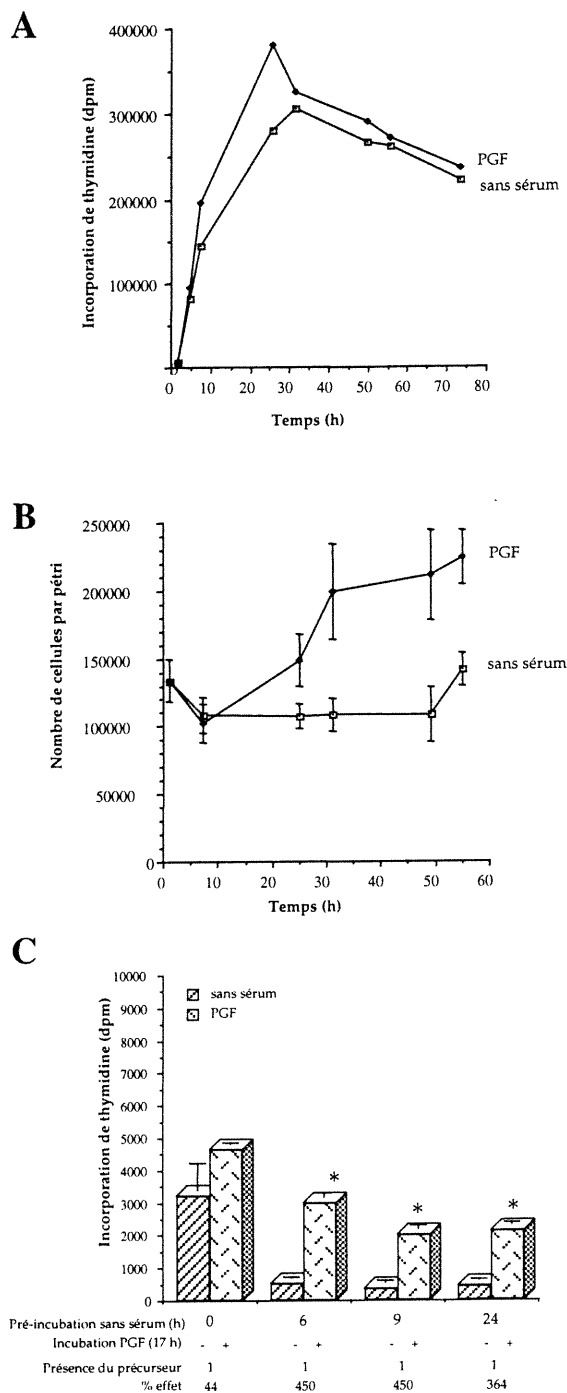


Figure 23 Optimisation de l'essai d'incorporation de thymidine-³H dans l'ADN des cellules prostatiques canines

A Cinétique d'incorporation de la thymidine-³H dans l'ADN des cellules prostatiques cultivées dans un milieu sans sérum, avec ou sans PGF à compter du troisième jour post-ensemencement (sans privation). **B** Nombre de cellules, évalué par comptage au Coulter, correspondant à la cinétique présentée en (A). **C** Effet de la pré-incubation des cellules sans sérum avant l'ajout d'³H-U, le précurseur étant présent lors de la dernière heure. *Effet stimulation de l'³H-U significatif ($P < 0,001$)

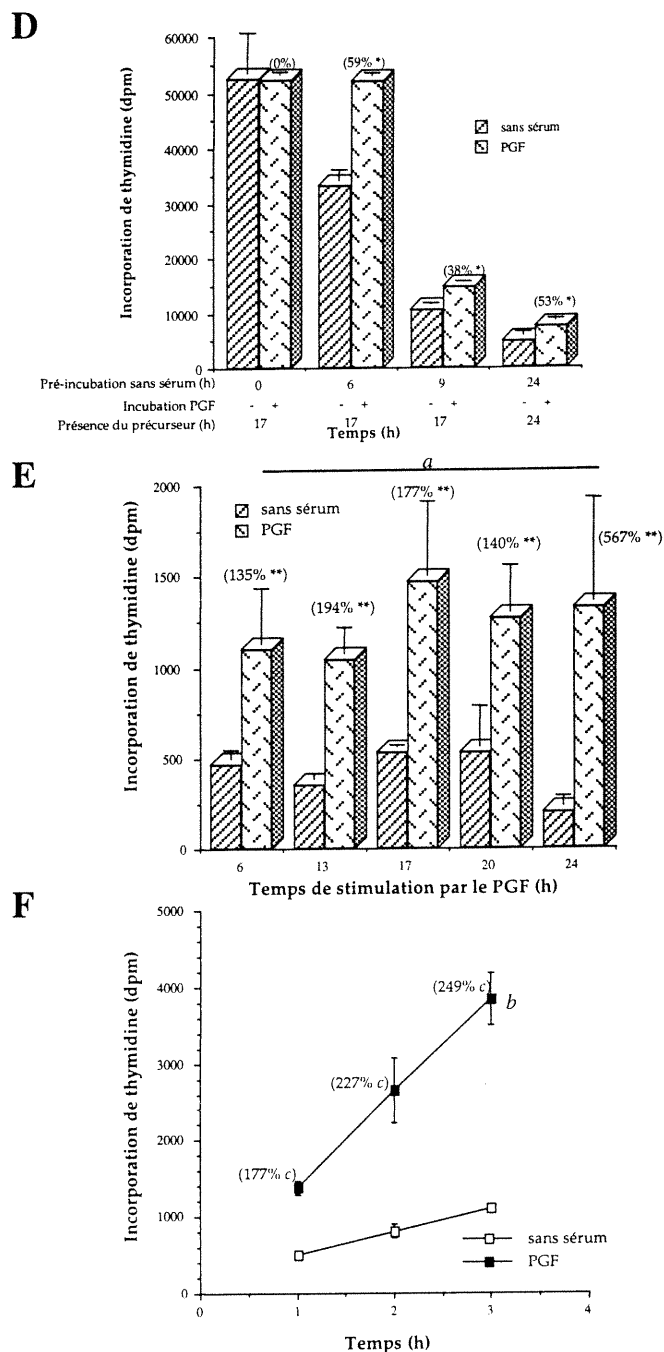


Figure 23 Optimisation de l'essai d'incorporation de thymidine-³H dans l'ADN des cellules prostatiques canines (suite)

D Identique à (C), mais le précurseur est présent tout au long de l'incubation avec l'U<30. *absence de stimulation ($P<0,001$) **E** Détermination du temps d'incubation requis en présence d'U<30 pour observer son effet sur la synthèse d'ADN, suite à une période de privation (6h), le précurseur étant ajouté lors de la dernière heure. **stimulation par l'U<30 significative ($P<0,001$) **F** Cinétique d'incorporation de la thymidine-³H suite à la privation de sérum (6h) et l'ajout d'U<30 (18h), celle-ci étant ajoutée lors des dernières heures d'incubation. **stimulation significative ($P<0,001$); a: aucune différence ($P = 0,74$); b: augmentation linéaire ($P<0,001$); c: stimulation significative ($P=0,003$)

Comme chaque culture primaire représente l'activation de cellules isolées de différentes prostates, il est impossible de contrôler le taux d'adhésion des cellules, de même que la cinétique exacte de leur entrée dans le cycle cellulaire. Cette variabilité pouvant aussi se refléter dans l'effet de l'U<30 sur la synthèse d'ADN, le but de cette série d'expériences est de définir les conditions optimales de pré-incubation des cellules dans un milieu dépourvu de sérum ainsi que la durée de stimulation par le PGF requise pour quantifier la synthèse d'ADN, telle que mesurée par l'ajout de thymidine tritiée.

La privation de sérum diminue le taux d'incorporation de thymidine lorsque celle-ci est présente lors de la dernière heure uniquement (figure 23C). Il semblerait donc que les cellules soient ramenées à un niveau de synthèse d'ADN de base par la privation de sérum. Par contre, l'ajout d'U<30 pendant 17h augmente l'incorporation de thymidine de 350% à 450% par rapport aux cellules non stimulées (figure 23C). L'effet de l'U<30 dépend du temps de privation ($P < 0,001$), avec un effet maximal obtenu lors de 6 heures de privation. La présence continue du précurseur (thymidine) tout au long de l'incubation avec l'U<30 (figure 23D) diminue l'effet relatif de l'U<30 (38% à 59%) et peut même le masquer si les cellules n'ont pas préalablement été privées de sérum (temps zéro, figure 23D). L'effet du temps d'incubation varie en fonction de la présence de la thymidine tritiée ($P < 0,001$), c'est-à-dire qu'il y a absence d'effet de l'U<30 lorsque la thymidine tritiée est présente pendant toute la durée de l'incubation avec la source de PGF. Il est donc décidé de n'ajouter la thymidine tritiée qu'à la fin de l'incubation des cellules avec la source de PGF (dans ce cas-ci, l'U<30).

L'effet de la variation de la durée d'exposition des cellules au PGF est alors étudié et est illustré à la figure 23E. L'exposition des cellules au PGF pendant 6h à 24h suivant la période de privation de sérum (6h) permet d'observer des augmentations de la synthèse d'ADN de l'ordre de 135% à plus de 560%. L'analyse statistique révèle que la stimulation par l'U<30 est significative ($P < 0,001$), mais qu'aucune différence significative n'est observée selon la durée de la

stimulation par l'U<30 ($P = 0,74$). Dans le but d'augmenter le nombre de désintégrations par minute afin d'observer un effet d'une plus grande amplitude et sur une plus grande échelle, la cinétique d'incorporation de thymidine à l'ADN est évaluée lorsque la thymidine est ajoutée pendant la dernière heure d'incubation comparativement aux deux et aux trois dernières heures. Tel que représenté à la figure 23F, la cinétique d'incorporation de thymidine est linéaire lorsque la thymidine est ajoutée pendant les trois dernières heures d'incubation quand les cellules sont privées de sérum pendant 6h et que le PGF est présent pendant les 17h suivantes ($P < 0,001$). De plus, l'effet stimulateur de l'U<30 est nettement démontré dans cette expérience ($P = 0,003$). Les conditions optimales sont donc établies comme suit: 6h de privation de sérum, 17h d'incubation en présence de la source de PGF et ajout de la thymidine- ^3H pendant les dernières heures de culture (1 à 3 heures avant l'arrêt de la culture).

Dans le but de valider l'utilisation de cette méthode, la fraction libre du PGF canin (U<30) est chromatographiée sur Bio-Gel P-2 afin de séparer les peptides selon leur poids moléculaire apparent. Les différentes fractions recueillies sont testées par la mesure de la synthèse d'ADN. Les fractions actives migrent en un seul pic, localisé à la position du standard de 1,5 kDa (figure 24A). Lorsque ces fractions sont regroupées et testées quant à leur activité sur la synthèse d'ADN, il est possible d'observer un effet dose-dépendant (figure 24B). L'analyse statistique révèle une augmentation relativement linéaire de l'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN avec la dose de PGF (2,896 dpm/unité de PGF; $P = 0,009$). De plus, l'activité du PGF diminue de plus du deux tiers suite à son hydrolyse acide (figure 24C). En compilant les données des 2 expériences réalisées indépendamment, l'activité résiduelle de la fraction traitée à 110°C n'est pas significative ($P = 0,31$) par rapport au contrôle sans sérum. Ces derniers résultats confirment que le PGF canin a un poids moléculaire apparent de 1,5 kDa et appuient une nature peptidique (hydrolyses acide et enzymatique) (Chevalier *et al.*, 1993).

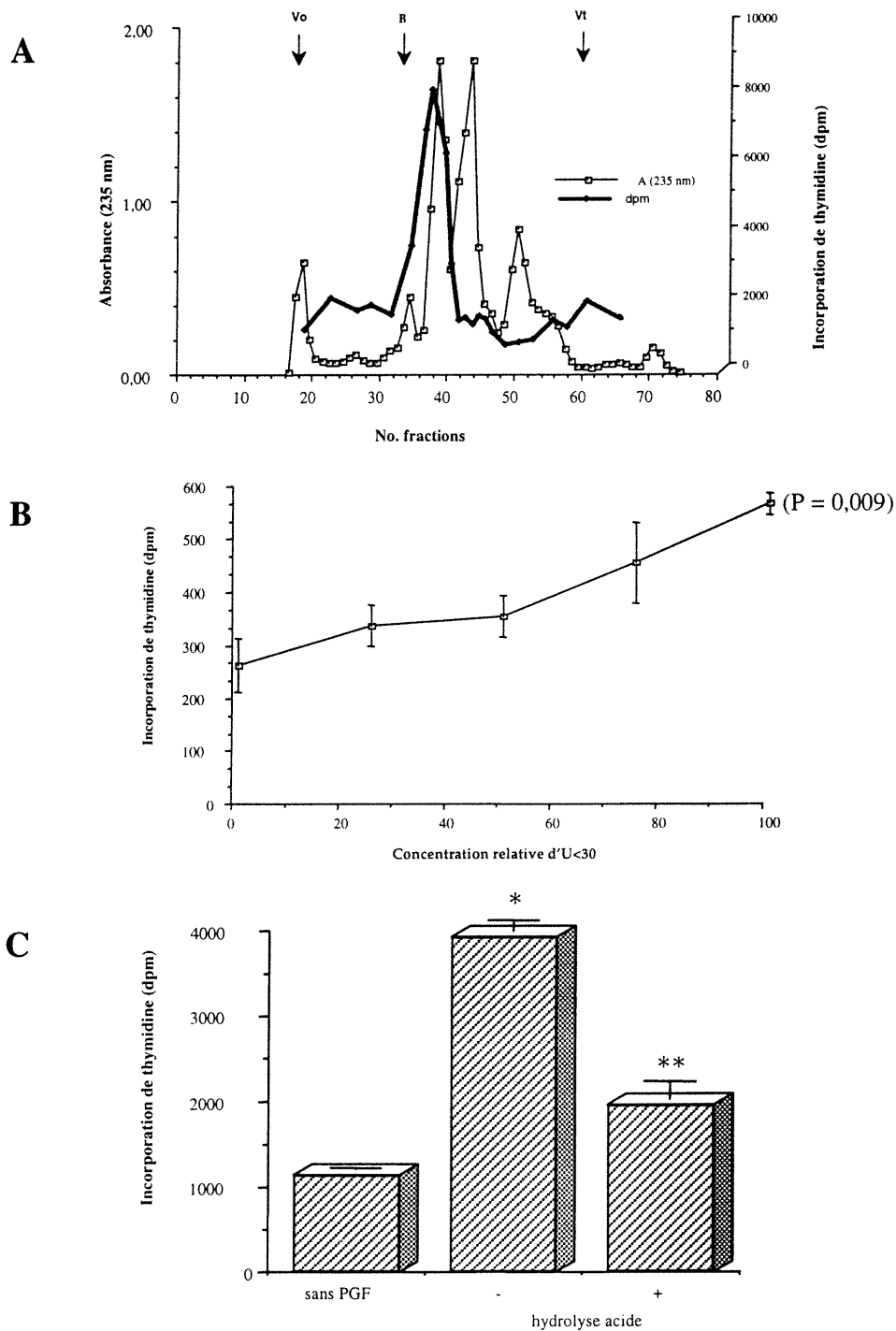


Figure 24 Validation du test d'incorporation de thymidine-³H dans l'ADN des cellules prostatiques canines

A Chromatographie du U<30 canin sur une colonne de Bio-Gel P-2 et mesure de l'effet des fractions recueillies sur la synthèse d'ADN. **B** Les fractions du pic d'activité de l'U<30 en (A) sont regroupées et testées à différentes doses. **C** Effet de l'hydrolyse acide sur l'activité de l'U<30 telle que mesurée par la synthèse d'ADN. Vo = volume mort de la colonne; B = position d'éluion de la bacitracine (1,5 kDa); Vt = volume total de la colonne; comparaison versus sans PGF: *P<0,001; **P=0,31

Ceci est en accord avec les résultats obtenus antérieurement, par comptage des cellules au Coulter, qui démontraient que le sérum canin peut stimuler à la fois la synthèse d'ADN et le nombre de cellules épithéliales prostatiques canines (Chapdelaine et Chevalier, 1985; Chevalier *et al.*, 1991).

Les conditions optimales de mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée établies peuvent servir adéquatement à déterminer les fractions actives, après chromatographie sur Bio-Gel P-2, à partir d'un ultrafiltrat de sérum de chien. Cette technique a donc été adoptée pour mesurer l'effet du PGF canin sur les cellules au cours de sa purification.

Toutefois, ses limites sont apparues rapidement lorsque les échantillons contenant de l'acétonitrile et/ou du TFA (avec ou sans PGF partiellement purifié), même après lyophilisation, ont inhibé drastiquement l'incorporation de thymidine (résultats non montrés). Ceci, ajouté au nombre élevé d'échantillons à tester, ainsi que les faibles quantités de produit récupéré au fil des étapes de purification, nous a incité à valider d'autres tests quantitatifs.

1.2.2. Comparaison de diverses méthodes pour quantifier l'effet mitogénique du PGF

La possibilité d'utiliser des plaques à 96 puits a incité à la comparaison de la quantification indirecte du nombre de cellules en déterminant l'activité d'une enzyme mitochondriale (test au MTT; Romijn *et al.*, 1988), la quantité de protéines (absorbance du bleu de méthylène solubilisé; Oliver *et al.*, 1989) et la quantité d'ADN (par la fluorescence émise par divers agents s'intercalant entre les bases de l'ADN: Hoechst 33258 et 33342, Éthidium homodimère-1, YO-PRO; Rago *et al.*, 1990).

La figure 25A montre la captation du bleu de méthylène par les cellules canines en culture primaire. Les cellules sontensemencées à diverses concentrations (0 à 100×10^3 cellules) et l'effet de la présence de 10% de sérum de

chien (source de PGF) vs l'absence de sérum de chien (sans sérum) peut être observé lorsque la concentration de cellules varie de 5×10^3 à 40×10^3 cellulesensemencées. Dans les puits adjacents, les cellules (10×10^3) sont cultivées en présence d'une quantité croissante (0 à 25%) de sérum de chien et l'augmentation de la coloration est visible dès que les cellules sont en présence de sérum (0,5%). La figure 25B présente l'extraction du bleu de méthylène, suivie de la mesure de son absorbance à 650 nm pour les puits contenant diverses concentrations de cellulesensemencées et traitées avec ou sans sérum. L'augmentation observée en fonction du nombre de cellulesensemencées est significative ($P < 0,001$). L'augmentation de la densité optique en fonction de la présence du sérum est aussi significative ($P = 0,006$). De plus, la densité optique augmente plus rapidement en présence de sérum ($P < 0,001$). L'effet maximal du sérum (360%) est observé lorsque les cellules sontensemencées à 10×10^3 cellules par puits et, en accord avec des résultats antérieurs (Chevalier *et al.*, 1991), diminue (jusqu'à 50% de stimulation) lorsque la densité cellulaire est élevée en raison de l'inhibition de contact. La réponse des cellules au sérum de chien, représentée en pourcentage d'effet, est illustrée à la figure 25C et montre un effet croissant avec la dose ($P = 0,001$).

La comparaison de la technique du MTT (figure 25D) ainsi que de trois des quatre agents utilisés pour quantifier l'ADN (YO-PRO: figure 25E; Éthidium homodimère-1: figure 25F; Hoechst 33258: figure 25G), testés au cours d'une même culture, montre dans tous les cas une augmentation du produit de la réaction en fonction du nombre de cellulesensemencées. Dans le cas de la technique au MTT, l'augmentation de la densité optique en fonction du nombre de cellules est significative ($P < 0,001$), mais à un taux décroissant avec le nombre de cellules (c'est-à-dire que le terme quadratique est significatif car négatif, $P < 0,001$). L'ajout de sérum augmente de façon significative l'activité enzymatique résultant en une transformation plus élevée de cristaux de MTT ($P < 0,001$). La technique du MTT semble la plus sensible: diminution de l'effet selon l'augmentation du nombre de cellules (effet maximal de 330%).

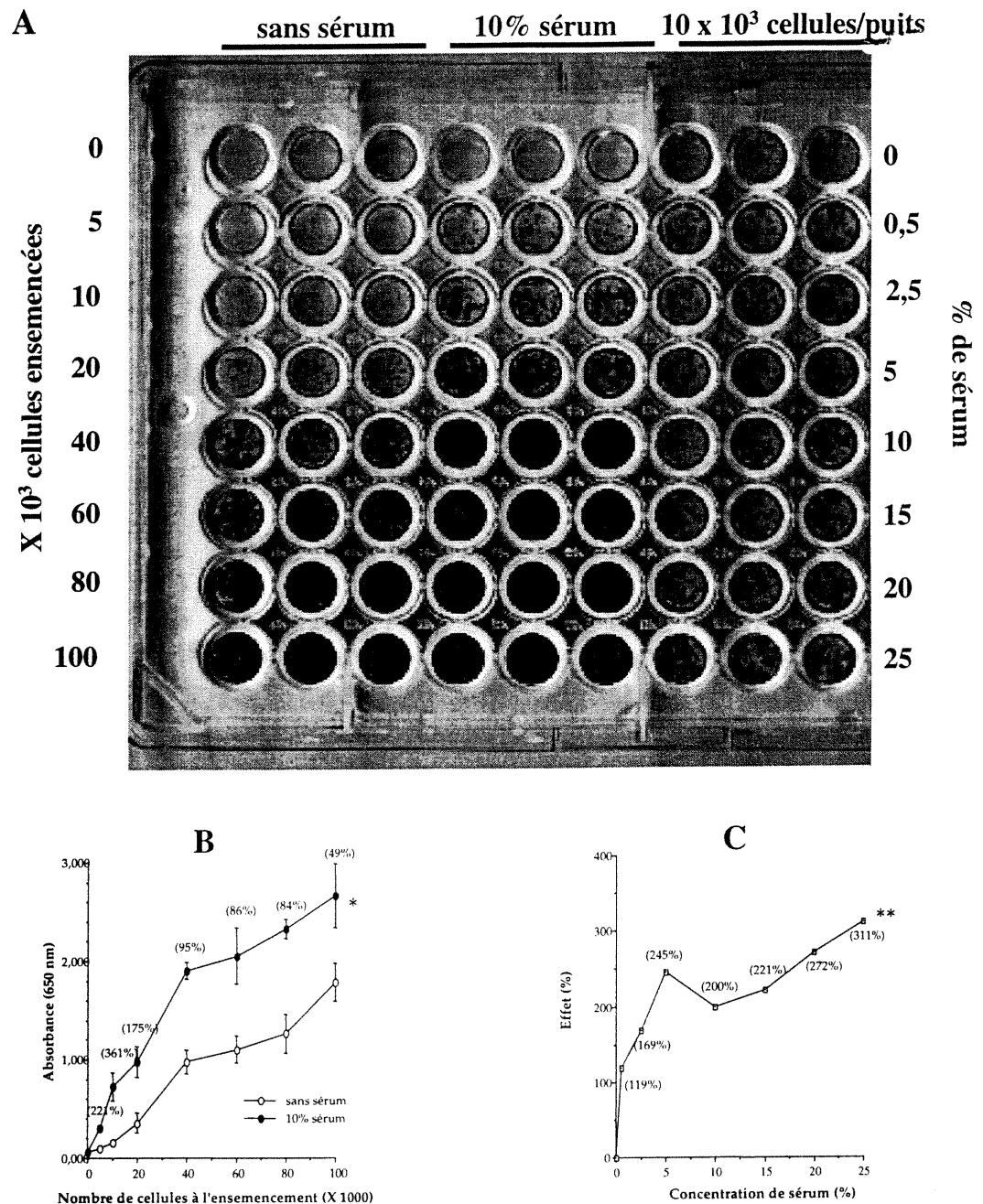


Figure 25 Comparaison de diverses méthodes pour quantifier l'effet du sérum sur la prolifération des cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire

A Quantité croissante de cellules ensemencées ayant reçues, au jour 3, du milieu frais sans sérum ou avec 10% de sérum homologue (triplicatas). 10 x 10³ cellules/puits ont aussi été ensemencées et ont reçu, au jour 3, une quantité croissante de sérum (0 à 25%). Les feuillets sont colorés au bleu de méthylène. **B** Le colorant capté par les feuillets en (A) est solubilisé et l'absorbance est mesurée. Effet de 0 vs 10% de sérum selon le nombre de cellules ensemencées. *P<0,001 **C** Effet dose-réponse du sérum canin sur une quantité fixe de cellules ensemencées (10 x 10³). Colorant solubilisé et mesure de l'absorbance. **P=0,001

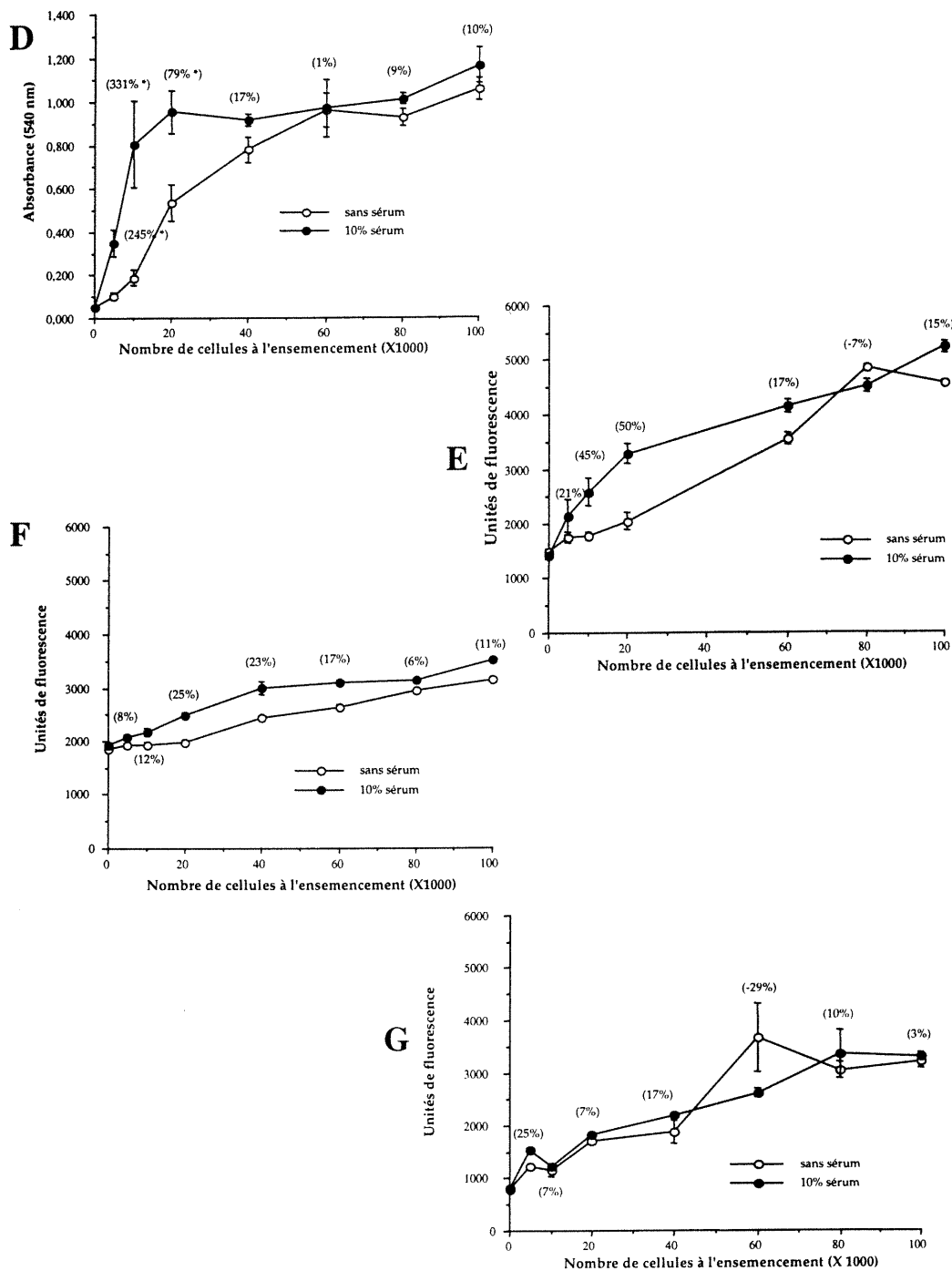


Figure 25 Comparaison de diverses méthodes pour quantifier l'effet du sérum sur la prolifération des cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire (suite)

D Idem à (B), mais l'effet du sérum est évalué par la méthode du MTT. * $P < 0,001$ **E** Idem à (B), mais l'effet du sérum est évalué par la quantification de l'ADN avec le fluorochrome YO-PRO. **F** Idem à (B), mais l'effet du sérum est évalué par la quantification de l'ADN avec le fluorochrome Éthidium homodimère-1. **G** Idem à (B), mais l'effet du sérum est évalué par la quantification de l'ADN avec le fluorochrome Hoechst 33258.

H

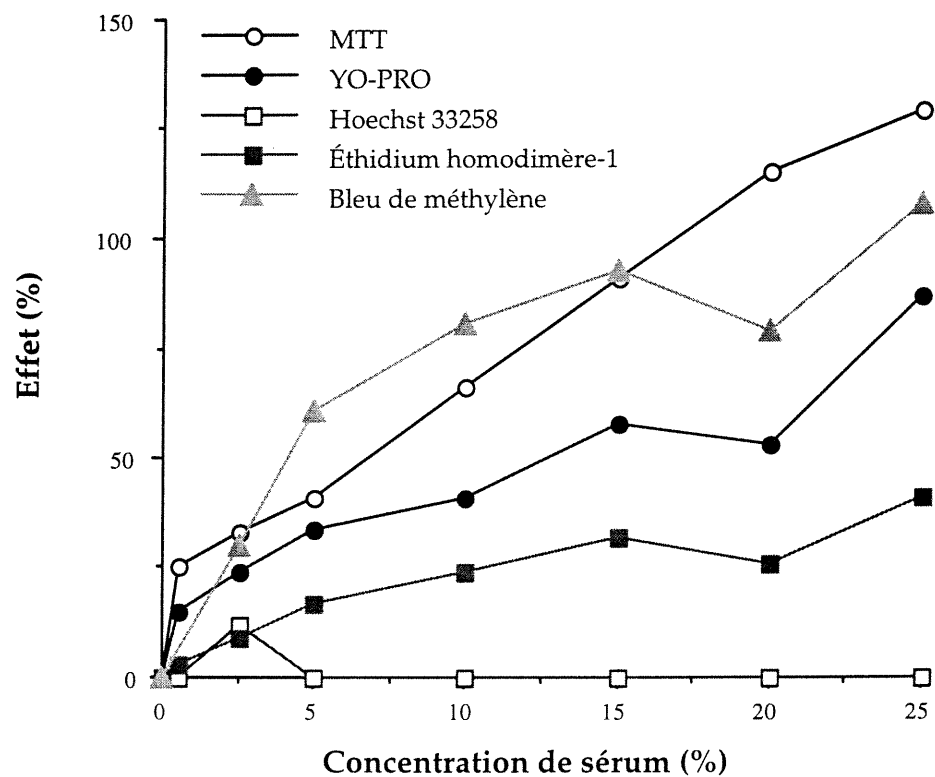


Figure 25 Comparaison de diverses méthodes pour quantifier l'effet du sérum sur la prolifération des cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire (suite)

H Comparaison des différentes méthodes sur l'effet dose-réponse du sérum canin sur un nombre fixe (20×10^3) de cellules ensemencées. Les valeurs représentent les moyennes de triplicatas des puits avec sérum comparativement aux puits sans sérum.

De plus, le MTT et le bleu de méthylène sont aussi les deux seules méthodes comparables pour mesurer l'effet du sérum selon la dose utilisée (figure 25H). Dans l'ordre décroissant de représentation de l'effet du sérum viennent le MTT, le bleu de méthylène, puis le YO-PRO et l'éthidium homodimère-1, alors qu'aucun effet n'est observé en utilisant les deux fluorochromes Hoechst (résultats du Hoechst 33324 non montrés). Dans tous les cas, sauf pour le Hoechst 33258, la régression polynomiale est significative ($P < 0,001$), dénotant l'effet du sérum en fonction de la dose.

L'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN est donc un test rapide (environ 24h) qui est très valable si l'échantillon ne cause pas d'interférences. Par ailleurs, le test au MTT est devenu d'application courante pour mesurer la prolifération des cellules *in vitro* puisque aucune interférence n'a été observée avec les différentes préparations utilisées (résultats non montrés).

1.3. Activité du PGF canin sur des lignées cellulaires prostatiques humaines

Afin d'étudier l'effet du PGF canin sur différentes lignées cellulaires prostatiques cancéreuses humaines, leur synthèse d'ADN est mesurée en absence et en présence d'une fraction partiellement purifiée de PGF canin (P-30, 75 μg). Des expériences préliminaires ont dû être réalisées afin de définir les conditions permettant d'utiliser l'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN comme test à partir des lignées puisque celles-ci ont la propriété de générer elles-mêmes les facteurs nécessaires à leur prolifération. Le temps de privation de sérum fut augmenté à 24 heures dans le but de ramener le plus possible de cellules en G_0 (synchronisation partielle). Tel qu'illustré à la figure 26 (expérience-type), le PGF stimule la synthèse d'ADN des lignées cellulaires androgéno-indépendantes. Cet effet est relié au phénotype agressif de ces cellules: PC-3M > PC-3 > DU 145. Aucune activité significative n'est observée sur les cellules androgéno-dépendantes, LNCaP (figure 26D) et les fibroblastes de souris (résultats non montrés). Des résultats plus récents en utilisant la technique du MTT, telle

qu'adaptée (figure 25), sont venus appuyer clairement l'effet des sérums humains et des PGF canin et humain partiellement purifiés, actifs sur la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses androgéno-indépendantes et inactifs sur la lignée androgéno-dépendante. Le PGF aurait donc une certaine spécificité, épithéliale *versus* fibroblastique. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés sur les fibroblastes prostatiques (Chapdelaine et Chevalier, 1985; Chevalier *et al.*, 1991).

1.4. Électrophorèse bi-dimensionnelle

Dans le but d'évaluer la pureté des préparations de PGF, l'amélioration de la séparation des peptides sur gel de polyacrylamide a été entreprise. Après de nombreux essais, la meilleure résolution, ou séparation sur gel, est obtenue avec un gel de 22% d'acrylamide (résultats non montrés). La séparation du PGF par électrophorèse en deux dimensions (2-D), sans avoir à recourir à la technique de focalisation isoélectrique, semble s'avérer prometteuse. En effet, un échantillon relativement pur de PGF séparé en 2-D (1ère dimension en conditions non-dénaturantes et 2e dimension en conditions dénaturantes) sur des gels de 22% d'acrylamide colorés à l'argent montre un produit majoritaire migrant à la position du standard de la bacitracine, soit 1,5 kDa (figure 27). Cette séparation en deux dimensions, couplée au transfert des peptides sur membrane ProBlott, permet d'obtenir des séquences partielles des peptides migrant à cette position. Toutefois, ces peptides (synthèse chimique) se sont avérés inactifs. La chromatographie à haute résolution (HPLC) a permis de démontrer que l'activité du PGF migre à la même position que des peptides présents en quantité minoritaire dans la préparation.

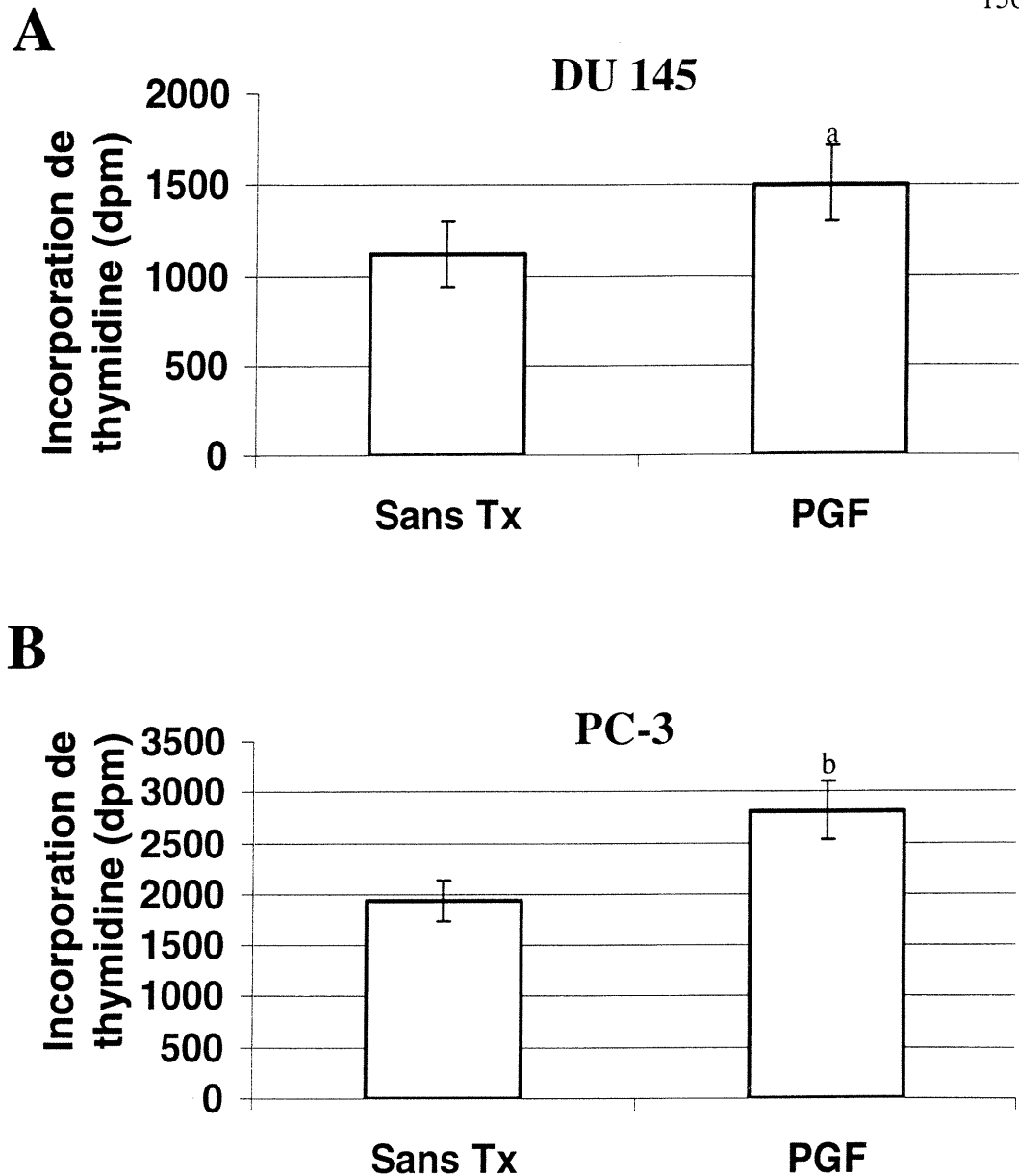


Figure 26 Effet du PGF sur la synthèse d'ADN de lignées cellulaires cancéreuses prostatiques humaines

L'effet du PGF sur les lignées cancéreuses est mesuré par l'incorporation de thymidine-³H à l'ADN selon les conditions établies pour les cellules canines en culture primaire. **A** DU 145 (^aeffet du PGF: P=0,119) **B** PC-3 (^beffet du PGF: P=0,023) Les cellules sont privées de sérum pendant 24h, le PGF est ajouté pendant 17h et la thymidine tritiée est présente lors des trois dernières heures d'incubation en présence du PGF. Les résultats d'une expérience-type sont représentés (moyenne ± écart-type). Les essais sont faits en triplicata.

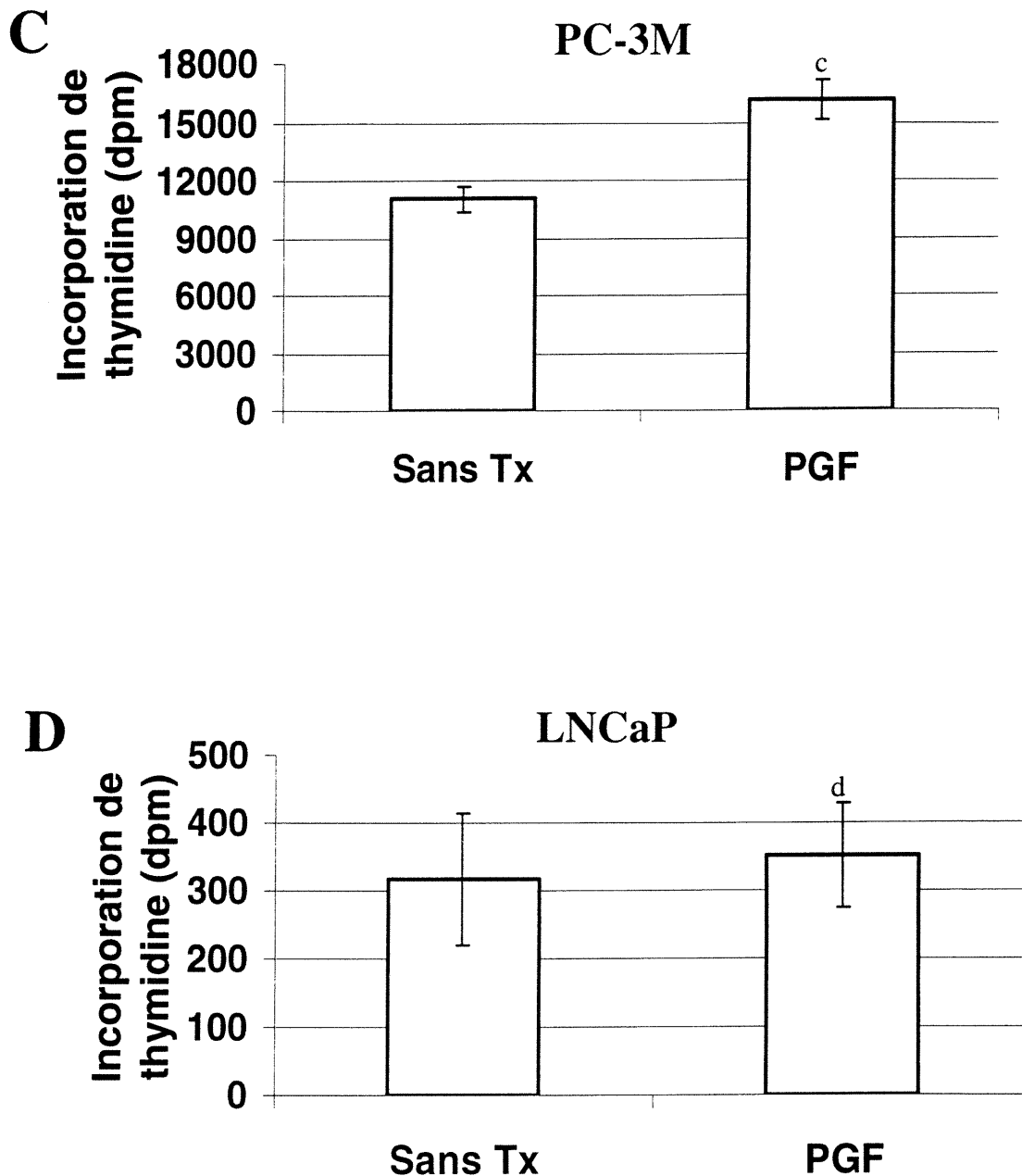


Figure 26 Effet du PGF sur la synthèse d'ADN de lignées cellulaires cancéreuses prostatiques humaines (suite)

L'effet du PGF sur les lignées cancéreuses est mesuré par l'incorporation de thymidine-³H à l'ADN selon les conditions établies pour les cellules canines en culture primaire. **C** PC-3M (^eeffet du PGF: P=0,004) **D** LNCaP (^deffet du PGF: P=0,717) Les cellules sont privées de sérum pendant 24h, le PGF est ajouté pendant 17h et la thymidine tritiée est présente lors des trois dernières heures d'incubation en présence du PGF. Les résultats d'une expérience-type sont représentés (moyenne ± écart-type). Les essais sont faits en triplicata.

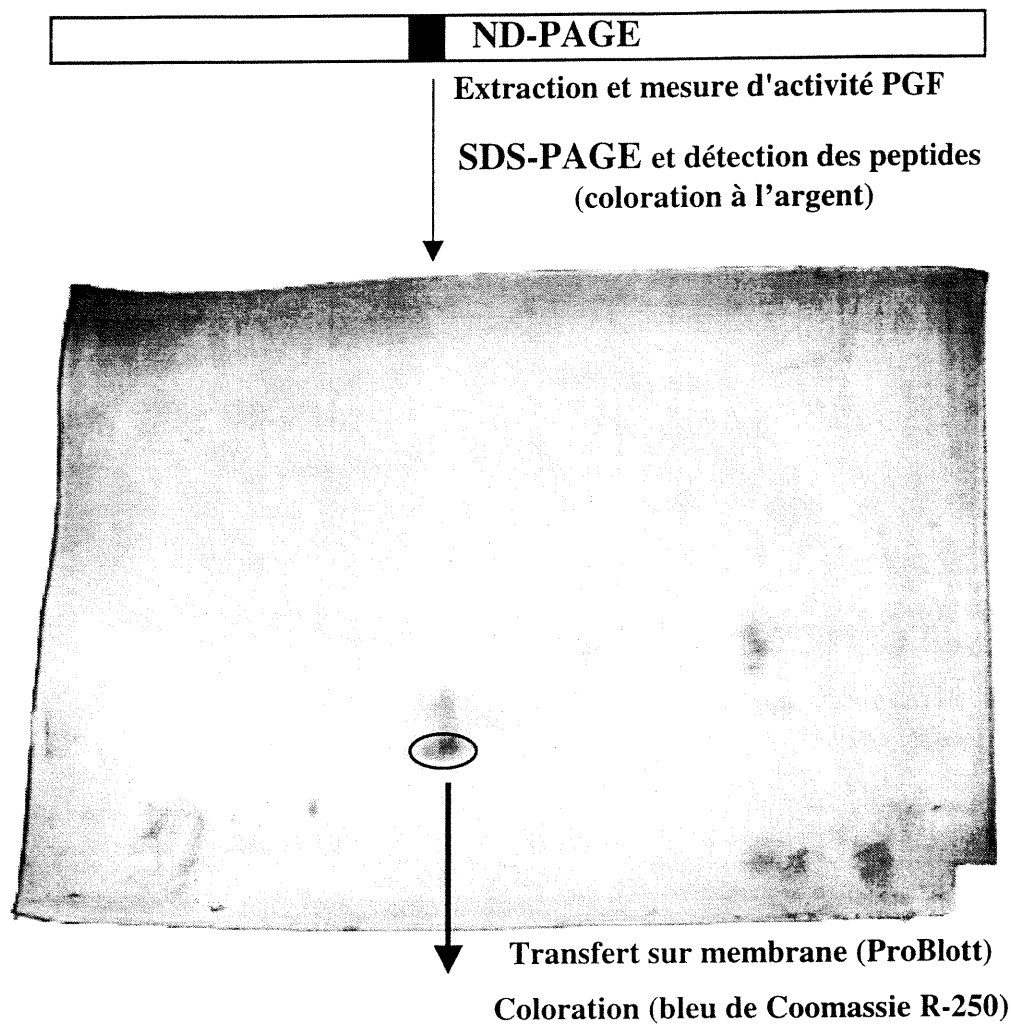


Figure 27 Séparation électrophorétique en deux dimensions du PGF canin libre partiellement purifié

Une préparation de PGF canin est séparée en première dimension dans des conditions non-dénaturantes (ND) sur gel de polyacrylamide (PAGE). Le gel est découpé en zones de 0,5cm et les différentes fractions sont testées sur les cultures primaires canines. La zone active est séparée dans une deuxième dimension, dans des conditions dénaturantes (SDS). Le gel est coloré à l'argent afin de visualiser les peptides contenus dans l'échantillon. Parallèlement, un autre gel est transféré sur membrane ProBlott et celle-ci est colorée au bleu de Coomassie. (Se référer au chapitre Matériels et méthodes pour plus d'information.)

L'ensemble des résultats présentés dans cette section démontre l'importance du PGF pour la prolifération des cellules épithéliales prostatiques. L'obtention d'une séquence complète étant requise pour la suite des travaux (par exemple, étude de son récepteur et génération d'anticorps afin de développer un test radioimmunologique pour évaluer la quantité présente dans le sérum des patients), je n'ai pu poursuivre sur cette voie. Comme suite logique, j'ai plutôt contribué à l'avancement des travaux sur le PGF et les cellules prostatiques en étudiant les tyrosine kinases prostatiques.

2. PGF et tyrosine kinase

Par analogie avec les modèles courants de facteurs de croissance, nous avons postulé que le PGF devait agir *via* un récepteur membranaire qui serait soit doté d'une activité TK intrinsèque ou, s'il est dépourvu d'activité kinasique, d'une kinase associée à son récepteur. L'objectif de cette section est de vérifier cette hypothèse.

La première étape consiste à étudier la phosphorylation sur tyrosine des protéines extraites de cellules cultivées pendant 4 à 6 jours en absence ou en présence de sérum de chien, source principale de PGF. Ces conditions sont choisies parce que l'effet du sérum de chien sur le nombre de cellules, post-ensemencement, est maximal au cours de la première semaine de culture (Chevalier *et al.*, 1981; 1984). L'immunodétection des protéines phosphorylées sur tyrosine, réalisée avec un anticorps dirigé contre la phosphotyrosine (pY), montre que le niveau de pY d'une protéine de 50 kDa augmente lorsque les cellules sont cultivées en présence de sérum pendant quatre, cinq ou six jours, comparativement aux cellules privées de sérum (figure 28A). Par contre, l'immunodétection effectuée uniquement en présence du deuxième anticorps (chèvre anti-IgGs de lapin) montre aussi cette bande de 50 kDa et ce, uniquement dans les extraits de cellules cultivées en présence de sérum (résultats non montrés).

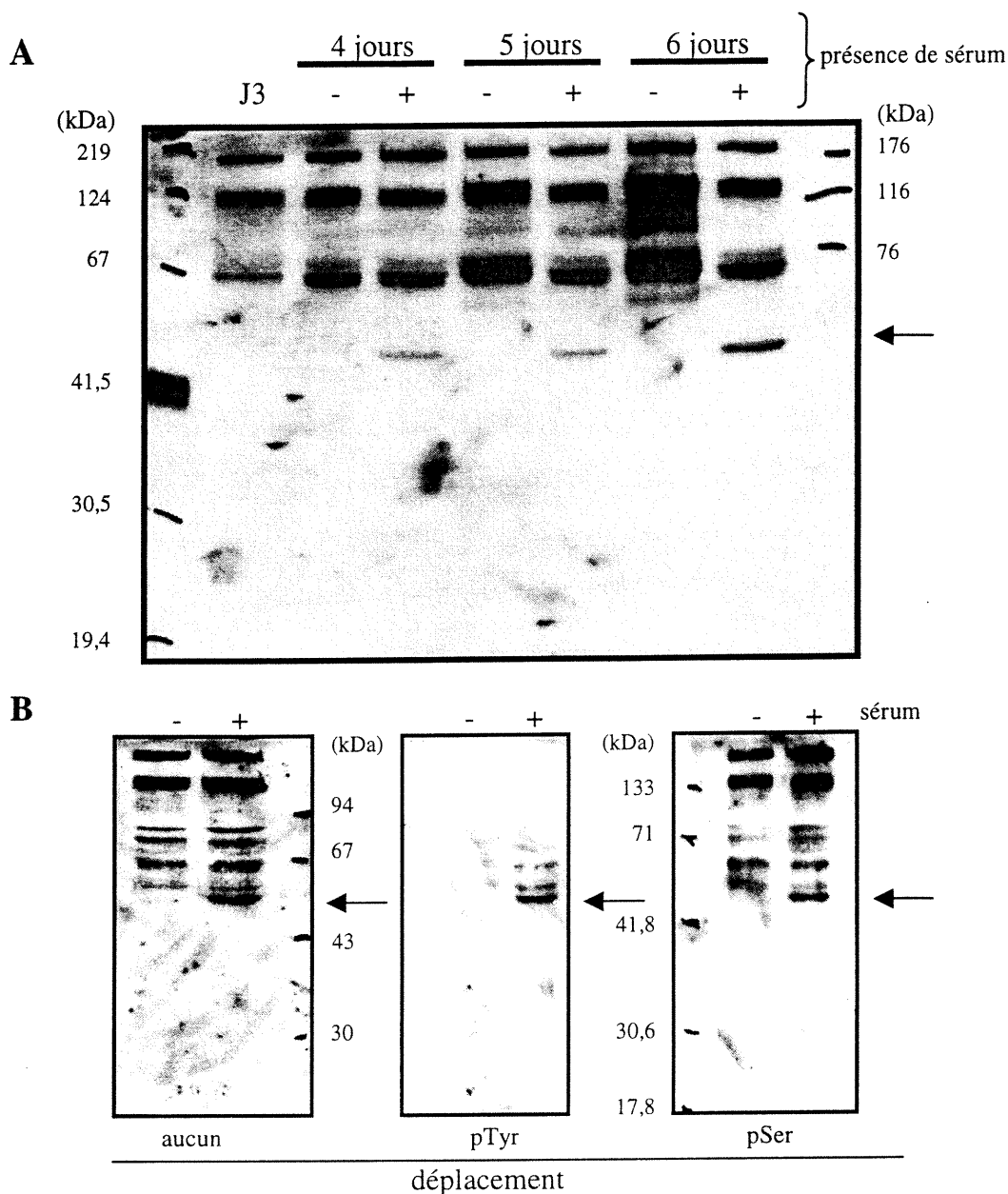


Figure 28 Effet du sérum sur le patron de phosphorylation des protéines sur tyrosine

A Les cellules prostatiques épithéliales canines sont cultivées en absence (-) ou en présence (+) de 10% de sérum de chien pendant 4, 5 ou 6 jours (à partir du 3^e jour de culture) avant d'être recueillies. L'immunodétection des extraits totaux (incluant un extrait de cellules au J3, avant les traitements) est réalisée avec l'anticorps contre la phosphotyrosine. **B** La spécificité de l'immunoréactivité (anti-phosphotyrosine) des protéines extraites de cellules prostatiques épithéliales canines cultivées pendant 3 jours (à partir du 3^e jour de culture) en absence (-) ou en présence (+) de 10% de sérum de chien est évaluée par l'ajout de 20mM de phosphotyrosine (pTyr) ou 20 mM de phosphosérine (pSer) à la solution contenant l'anticorps (contrôle sans déplacement). La position de la bande d'intérêt est indiquée par une flèche.

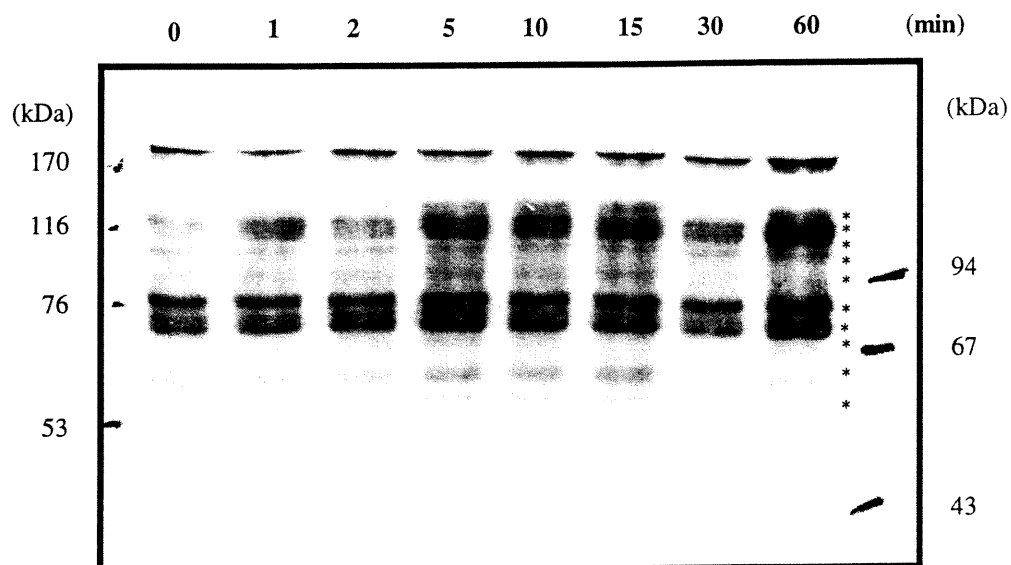


Figure 29 Effet du PGF sur le patron de phosphorylation des protéines sur tyrosine

Les cellules prostatiques épithéliales canines (après 3 jours de culture en présence de 10% de sérum canin) sont privées de sérum (24 heures), puis elles sont traitées avec du PGF partiellement purifié (P-30; 75 μ g/mL) pour les temps indiqués. Les protéines totales sont séparées par SDS-PAGE, transférées et immunodétectées avec un anticorps polyclonal dirigé contre la phosphotyrosine. Les bandes d'intérêt sont identifiées (*).

Puisque les immunoglobulines migrent à cette position, il est possible que cette augmentation ne soit pas reliée à l'activité PGF du sérum, mais plutôt à la présence accrue d'immunoglobulines provenant du sérum de chien présent dans le milieu de culture. Il est possible que ces immunoglobulines soient adsorbées sur les cellules et qu'il soit impossible de s'en débarrasser lors du lavage des cellules avec le PBS. Ceci est appuyé par les résultats présentés à la figure 28B où la spécificité de l'immunoréactivité de l'anticorps contre la pY est démontrée grâce à l'ajout d'un excès de pY (puits du centre). L'excès de pY réduit la détection de la majorité des bandes, à l'exception de trois bandes, incluant celle qui migre à 50 kDa. Un excès de phosphosérine (pS) ne modifie pas la détection observée avec l'anti-pY, confirmant que les bandes détectées sont des protéines phosphorylées sur tyrosine.

Une étude semblable a été réalisée à partir d'extraits prostatiques de cellules traitées avec une préparation semi-purifiée de PGF, soit la fraction active de la colonne P-30. Ceci permet de pallier à la présence des immunoglobulines du sérum de chien. L'immunodétection des protéines pY des cellules traitées pendant divers temps avec le PGF, représentée à la figure 29, montre une augmentation du niveau de pY de plusieurs protéines, notamment après 5 minutes de traitement. Les poids moléculaires approximatifs des bandes sont, par ordre décroissant, 138, 123, 117, 106, 93, 81, 74, 71, 61 et 57 kDa. Ces protéines pourraient entre autre correspondre à Fak (125 kDa), Fer (94 kDa), Src (60 kDa) et Lyn (56 kDa). Il semble donc que le PGF puisse activer la phosphorylation sur tyrosine de protéines présentes dans les cellules épithéliales prostatiques canines. La cinétique rapide de phosphorylation est compatible avec l'action des FC passant par un récepteur couplé à l'activation d'une TK. À ce stade, il ne faut toutefois pas éliminer la possibilité que l'effet du PGF sur le niveau de phosphorylation sur tyrosine des protéines reflète aussi l'inhibition de phosphatases.

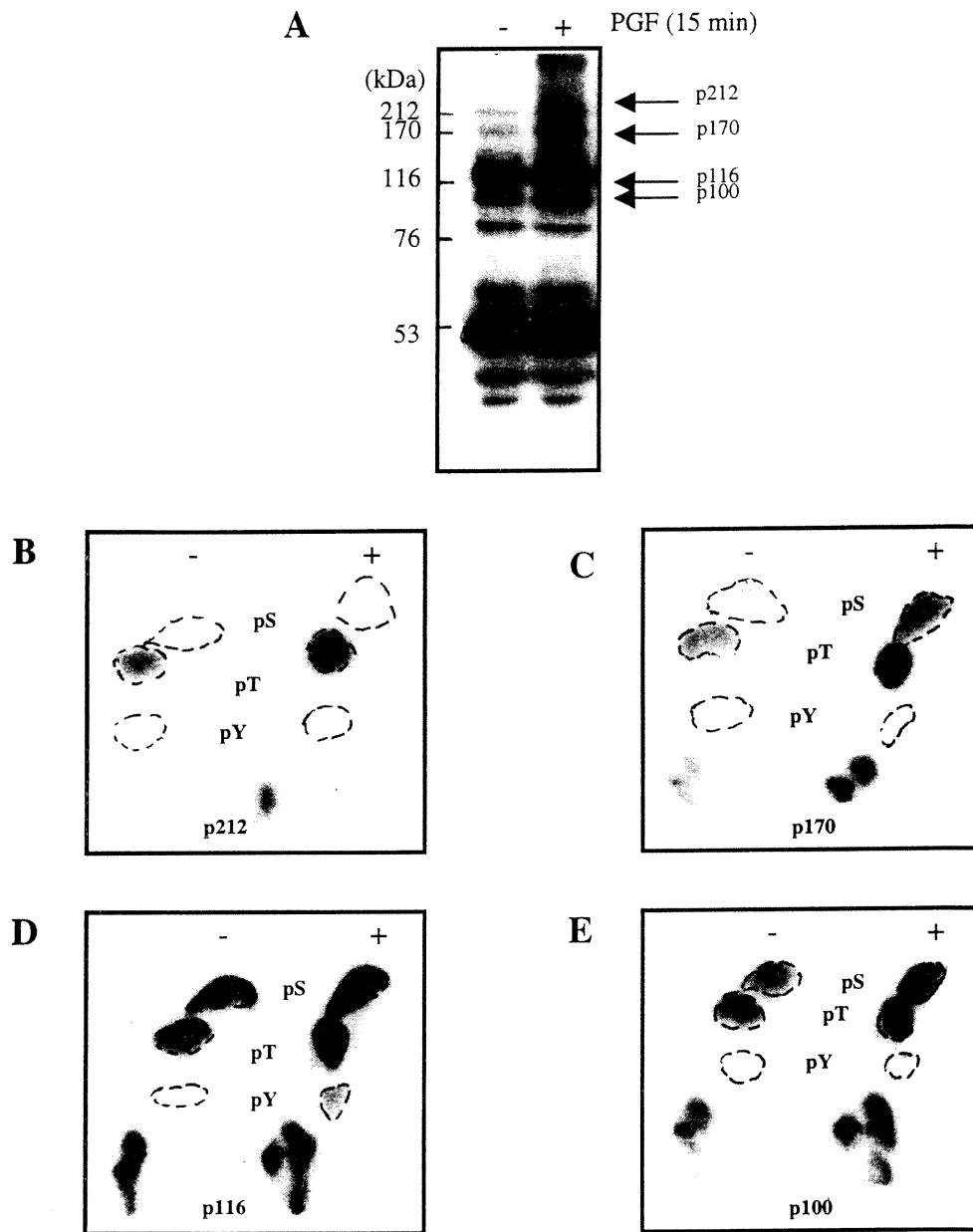


Figure 30 Activation de kinases par le PGF et analyse des acides aminés phosphorylés

A Les cellules prostatiques épithéliales canines (après 3 jours de culture en présence de 10% de sérum canin) sont privées de sérum (24 heures), puis elles sont traitées (+) ou non (-) avec du PGF partiellement purifié (P-30; 75µg/mL) pendant 15 minutes. Les protéines totales sont séparées par SDS-PAGE et renaturées, révélant ainsi l'activité des kinases. **B - E** Analyse des acides aminés phosphorylés des bandes indiquées par des flèches en (A). Le gel et les plaques de silice sont exposés à des films (en présence d'un écran intensifiant) afin de révéler leur contenu radioactif. Se référer au chapitre Matériels et méthodes pour plus de détails sur les techniques utilisées. pY: phosphotyrosine; pT: phosphothréonine; pS: phosphosérine.

Afin de vérifier si le PGF active des kinases, une technique de renaturation, mesurant l'activité kinasique des protéines déjà séparées dans des conditions natives (Durocher *et al.*, 1992), est utilisée. La figure 30A montre l'activité des kinases renaturées résistantes à un traitement alcalin suite à la stimulation des cellules par le PGF. Le traitement alcalin permet généralement d'augmenter la détection des protéines pY, dont les liens phosphates sur les tyrosines sont relativement mais non exclusivement plus résistants à l'hydrolyse que les liens phosphates sur les sérines et les thréonines. La renaturation (figure 30A) révèle une augmentation de l'activité des bandes identifiées par une flèche, suite au traitement des cellules avec du PGF (0 vs 15 min). L'analyse des acides aminés phosphorylés de chacune de ces bandes (de poids moléculaire approximatif de 212, 170, 116 et 100 kDa) est représentée aux figures 30B à 30E. Dans tous les cas, la quantité de radioactivité présente sur les résidus phosphothréonine (pT) et phosphosérine (pS) est clairement augmentée à la suite du traitement des cellules avec le PGF pendant 15 minutes. Puisque les niveaux endogènes de phosphotyrosine des protéines, comparativement à ceux des phosphosérine et phosphothréonine, sont relativement faibles, une façon d'augmenter la sensibilité du test d'activité kinasique est d'ajouter, à l'échantillon ou dans le gel, un substrat synthétique des tyrosine kinases, le poly(Glu, Tyr), un polymère d'acides glutamiques et de tyrosines. Ce substrat se répartit uniformément dans le gel et lorsque phosphorylé par les TK renaturées, il permet de changer considérablement la distribution de l'activité kinasique et de visualiser l'activité des TK peu importe leur position de migration. Ces dernières peuvent alors, en plus de s'autophosphoryler, phosphoryler le substrat juxtaposé et augmenter ainsi considérablement le seuil de détection (Durocher *et al.*, 1992).

Dans un gel contenant le poly(Glu, Tyr), et exposé pour une courte période, la seule bande stimulée migre à la position de 50 kDa (figure 31A). L'étude cinétique révèle que l'augmentation de l'activité de la p50 (figure 31A) est maximale à 5 min de traitement. L'analyse des acides aminés phosphorylés confirme qu'il s'agit d'une tyrosine kinase (figure 31B).

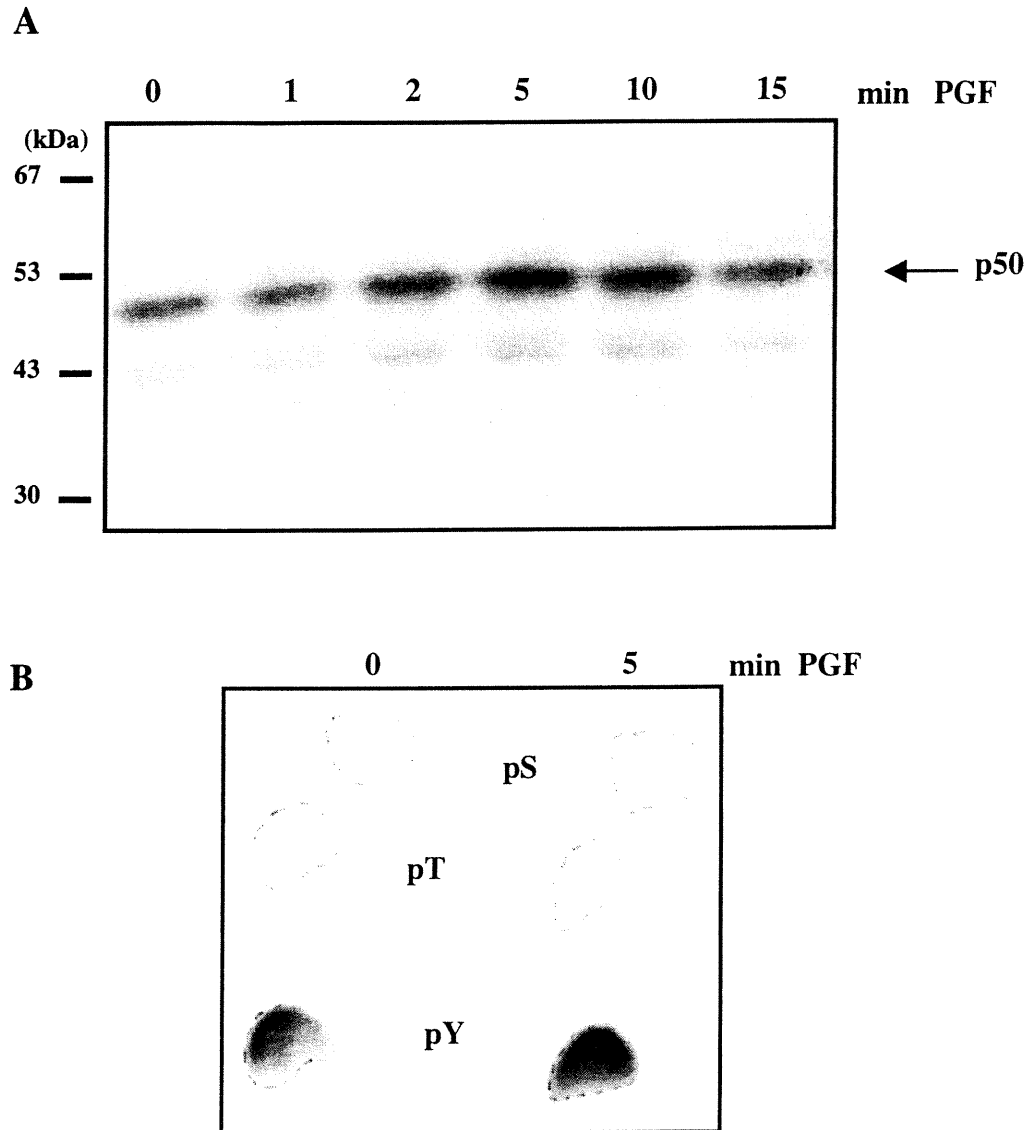


Figure 31 Activation d'une tyrosine kinase de 50 kDa par le PGF

Les cellules prostatiques épithéliales canines (après 3 jours de culture en présence de 10% de sérum canin) sont privées de sérum (24 heures), puis elles sont traitées avec du PGF partiellement purifié (P-30; 75 μ g/mL) pour les temps indiqués. **A** Les extraits totaux sont séparés sur SDS-PAGE et les kinases sont renaturées en présence de poly(Glu, Tyr). **B** Analyse des acides aminés phosphorylés de la bande de 50 kDa. Les gels et les plaques de silice sont exposés avec un écran intensifiant afin de révéler leur contenu radioactif.

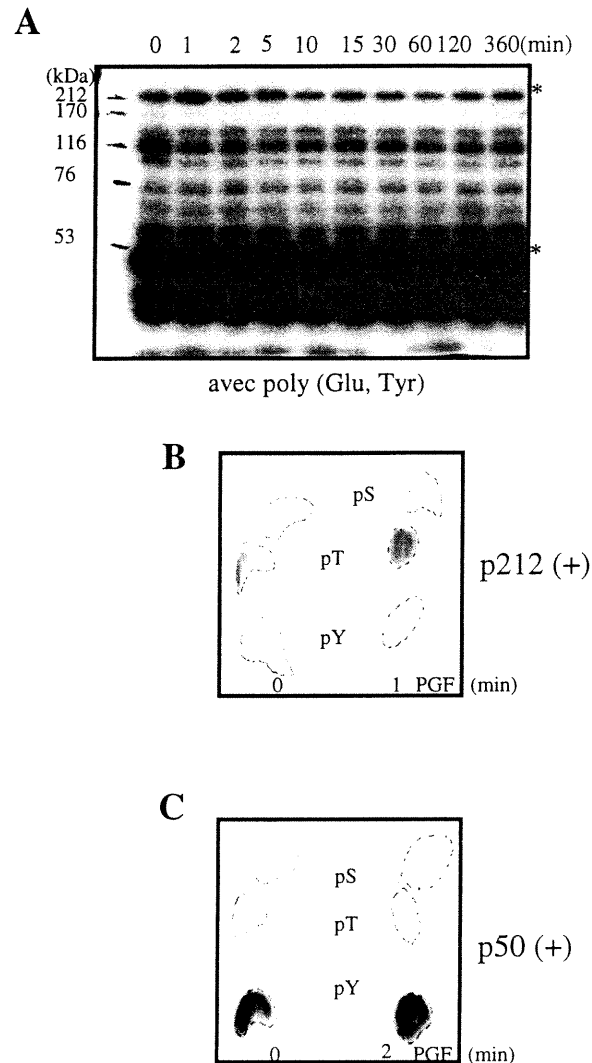


Figure 32 Comparaison de l'activation de kinases par le PGF en présence de poly(Glu, Tyr) et analyse des acides aminés phosphorylés

Les cellules prostatiques épithéliales canines (après 3 jours de culture en présence de 10% de sérum canin) sont privées de sérum (24 heures), puis elles sont traitées avec du PGF partiellement purifié (P-30; 75µg/mL) pour les temps indiqués. Les extraits totaux sont séparés sur SDS-PAGE, les kinases sont renaturées en présence (+) de poly(Glu, Tyr) (A). B-C Analyse des acides aminés phosphorylés par électrophorèse sur couche mince. Les gels et plaques de silice sont exposés avec un écran intensifiant afin de révéler leur contenu radioactif.

Par ailleurs, l'exposition prolongée des gels fait apparaître de nombreuses autres kinases, parmi lesquelles les kinases de faible poids moléculaire sont les plus actives. Dans ce cas, l'effet du PGF sur la p50 est progressivement masqué avec le temps d'exposition. Ceci permet d'observer l'effet du PGF sur une kinase de 212 kDa (figure 32A). L'analyse des acides aminés phosphorylés montre que la p50 contient uniquement de la phosphotyrosine (figures 32B) alors que la p212 ne présente que de la pT (figure 32C).

Comme c'est le cas pour la majorité des FC, l'action du PGF passe bel et bien par l'activation d'une TK de 50 kDa. Il est important de mentionner que la principale TK active retrouvée dans les cellules prostatiques canines en division fait 50 kDa (Nguyen *et al.*, 1996) et est distincte de Src, Csk et Lyn (Allard *et al.*, 1997). Cette TK de 50 kDa fait aussi partie d'un complexe de haut poids moléculaire (environ 130 kDa) (Nguyen *et al.*, 1996). Un complexe d'un poids moléculaire similaire est aussi détecté chez le chien castré et traité aux oestrogènes et comprend aussi des protéines de 55 et 60 kDa (Allard *et al.*, 1997). La tyrosine kinase de 50 kDa activée par le PGF est probablement la p50 retrouvée dans le complexe de haut poids moléculaire de la fraction membranaire de prostate de chien. Elle pourrait vraisemblablement être une kinase associée au récepteur du PGF.

3. Caractérisation de tyrosine kinases impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales

La connaissance des TK exprimées dans les cellules épithéliales prostatiques et jouant un rôle important dans leur prolifération est essentielle afin de bien identifier les mécanismes qui y prennent place et mieux définir les étapes cruciales menant au développement et à la progression du CaP. Bien que plusieurs récepteurs de facteurs de croissance aient été décrits dans la prostate (hyperplasique et/ou cancéreuse, ainsi que dans les lignées prostatiques cancéreuses), peu d'études rapportent leurs niveaux d'activation.

3.1. Expression de tyrosine kinases présentes dans les cultures primaires

Puisque les signaux émis par le PGF mènent à l'activation de TK de 50 kDa, la suite logique de mes travaux est donc d'étudier ces enzymes (TK) dans les cellules épithéliales prostatiques. Ces travaux ont pour objectif la caractérisation de certaines kinases requises pour la prolifération des cellules épithéliales prostatiques.

Des résultats du laboratoire ont déjà démontré que les cellules épithéliales prostatiques canines fraîchement isolées sont d'abord quiescentes puis se divisent lorsqu'elles sont cultivées en feuillet primaire (Chevalier *et al.*, 1981). La première approche consiste donc à bien définir les étapes menant à la prolifération de ces cellules lorsqu'elles sont mises en culture primaire. Le temps de doublement de ces cellules est estimé à 60h (Chevalier *et al.*, 1981). La présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, n'affecte en rien l'adhésion (d'une durée d'environ 24h) des cellules (observations au microscope, non montrées). L'étalement des cellules se produit environ 24h après leur adhésion, alors que les cellules entrent dans le cycle cellulaire. Ces résultats sont en accord avec des études démontrant la nécessité de l'adhésion des cellules normales à un substratum afin d'entrer dans le cycle cellulaire (Kuzumaki *et al.*, 1996; Le Gall *et al.*, 1998).

L'étape suivante consiste à étudier les TK des cellules épithéliales prostatiques en culture primaire. Les cellules fraîchement dissociées ($t=0$) sont quiescentes et il a été démontré que les cellules épithéliales de la prostate normale ne possèdent que très peu de protéines pY (Landry *et al.*, 1996). Ceci est en accord avec la faible activité TK de ces cellules (Nguyen *et al.*, 1996).

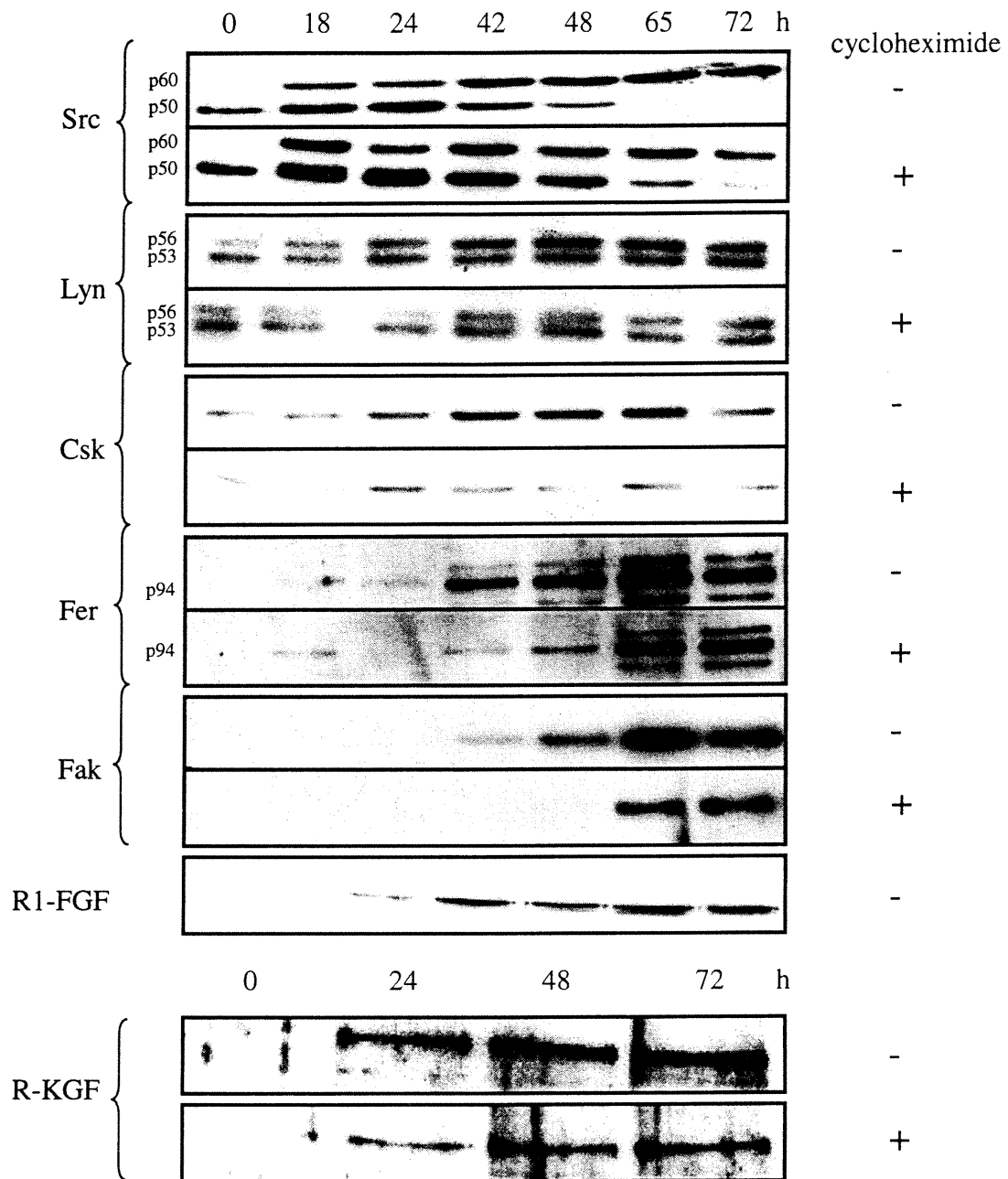


Figure 33 Cinétique d'expression des kinases des cellules prostatiques épithéliales canines en culture primaire

Les cellules épithéliales prostatiques canines sont cultivées pour les temps indiqués, en absence (-) ou en présence (+) de $1\mu\text{M}$ de cycloheximide. Des extraits protéiques de ces cellules sont séparés sur SDS-PAGE et l'immunodétection est réalisée avec des anticorps spécifiques à chaque protéine d'intérêt (soit, Src-1, Lyn, Csk, Fer, Fak, R1-FGF, R-KGF). (Se référer au chapitre Matériels et méthodes pour plus de détails.)

Plusieurs TK (Fak, Fer, le récepteur du KGF et p56Lyn) ont été identifiées par clonage lors du criblage d'une librairie d'ADNc à l'aide d'anticorps contre la phosphotyrosine (Nguyen, 1994). Cette librairie a été construite à partir de cellules prostatiques canines prélevées 72h post-ensemencement. La détermination des niveaux d'expression de ces TK en relation avec les étapes franchies selon le temps en culture fait donc suite à l'étude des niveaux de phosphorylation sur tyrosine de l'ensemble des protéines cellulaires. Src, une TK de 60 kDa, et Csk, son régulateur négatif (TK de 50 kDa), sont aussi choisies en raison de l'implication de Src dans de nombreuses voies de signalisation régulant l'adhésion, l'étalement et la prolifération cellulaire.

Puisque le R-KGF est un produit d'épissage alternatif du récepteur 1 du FGF (R1-FGF), l'expression de ce dernier est aussi étudiée. La cinétique d'expression (figure 33) de Fak, Src, Lyn, Fer, Csk, R1-FGF et R-KGF révèle qu'à l'exception de Csk, d'une forme de 50 kDa de Src (p50Src) et de p53/56Lyn, aucune de ces TK n'est détectée lorsque les cellules sont quiescentes ($t=0$). Le patron d'expression des kinases (à l'exception de Csk, p50Src et p53/56Lyn) est relativement semblable et leurs niveaux augmentent pour atteindre un maximum ($t=65h$) puis décroître au moment où les cellules se divisent ($t=72h$). Dans l'ordre, apparaissent d'abord p60Src et Fer à 18h, R1-FGF et R-KGF vers 24h et Fak vers 42h. L'expression de p56Lyn augmente entre 0 et 42h. De 42h à 65h, les niveaux de p60Src, p56Lyn, p50Csk, R1-FGF et R-KGF sont relativement constants et à leur maximum. Les niveaux de Fak et Fer n'atteignent leur maximum qu'à 65h. Les changements des niveaux de p53Lyn avec le temps de culture sont moins importants. Un phénomène intéressant à souligner est la présence d'une p50Src qui disparaît alors que la p60Src augmente. Toutefois, le nombre et les niveaux de ces phosphoprotéines augmentent de façon parallèle au temps post-ensemencement, représentant à la fois l'apparition de nouvelles protéines et l'augmentation de la phosphorylation des protéines déjà présentes. La présence de cycloheximide retarde le processus d'augmentation de l'expression de ces protéines, exception faite de la p50Src qui voit plutôt sa disparition retardée, ce qui

suggère que l'expression des kinases elles-mêmes, de phosphatases ou d'inhibiteurs change en fonction du temps (figure 33).

Il est connu que Fak est localisée dans les plaques d'adhésion et y est associée à Src (Schaller et Parsons, 1994). Certaines études de co-immunoprécipitation n'ont cependant pas réussi à démontrer l'association de Fak et Src (Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1998), malgré le fait que des peptides synthétiques de Fak interagissent avec Src *in vitro* (Thomas *et al.*, 1998). D'autres études ont cependant réussi à démontrer l'association de Src et Fak (Klint *et al.*, 1999; Schlaepfer *et al.*, 1997). Les interactions protéines-protéines, *via* les domaines SH2 et les résidus pY, sont régulées en réponse à divers stimulus plutôt que d'être constitutives. La phosphorylation des protéines étant réversible (présence de phosphatases), il est possible que ces interactions ne durent que quelques instants, soit le temps de transmettre le signal, et qu'il soit difficile de les détecter. Afin de vérifier cette possibilité, les cellules sont incubées pendant 18h dans un milieu sans sérum mais contenant 50µM d'orthovanadate de sodium, un inhibiteur de tyrosine phosphatases. Après l'immunoprécipitation de Fak, son association (par immunodétection) avec les TK Src, Lyn, R1-FGF et Fer est vérifiée. La figure 34A montre que, dans ces conditions, Fak est bien associée à p60Src et à p53/56Lyn, mais ne l'est ni à Fer, ni à R1-FGF. Tel que prévu, aucune association entre Fak et Csk n'est détectée (résultat non montré), Csk étant plutôt associée avec la paxilline, une protéine du cytosquelette (Tremblay *et al.*, 1996b). Dans ces conditions, Src et Lyn (figure 34B, puits 1 et 2, respectivement) sont phosphorylées sur tyrosine. Par contre, ceci ne nous renseigne pas sur leur activité étant donné que la phosphorylation sur tyrosine de certains résidus des membres de la famille de Src peut les activer ou les inhiber, selon leur emplacement dans la protéine (Courtneidge *et al.*, 1993). L'absence d'association entre Fak et R1-FGF peut aussi s'expliquer par le fait que le récepteur, non phosphorylé sur tyrosine dans ces cellules, serait possiblement inactif (figure 34B, puits 3).

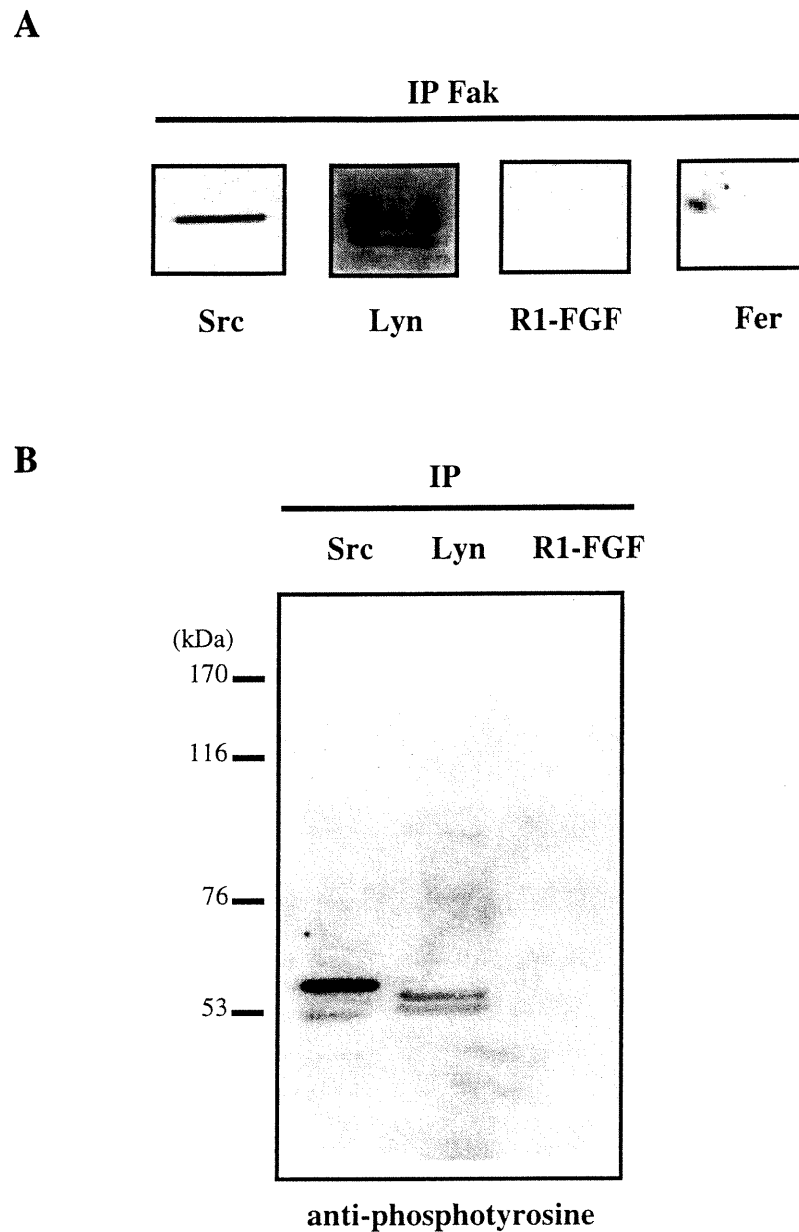


Figure 34 Association de Fak avec différentes kinases

A Les extraits totaux de cellules épithéliales prostatiques canines sont immunoprécipités avec l'anti-Fak. La présence ou l'absence d'une association avec Src, Lyn, R-FGF et Fer est évaluée par l'immunodétection des immunoprécipités avec les anticorps respectifs. **B** La phosphorylation sur tyrosine de Src, Lyn et R1-FGF est déterminée par l'immunoprécipitation des protéines avec leur anticorps respectifs, suivie de leur immunodétection avec un anti-phosphotyrosine monoclonal directement couplé à la peroxydase (horse-radish peroxidase).

Puisque l'adhésion des cellules a lieu malgré la présence de cycloheximide dans le milieu de culture, il est possible de suggérer que l'adhésion est un mécanisme indépendant de la synthèse de nouvelles protéines. Par contre, l'apparition tardive de plusieurs des kinases, lorsque la cycloheximide est présente, permet de supposer que suite à l'adhésion des cellules au substratum, les divers mécanismes se mettant en branle pour l'étalement et la prolifération des cellules requièrent la synthèse de nouvelles protéines. La cinétique d'expression des diverses TK étudiées suggère leur implication dans les mécanismes de progression dans le cycle cellulaire.

3.2. Études sur Src

Tel qu'observé à la figure 33, les cellules au repos expriment une p50Src tandis que celles en division expriment plutôt la forme connue de 60 kDa. Une forme de 50 kDa, produit protéolytique, a été décrite dans les plaquettes (Dhar et Shukla, 1991). Il est peu probable que la présence de cette p50Src soit due à une contamination des plaquettes puisque la préparation de cellules représentant le $t=0$ est obtenue après centrifugation dans un gradient de Percoll, ce qui sépare les cellules basales des luminales et des contaminants sanguins (Chevalier *et al.*, 1980). Néanmoins, la présence de la p50Src pourrait aussi provenir d'une hydrolyse de la p60Src par des protéases présentes dans les cellules prostatiques. Étant donné que la présence de la p50Src décrite dans les plaquettes résulte d'une protéolyse à son extrémité N-terminale, la vérification que ce phénomène, c'est-à-dire que la p50Src détectée soit le produit de l'hydrolyse de la p60Src, existe aussi dans les cellules épithéliales prostatiques canines s'imposait. Ceci est d'autant plus important que le poids moléculaire de cette kinase correspond à celui de la TK activée par le PGF.

Deux anticorps, reconnaissant chacun un épitope différent de la protéine ν -Src, ont été utilisés. L'anticorps Src-1 reconnaît une séquence comprise entre le domaine SH3 et le domaine catalytique de ν -Src.

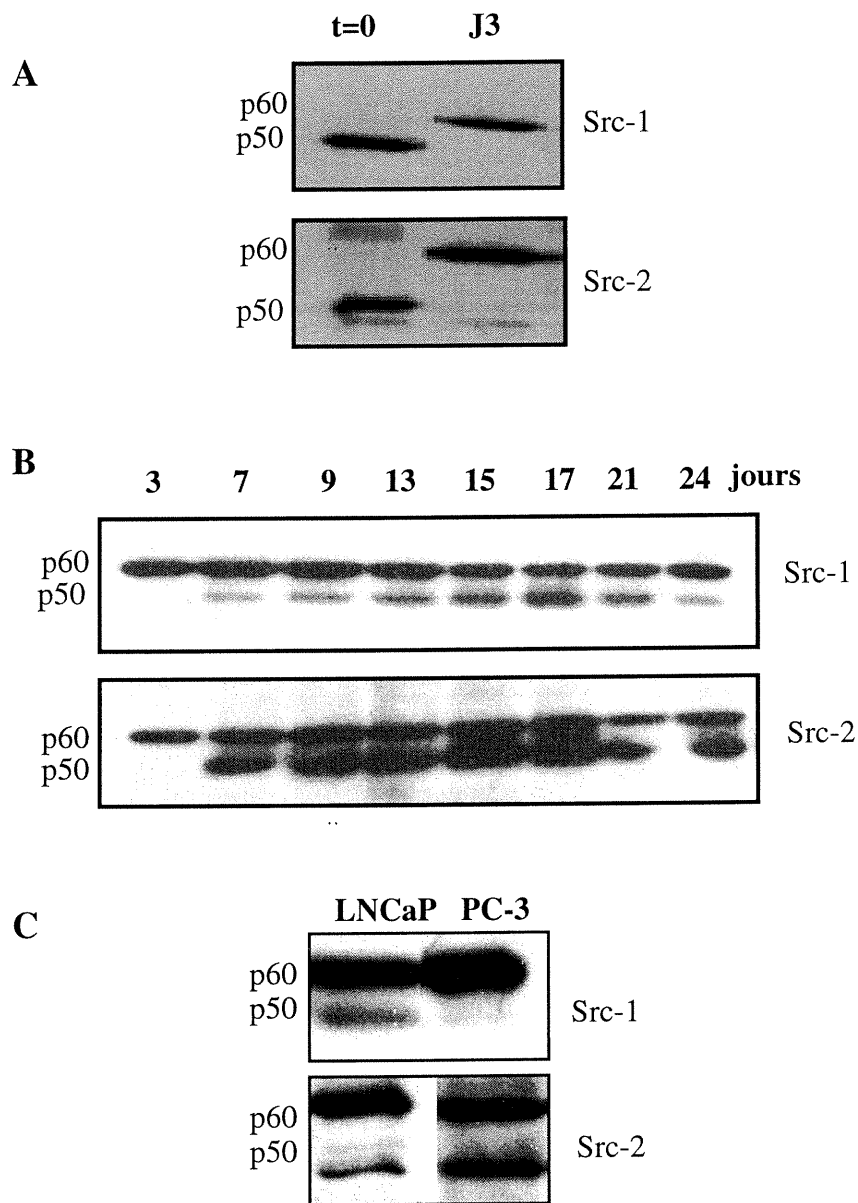


Figure 35 Expression des Src kinases dans les cellules épithéliales prostatiques

A Les extraits totaux de cellules épithéliales prostatiques canines fraîchement dissociées (t=0) ou après 3 jours de culture (J3) sont immunodétectés avec les deux anti-Src. **B** Les extraits totaux de cellules épithéliales prostatiques canines prélevées à différents temps de culture primaire sont immunodétectés avec les deux anti-Src. **C** Extraits totaux de cellules des lignées cellulaires LNCaP et PC-3 immunodétectés avec les deux anti-Src. Ces résultats sont représentatifs d'un minimum de 3 préparations distinctes.

L'anticorps Src-2 reconnaît la séquence de 15 acides aminés comprise entre les résidus 2 à 17 de *v*-Src, c'est-à-dire dans le domaine N-terminal ou de liaison à la membrane. L'anticorps Src-2 ne devrait donc pas reconnaître la p50Src plaquettaire. Or, dans les cellules au repos ($t=0$), la p50Src est reconnue par les deux anticorps (figure 35A). Cette p50Src ne peut donc pas être un produit de protéolyse tel que décrit dans les plaquettes. De plus, des résultats préliminaires obtenus par un stagiaire post-doctoral ont démontré que la p50Src reconnue par l'anticorps Src-2 (cellules au repos; $t=0$) possède une activité catalytique. Ainsi, lorsque la p50Src est immunoprécipitée par cet anticorps, elle est capable de phosphoryler l'énolase (résultats non montrés). Enfin, tel que prévu (figure 35A), les 2 anticorps détectent uniquement une p60Src dans les cellules en prolifération (J3).

Puisque le phénotype des cellules prostatiques épithéliales canines change avec la durée de la culture (Chevalier *et al.*, 1981), le niveau d'expression des protéines Src est donc examiné à différents moments pendant la culture. Tel qu'illustré à la figure 35B, une fois présente, la cinétique d'expression de p60Src (reconnue par les 2 anticorps) ne fluctue que légèrement en fonction du temps alors qu'une p50Src (détectée avec les 2 anticorps) est exprimée à nouveau vers le septième jour de culture et atteint son niveau maximal à 17 jours. Une étude similaire d'expression de Src a été réalisée sur les lignées cancéreuses LNCaP et PC-3. Ces deux lignées sont choisies pour cette série d'étude car elles représentent des phénotypes opposés (temps de doublement, état de différenciation, capacité à former des tumeurs dans les souris nues). Les résultats révèlent aussi des différences importantes, principalement au niveau de la p50Src et d'une bande migrant à environ 48 kDa (figure 35C).

Afin de mieux comprendre ces différences et en relation avec les variants de Src déjà rapportés (Dhar et Shukla, 1991; Kefalas *et al.*, 1995), des extraits protéiques de LNCaP et de PC-3 sont séparés selon leur point isoélectrique puis selon leur poids moléculaire.

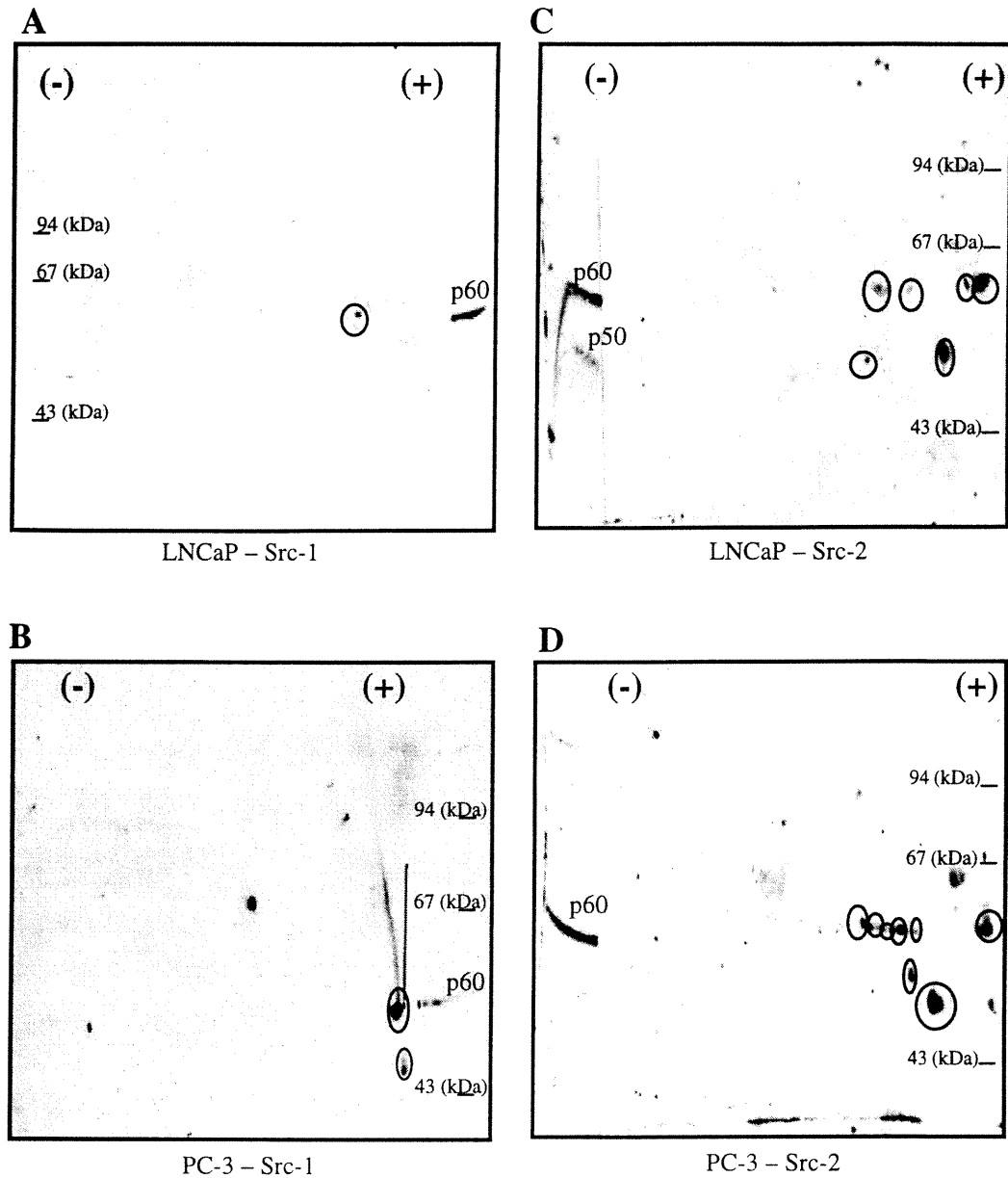


Figure 36 Séparation par focalisation isoélectrique et SDS-PAGE des diverses isoformes de la protéine Src

A Extraits de cellules LNCaP immunodéctés avec l'anti-Src-1. **B** Extraits de cellules PC-3 immunodéctés avec l'anti-Src-1. **C** Extraits de cellules LNCaP immunodéctés avec l'anti-Src-2. **D** Extraits de cellules PC-3 immunodéctés avec l'anti-Src-2. Des extraits protéiques séparés uniquement en SDS-PAGE servent de contrôle à l'immunodétection et de repères pour la position de migration des protéines séparées en focalisation. La focalisation s'est faite du côté acide (+) vers le côté basique (-). Résultats représentatifs de 2 préparations distinctes.

La technique utilisée permet de séparer des isoformes du même poids moléculaire par une première dimension en focalisation isoélectrique d'un pH acide (+) vers un pH basique (-), puis sur une deuxième dimension en SDS-PAGE (O'Farrell, 1975). Un extrait de protéines totales de cellules LNCaP ou PC-3, selon le cas, est ajouté à la deuxième dimension comme contrôle pour l'immunodétection de Src et sert aussi comme référence pour la position de migration des protéines. Les résultats présentés à la figure 36 montrent que l'anticorps Src-1 ne reconnaît qu'une forme dans les échantillons de LNCaP, migrant vis-à-vis l'échantillon contrôle, à 60 kDa, et deux formes dans les PC-3, une majeure à 60 kDa et une seconde, sensiblement du même pI (5,90 vs 5,92) en-dessous de 50 kDa (figures 36A et 36B). L'anticorps Src-2, quant à lui, détecte plusieurs formes à 60 kDa et quelques formes aux environs de 48-50 kDa (figures 36C et 36D).

Lorsque les patrons d'immunodétection d'un même échantillon sont comparés (LNCaP: figures 36A et 36C; PC-3: figures 36B et 36D), il devient évident que les deux anticorps reconnaissent des protéines différentes et que certaines d'entre elles ne sont détectées qu'avec l'anticorps Src-2. Par contre, des protéines de points isoélectriques similaires sont détectées lorsque le même anticorps est utilisé sur les extraits des deux lignées de cellules (comparer figures 36A avec 36B et 36C avec 36D). Les résultats sont compilés dans le tableau 5 et illustrent bien ces propos. L'analyse permet de conclure que la p60 reconnue par l'anticorps Src-1 existe sous une seule forme et possède un point isoélectrique similaire (5,92 vs 5,96) à la fois dans les LNCaP et les PC-3. Dans les PC-3, la protéine p48Src de point isoélectrique reconnue par Src-1 (5,90) et non par Src-2 pourrait être un produit de dégradation, similaire à la p50Src plaquettaire. Par ailleurs, l'anticorps Src-2 détecte plusieurs formes de 60 kDa, 3 dans les LNCaP et 5 dans les PC-3. Dans les deux lignées, cet anticorps reconnaît aussi des protéines dont le poids moléculaire varie de 48 à 50 kDa, dont les pI sont du même ordre que certaines des isoformes détectées à 60 kDa.

Tableau 5 Récapitulation des résultats (pI) obtenus lors de l'immunodétection de Src suite à la séparation des protéines par focalisation isoélectrique et SDS-PAGE

Lignée cellulaire	Src-1 (pI)	Src-2 (pI)
LNCaP		p50: 4,84; <u>6,76</u>
PC-3	p48: <u>5,90</u>	p48: <u>6,76</u> p50: 5,26
LNCaP	p60: <u>5,96</u>	p60: 4,52; <u>5,56</u> ; <u>6,52</u>
PC-3	p60: <u>5,92</u>	p60: <u>5,62</u> ; 6,14; <u>6,48</u> ; 6,66; 6,94

À la lumière de ces résultats, il semble que les deux anticorps reconnaissent des protéines distinctes ou différentes de par leur charge ou degré de phosphorylation. Il pourrait aussi s'agir de produits d'épissage alternatif ou de protéolyse car les pI des protéines reconnues sont différents selon l'anticorps utilisé. Le cas échéant, des études supplémentaires seraient requises pour déterminer avec exactitude les domaines délétés. Ces résultats ouvrent la voie à d'autres études sur la p50Src reconnue par l'anticorps Src-2 qui pourraient constituer un projet de recherche en soi.

Puisqu'il est peu probable que la p50 recherchée soit la p50Src décrite ici (en raison de sa cinétique d'expression qui montre, entre autre, qu'elle est absente des cellules au J3; faible activité des enzymes Src lors de la renaturation), une approche moléculaire prometteuse, soit le clonage par PCR tel que décrit par Wilks en 1989, a été adaptée et utilisée pour tenter d'identifier la p50 stimulée par le PGF.

4. Clonage par PCR de kinases exprimées dans les cellules épithéliales de prostate de chien

Le domaine catalytique des kinases comprend une région bornée par deux sous-domaines hautement conservés chez toutes les kinases, qu'elles soient tyrosine, sérine ou thréonine (Hanks *et al.*, 1988). Un grand nombre de nouvelles kinases ont été identifiées en amplifiant cette région par PCR (Wilks, 1989), dont

des TK d'environ 50 kDa (Cance *et al.*, 1994; Mitchell *et al.*, 1994; Siyanova *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996). Cette stratégie de clonage est donc appliquée sur de l'ARNm obtenu de cellules épithéliales prostatiques canines en division, afin d'y identifier les kinases exprimées et potentiellement la TK de 50 kDa.

Tableau 6 Résultats du clonage par PCR

Amorces utilisées	Nombre de colonies blanches	Nombre de colonies positives après digestion	Nombre de colonies codant pour des kinases
PTK IA + PTK IIA	60	10	10
PTK IB + PTK IIW	98	38	1
PTK IC + PTK IIW			
PTK I + PTK II	60	46	22

La première série d'amorces (tableau 6) représente des séquences non-dégénérées codant exactement pour les acides aminés des sous-domaines VI et IX du domaine catalytique des kinases (PTK IA et PTK IIA, respectivement). Le PCR donne une seule bande, à environ 200pb (résultat non montré). Suite à la transformation des bactéries, 60 colonies blanches sont sélectionnées. Après digestion de l'ADN plasmidique de ces 60 colonies, 10 contiennent réellement une insertion (résultats non montrés). De plus, suite au séquençage (tableau 7), il s'avère que ces 10 colonies (J3) contenaient toutes un fragment du récepteur de type TK Ryk (maintenant connu sous le nom de Eyk). Les oligonucléotides non-dégénérés correspondant aux séquences des sous-domaines VI et IX permettent donc de cloner exclusivement Ryk dans les cellules épithéliales prostatiques canines.

L'approche est modifiée et des amorces dégénérées sont utilisées (PTK IB avec PTK IIW et PTK IC avec PTK IIW, tableau 6). Dans ces conditions, 98 colonies blanches sont identifiées et prélevées. Leur analyse montre que 38 d'entre elles contiennent une insertion (résultats non montrés).

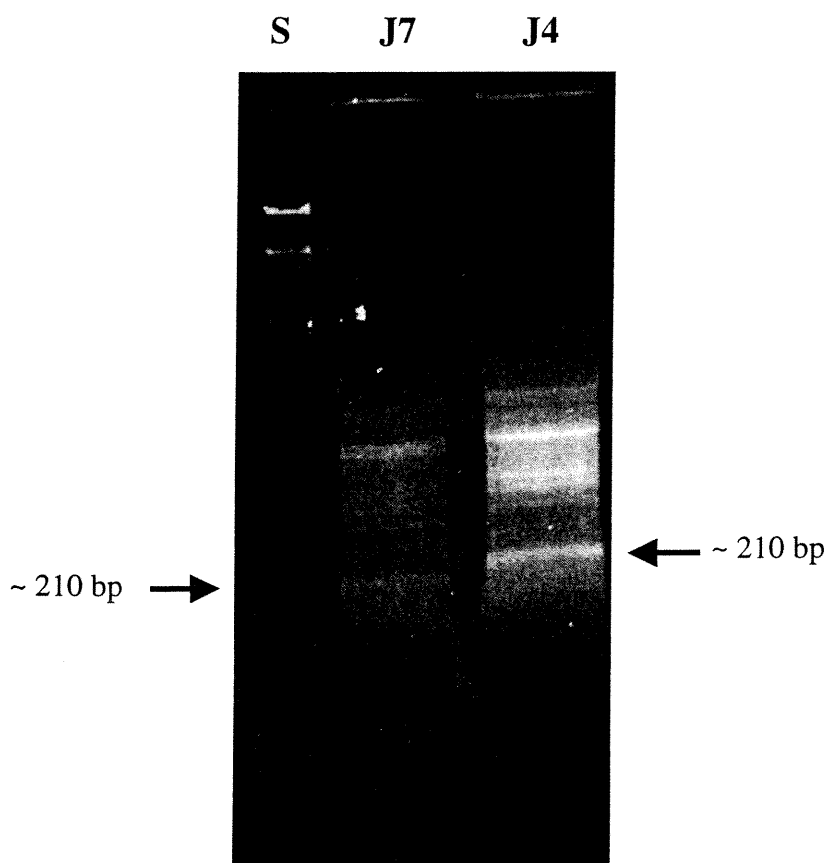


Figure 37 Résultats de PCR

Visualisation (au bromure d'éthidium) des résultats du PCR réalisé avec les amorces PTK I (5'-ATCCACMGNGAYYT-3') et PTK II (5'-CCAWAGGACCASA-3') sur le l'ARNm isolé de cellules prostatiques épithéliales canines en culture primaire depuis 7 jours (J7) et depuis 4 jours (J4). Un puits de fragments d'ADN de 100pb sert de standard (S). Les conditions de PCR sont: 1,5 min à 95°C (dénaturation), 2 min à 37°C (liaison des amorces), 3 min à 65°C (élongation). Ces étapes sont répétées pendant 23 cycles.

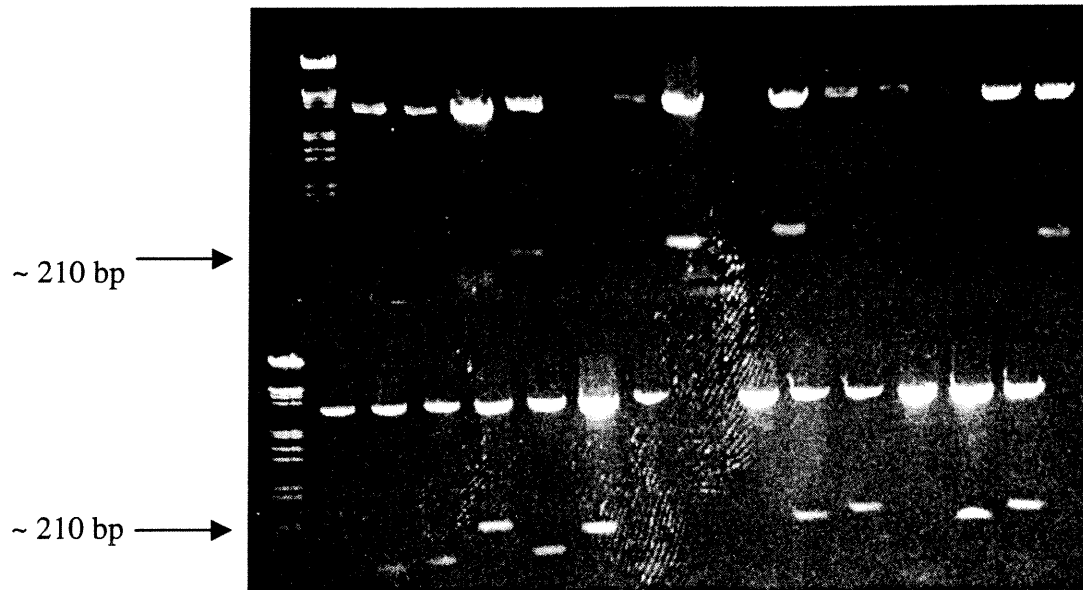


Figure 38 Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique purifié des clones obtenus par PCR

Visualisation (au bromure d'éthidium) des résultats de digestion enzymatique (*EcoRI* et *NotI*) de l'ADN plasmidique purifié de certains clones obtenus par PCR (voir figure 37). Deux séries de clones sont analysés simultanément, dans la partie supérieure et inférieure du gel. Les premiers puits à gauche (en-haut et en-bas) sont des standards d'ADN. Les flèches indiquent l'endroit attendu des fragments digérés, mais la taille des fragments peut varier d'un clone à l'autre.

Ces oligonucléotides sont trop dégénérés et aucune TK ne se retrouve parmi les séquences identifiées. Une séquence parmi toutes celles-ci code pour la sérine/thréonine kinase Kp78, un membre de la famille des MARKS (Microtubule-Affinity Regulating Kinase).

La troisième série d'amorces est légèrement dégénérée (PTK I et PTK II, tableau 6). Le résultat de la réaction de PCR est montré à la figure 37. La bande correspondant au poids moléculaire attendu est découpée et sert à la transformation des bactéries. Cette fois, 60 colonies blanches sont sélectionnées. De ce nombre, 14 colonies sont éliminées car elles représentent des faux positifs (pas d'insertion). La figure 38 montre des résultats typiques de la digestion de l'ADN plasmidique des colonies blanches par les enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI*. Les résultats de l'analyse des clones positifs sont résumés dans le tableau 7. Des 46 colonies contenant une insertion, 22 codent pour des kinases.

Tableau 7 Analyse des clones positifs obtenus par clonage par PCR

Numéro du clone	Nom de la kinase	Pourcentage d'identité (en aa)	Pourcentage d'homologie (en aa)
J3-6	Ryk	100 (28/28)	100 (28/28)
J3-17	Ryk	100 (28/28)	100 (28/28)
J3-23	Ryk	100 (44/44)	100 (44/44)
J3-27	Ryk	100 (28/28)	100 (28/28)
J3-30	Ryk	100 (44/44)	100 (44/44)
J3-31	Ryk	100 (44/44)	100 (44/44)
J3-41	Ryk	100 (28/28)	100 (28/28)
J3-42	Ryk	100 (28/28)	100 (28/28)
J3-53	Ryk	100 (44/44)	100 (44/44)
J3-56	Ryk	100 (44/44)	100 (44/44)
J7-10	PCTAIRE-1b	78 (36/46)	91 (42/46)
J4B-23	RTK Sek	46 (24/52)	58 (30/52)
7A-16	S/T kinase Kp78	91 (39/43)	95 (41/43)
J7B-6	S/T kinase Kp78	62 (49/79)	71 (56/79)
J4B-28	Lyn	60 (30/50)	76 (38/50)
J4B-60	Lyn	97 (57/59)	98 (58/59)
J4B-70	Lyn	93 (65/70)	97 (68/70)
J4B-1	JAK1	100 (26/26)	100 (26/26)
J4B-2	JAK1	100 (14/14)	100 (14/14)
J4B-6	JAK1	91 (55/60)	95 (57/60)
J4B-25	JAK1	100 (59/59)	100 (59/59)
J4B-50	JAK1	96 (55/57)	96 (55/57)
J4B-51	JAK1	97 (66/68)	97 (66/68)
J4B-52	JAK1	97 (66/68)	97 (66/68)
J4B-53	JAK1	97 (66/68)	97 (66/68)
J4B-54	JAK1	100 (49/49)	100 (49/49)
J4B-64	JAK1	97 (66/68)	97 (66/68)
J4B-73	JAK1	97 (66/68)	97 (66/68)
J4B-74	JAK1	97 (66/68)	97 (66/68)
J4-11	Flt-1	92 (63/68)	92 (63/68)
J7B-15	Flt-1	98 (63/64)	100 (64/64)
J4-14	Flt-1	100 (68/68)	100 (68/68)
J4B-58	Flt-1	78 (56/72)	83 (60/72)

La présence de transcrits de plusieurs TK est ainsi révélée. Il s'agit de Lyn (3 clones; une TK de type non-récepteur), Jak1 (12 clones; une TK de type non-récepteur), Flt-1 (4 clones; récepteur TK du VEGF) et Sek (1 clone; un récepteur TK). Deux S/TK sont identifiées: Kp78 (déjà obtenue avec la deuxième série d'amorces) et PCTAIRE-1b, avec 1 clone chacune. Les séquences des autres clones (24 clones) ne présentent pas d'homologie significative avec des protéines connues.

PCTAIRE-1 est une S/TK similaire à la kinase phosphorylant Cdc2 et semble exprimée de façon ubiquitaire (Okuda *et al.*, 1992). La TK Lyn est un membre de la famille de Src et est exprimée de façon prédominante dans les cellules hématopoïétiques (Hibbs et Dunn, 1997). Toutefois, Lyn est exprimée dans les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire, ainsi que dans la prostate humaine et canine (Atfi *et al.*, 1994; Allard *et al.*, 1997). Quant à Kp78 (soumission directe au NCBI, c'est-à-dire pas d'article accompagnant la soumission de la séquence), elle fait partie d'une famille qui inclus cTAK1 (Peng *et al.*, 1998), qui elle-même fait l'objet d'un projet au laboratoire.

Ces travaux de clonage, de même que ceux réalisés par un autre étudiant au doctorat (Nguyen, 1994), ne permettent pas d'identifier de nouvelles TK. La purification biochimique de la p50 fait l'objet de travaux au laboratoire.

Toutefois, l'amplification d'une section du messager codant pour Flt-1, le récepteur-1 du VEGF mène à une brève étude sur son expression et son activation dans les cellules épithéliales de la prostate.

4.1. Expression et activation de Flt-1

Tel que représenté dans le tableau 8, la séquence canine de Flt-1, obtenue du clone J4-14, est 100% identique à la séquence humaine et 97% identique à celle des rongeurs. L'homologie entre la séquence canine et celle des rongeurs est cependant de 100%.

Tableau 8 Homologie de séquence de Flt-1 canin avec les séquences retrouvées chez l'humain et chez les rongeurs

Espèce	Séquence
chien	IHRDL AARNILLSENNVVKICDFGLARDIYKNPDYVRKGDTRLPLKMMAPESIFDKIYSTKSDVWSYG ::
humain	IHRDLAARNILLSENNVVKICDFGLARDIYKNPDYVRKGDTRLPLKMMAPESIFDKIYSTKSDVWSYG ::
rongeur	IHRDLAARNILLSENNVVKICDFGLARDIYKNPDYVRRGDTRLPLKMMAPESIFDKVYSTKSDVWSYG ::

gras: amorces hautement conservées; souligné: séquences conservées parmi les tyrosine kinases

La séquence obtenue dans ce clone est complète et elle couvre les deux sous-domaines (VI et IX) contre lesquels les amorces sont dirigées. De plus, ce clone contient plusieurs séquences d'acides aminés typiques: LAARN est retrouvée dans les TK non-membres de la famille de Src, DFG correspond au sous-domaine VII, KWMAPES correspond au sous-domaine VIII et enfin, les acides aminés soulignés dans le tableau 8 sont généralement retrouvés dans les TK (Hanks *et al.*, 1988).

Le poids moléculaire estimé de Flt-1 humain (à partir de sa composition en acides aminés) est d'environ 145 kDa, mais sa forte glycosylation augmente son poids moléculaire (Neufeld *et al.*, 1999).

Puisque Flt-1 est un récepteur à activité TK intrinsèque, il est fort possible qu'il soit phosphorylé sur tyrosine de façon endogène et que cette phosphorylation puisse être régulée à la suite de la stimulation du récepteur par son ligand, en l'occurrence le VEGF. Afin d'augmenter les chances de détecter Flt-1, les protéines pY immunoprécipitées avec un anticorps contre la pY, séparées sur SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose, sont immunodétectées à l'aide d'un anticorps contre Flt-1 (Santa Cruz Biotech). Cette méthode permet d'enrichir la préparation en protéines pY et de diminuer le nombre de protéines non spécifiques détectées avec l'anti-Flt-1. Tel qu'il est possible de l'observer à la figure 39A, peu de protéines sont ainsi révélées dans les extraits de J3, de PC-3 et de membranes de placenta. Les immunoglobulines des immunoprécipités réagissent fortement car il s'agit de deux anticorps polyclonaux fabriqués chez le lapin. Deux bandes, l'une correspondant à la taille de Flt-1, et l'autre de 100 kDa, sont détectées dans les trois extraits (J3, PC-3 et placenta). L'immunoréactivité de l'anti-Flt-1 d'UBI sur des extraits protéiques de cellules PC-3 est présentée à la figure 39B. Mis à part les immunoglobulines (environ 30 kDa), deux bandes majeures (environ 62 et 53 kDa) et une bande d'intensité plus faible (environ 57 kDa) sont observées, mais rien n'est détecté dans la partie supérieure du gel. Aucune bande n'est détectée dans l'extrait membranaire de placenta

immunoprécipité avec l'anti-pY et immunodéecté avec cet anti-Flt-1 d'UBI (résultats non montrés).

Afin de vérifier la possibilité que l'une des bandes détectées dans les préparations prostatiques soit Flt-1, les cellules PC-3 sont traitées au VEGF. L'hypothèse qui prévaut à ce moment-ci questionne la capacité du VEGF à transmettre un signal, dans des cellules épithéliales, qui se traduirait par une augmentation de protéines phosphorylées sur tyrosine. Quelques études ont déjà rapporté la présence du VEGF dans tous les compartiments prostatiques, soient épithélium, stroma et vaisseaux (Ferrer *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1997), alors que d'autres lui confèrent une distribution plus restreinte, notamment dans les cellules neuroendocrines (NE) (Harper *et al.*, 1996). Une localisation préférentielle dans les cellules NE a d'ailleurs été confirmée par les travaux du laboratoire qui ont montré que la dilution de l'anticorps contre le VEGF était un facteur déterminant pour augmenter la spécificité de l'anticorps (Chevalier *et al.*, sous presse). Cette localisation dans les cellules NE rappelle celle de la bombésine, un peptide analogue au GRP, qui stimule rapidement, et à de faibles doses, la transduction d'un signal dans les PC-3, ainsi que leur motilité (Aprikian *et al.*, 1997).

Étant donné la localisation du VEGF dans les cellules NE et les résultats déjà obtenus sur la bombésine, l'effet du VEGF₁₆₅, ayant le plus grand spectre d'action (Neufeld *et al.*, 1999), est étudié quant à sa capacité à phosphoryler Flt-1 dans les cellules PC-3. Un traitement de 10 min est choisi en utilisant le VEGF à une dose moyenne, soit 45ng/mL (ou 1,2nM). Les extraits protéiques, immunoprécipités à l'anti-pY et immunodéectés, avec l'anti-Flt-1 de Santa Cruz Biotech, montrent une nette augmentation du niveau de pY de la protéine migrant à 180 kDa, suite au traitement des cellules avec le VEGF (figure 40). Une faible immunoréactivité de la bande de 100 kDa est aussi détectée, mais le niveau de phosphorylation n'est pas augmenté par le traitement au VEGF.

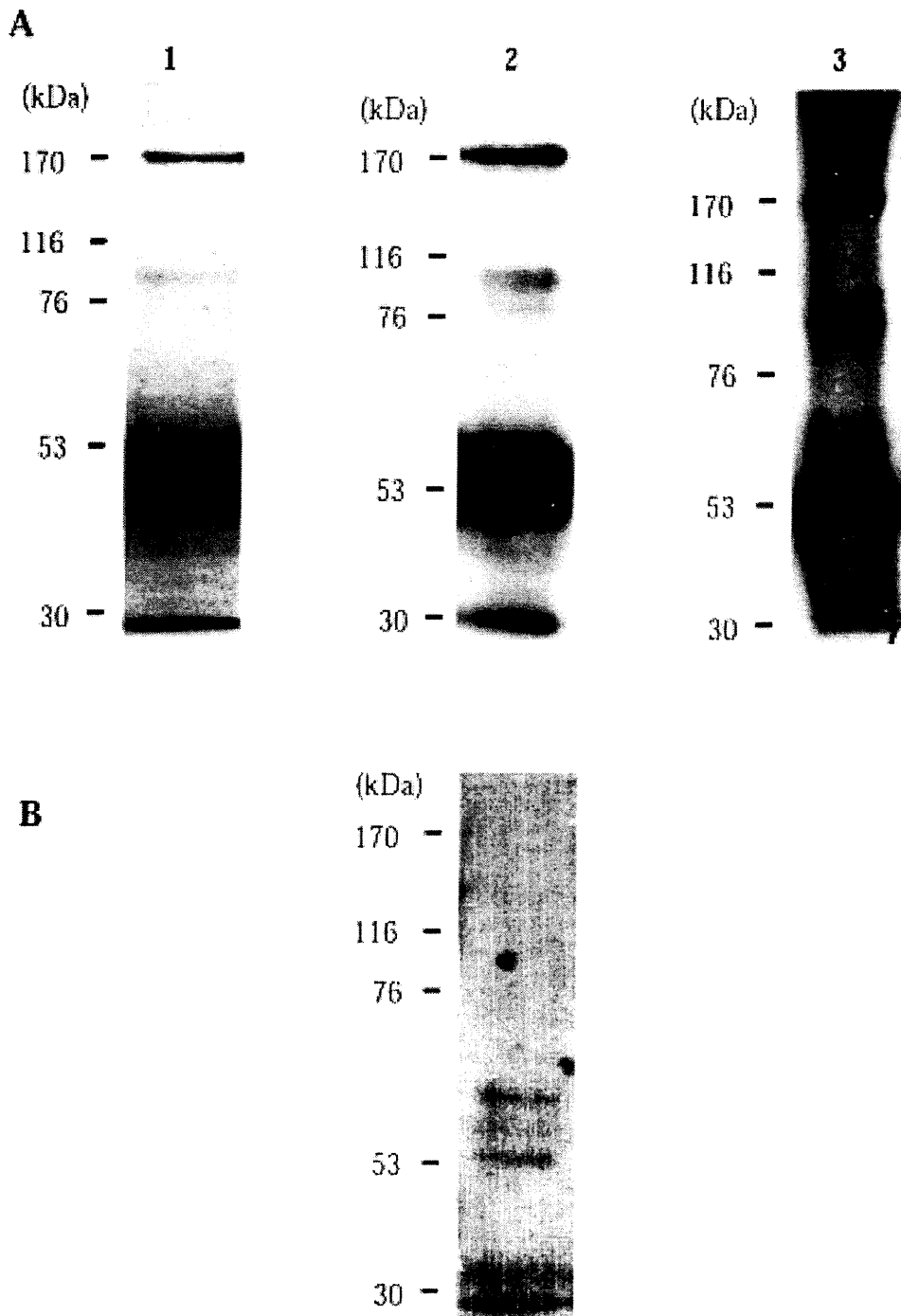


Figure 39 Expression de Flt-1

A Des extraits protéiques de cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire de 3 jours (1), de PC-3 (2) et de placenta (3) sont immunoprécipités avec un anticorps contre la phosphotyrosine. Les immunoprécipités sont ensuite soumis à une immunodétection avec l'anti-Flt-1 de Santa Cruz Biotech. **B** Un extrait de cellules PC-3 est immunoprécipité avec un anticorps contre la phosphotyrosine, puis est immunodéfecté avec l'anti-Flt-1 de UBI.

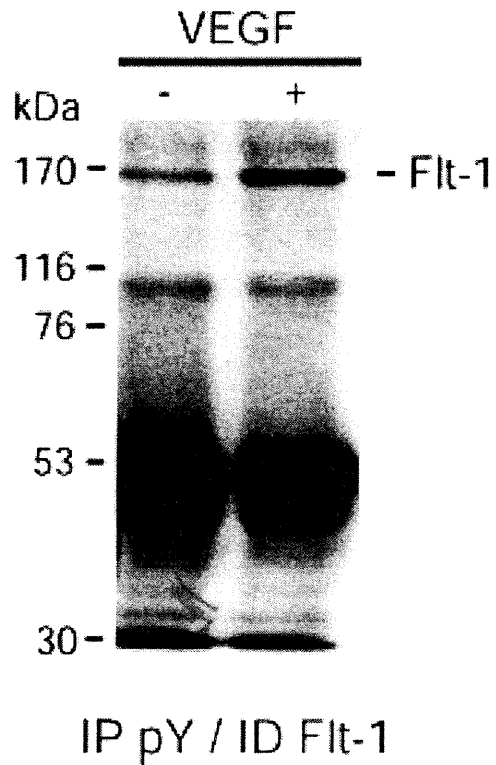


Figure 40 Activation de Flt-1 par le VEGF dans les cellules PC-3

Des extraits protéiques de PC-3 traitées (+) ou non (-) avec 45ng/mL de VEGF sont immunoprécipités avec un anticorps contre Fak. Les immunoprécipités sont ensuite soumis à une immunodétection avec l'anti-Flt-1 de Santa Cruz Biotech. Résultat représentatif de 3 expériences distinctes.

Ces résultats renforcent l'hypothèse voulant que la protéine migrant à la position de 180 kDa soit Flt-1 et ils démontrent pour la première fois l'action du VEGF sur des cellules épithéliales. Ces résultats prometteurs obtenus avec le VEGF ouvrent la voie à un autre aspect de la régulation des cellules épithéliales prostatiques, soit le rôle paracrine des cellules NE.

5. Rôle des cellules neuroendocrines dans la progression du cancer de la prostate

L'activation des récepteurs du VEGF et de la bombésine par leur ligand respectif dans la lignée cancéreuse humaine PC-3 appuie l'hypothèse d'un rôle important des cellules NE, par le biais de leurs produits de sécrétion, dans la progression du CaP. Puisqu'un des produits de sécrétion des cellules NE, la bombésine, semble jouer un rôle-clé dans la progression du CaP, notamment en favorisant la motilité des cellules PC-3, une partie des études présentées dans cette section implique la bombésine. Dans un premier temps, les études portent sur l'invasion, plutôt que la motilité, des cellules PC-3. Dans un deuxième temps, les études portent sur Fak, la molécule-cible des effets de la bombésine. Les travaux réalisés sur Fak (retrouvée dans les cellules épithéliales prostatiques) montrent davantage son implication dans la progression du CaP par le biais de la stimulation paracrine des cellules NE et de leurs produits de sécrétion. Le rôle du VEGF dans ce processus est aussi examiné.

5.1. Tests d'invasion

L'étude de l'action de la bombésine sur les cellules PC-3 a montré un effet sur la motilité de ces cellules et sur l'activation de Fak (Aprikian *et al.*, 1997), une molécule-clé dans les phénomènes associés au mouvement et à l'adhésion des cellules. Compte-tenu de ces résultats, l'effet de la bombésine sur l'invasion des cellules PC-3 a donc été vérifié, c'est-à-dire leur capacité à traverser une couche de protéines qui compose la membrane basale. La capacité des cellules à se disséminer dans l'organisme est une fonction cruciale pour la formation de

métastases. La connaissance des facteurs influençant le potentiel invasif des cellules pourrait permettre de développer des stratégies thérapeutiques afin de prévenir ces mouvements et ainsi empêcher la formation de métastases.

Pour la mise au point du test d'invasion dans des chambres de Boyden, les membranes de polycarbonate sont, dans tous les cas, recouvertes de 50µg de Matrigel, une solution mimant la présence d'une membrane basale. La première étape de cette étude est de déterminer la composition optimale de la solution, servant d'agent chimioattractif, présente dans la chambre du bas. Toutes les solutions testées ont comme base le milieu de culture RPMI 1640, auquel sont ajoutés soit 10% de sérum (dFBS), soit du Matrigel (100µg/mL) ou encore un mélange de Matrigel (100µg/mL) et de dFBS (10%). Tel que représenté à la figure 41, un certain nombre de cellules réussissent à traverser la couche de Matrigel, même si la chambre du bas ne contient que du RPMI. En fait, l'ajout de Matrigel et/ou de dFBS ne permet pas à un nombre plus élevé de cellules de se retrouver de l'autre côté de la membrane. L'analyse statistique (test Q de Ryan, seuil alpha de 0,05) montre que les résultats obtenus lorsque la chambre du bas contient du dFBS et/ou du Matrigel ne diffèrent pas entre eux. La seule condition différente est celle où la chambre du bas contient uniquement du RPMI (P = 0,03). Étant donné ces résultats, nous avons poursuivi nos études en utilisant le Matrigel et le dFBS (RPMI + 100µg/mL Matrigel + 10% dFBS), conditions correspondant à celles rapportées antérieurement pour les essais de motilité (Aprikian *et al.*, 1997).

Les étapes subséquentes consistaient à déterminer le nombre de cellules (variant de 25 000 à 1 000 000 par chambre) à déposer dans la chambre du haut et le temps alloué (5 ou 24h) pour l'invasion afin d'observer une différence sous le filtre de polycarbonate. La plupart des travaux portant sur l'invasion de diverses lignées de cellules prostatiques cancéreuses (Passantini *et al.*, 1992; Djakiew *et al.*, 1993; Jarrard *et al.*, 1994; Vukanovic *et al.*, 1995) utilisent des temps courts, soit 5h.

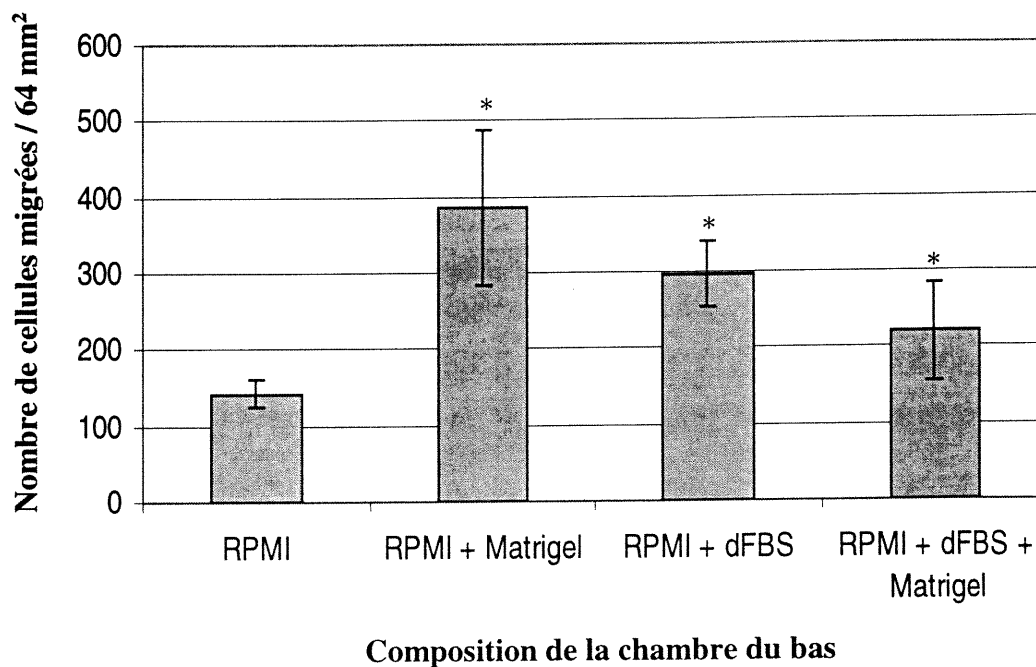


Figure 41 Mise au point des tests d'invasion

Détermination de la composition de la chambre du bas: RPMI, Matrigel (100µg/mL), dFBS (sérum de veau fœtal dialysé; 10%) pour 1×10^5 cellules par puits. Dans tous les cas, les essais sont réalisés en triplicata et le nombre de cellules ayant migré est la moyenne (+/- l'écart-type) des comptes par chambre de Boyden (microscope; magnification 100X). (* RPMI + Matrigel; RPMI + dFBS; RPMI + dFBS + Matrigel différents de RPMI: $P = 0,03$)

La seule autre étude réalisée avec la bombésine et les cellules PC-3 (Hoosein *et al.*, 1993) se déroule sur une période de 72h. Considérant le temps de doublement des cellules PC-3 (voir caractéristiques dans le tableau 1), une telle période d'incubation n'a pas été retenue.

Après de nombreux tests, il nous est apparu qu'un plus faible nombre de cellules (25×10^3) et une courte période d'invasion (5h) permettaient d'obtenir les meilleurs résultats d'action de la bombésine. Dans ces conditions et lors d'une expérience-type (voir figure 42), un effet dose-réponse de la bombésine est démontré aux concentrations de 5 et 10nM ($P < 0,001$) où la bombésine a un effet stimulateur de 2,5X et 2,8X, respectivement. Cependant, le pourcentage de stimulation s'est avéré très variable d'une préparation cellulaire à l'autre. Ceci est illustré par la compilation des résultats du test d'invasion de 8 expériences distinctes (0 ou 10nM bombésine pour 25×10^3 cellules; tableau 9), avec des effets significatifs ($P = 0,004$), mais variant de l'ordre de 1,2X à 2,8X.

Tableau 9 Compilation des résultats d'invasion en présence et en absence de bombésine

0 nM bombésine ^a	10 nM bombésine ^a	Effet ^b
121 +/- 11	335 +/- 9	2,8
102 +/- 15	153 +/- 11	1,5
77 +/- 18	163 +/- 13	2,1
64 +/- 19	142 +/- 77	2,2
274 +/- 36	330 +/- 9	1,2
214 +/- 91	411 +/- 55	1,9
115 +/- 21	154 +/- 42	1,3
175 +/- 41	215 +/- 38	1,2

^aLes chiffres représentent la moyenne et l'écart-type d'un échantillonnage (nombre de cellules comptées dans trois champs distincts par chambre de Boyden) réalisé en quadruplicata pour chacune des conditions.

^bEn compilant les données des 8 expériences, l'effet de la bombésine (10 nM) est significatif ($P = 0,004$).

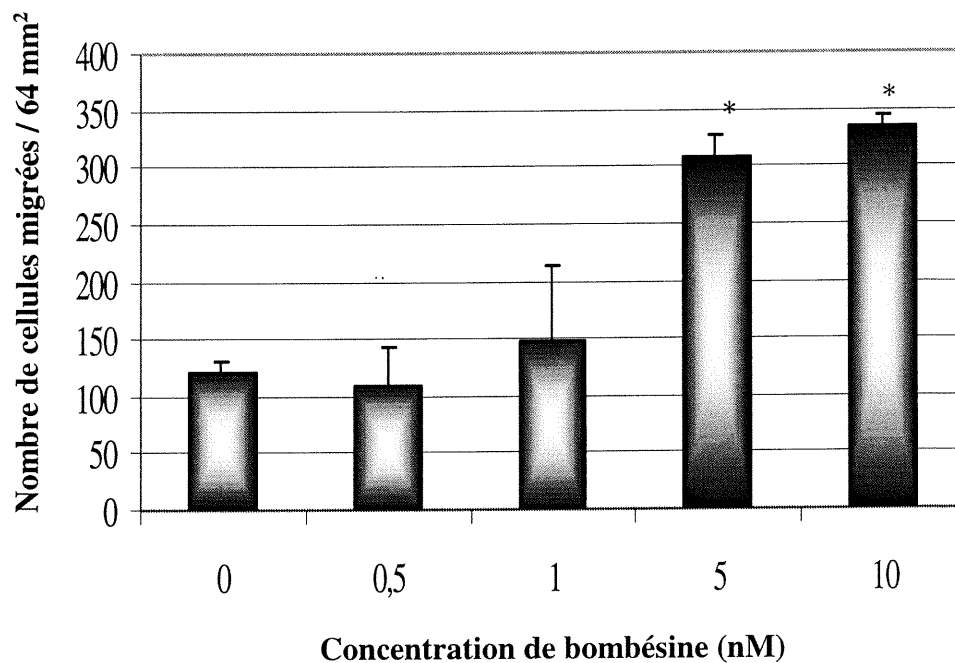


Figure 42 Effet de la bombésine sur l'invasion des cellules PC-3

Test d'invasion dans les chambres de Boyden. Les conditions sont: 25×10^3 cellules par puits; membrane enduite de Matrigel ($50\mu\text{g}$); chambre du bas composée de 10% sérum veau fœtal dialysé + $100\mu\text{g/mL}$ Matrigel; incubation de 5h à 37°C . Dans tous les cas, les essais sont réalisés en triplicata et le nombre de cellules ayant migré est la moyenne (+/- l'écart-type) des comptes par chambre de Boyden (microscope; magnification 100X). (* 5 et 10 nM différents de 0 nM; $P < 0,001$)

5.2. Expression et régulation de l'activation de Fak dans les cellules épithéliales prostatiques

L'activation de Fak, par son interaction avec les intégrines, est souvent reliée à la capacité des cellules à se mouvoir et s'attacher à des points d'ancrage nommés les plaques d'adhésion. Le clonage de l'ADNc de Fak dans les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire (Nguyen, 1994; Tremblay *et al.*, 1996a) ainsi que l'induction de son expression en fonction de l'étalement des cellules viennent appuyer un rôle de Fak au niveau des plaques d'adhésion. Un tel rôle est aussi appuyé par l'augmentation de l'expression de Fak et de son activation par phosphorylation dans les CaP avancés (Tremblay *et al.*, 1996b) ainsi que dans la prostate canine métaplasique, où le remodelage du tissu implique la réorganisation des cellules sur la membrane basale et la prolifération accrue des cellules basales (Tremblay *et al.*, 1996a). De plus, il a été démontré que la bombésine, qui rend les cellules PC-3 plus mobiles, active aussi Fak dans les cellules PC-3 (Aprikian *et al.*, 1997).

Afin de mieux comprendre le rôle de Fak dans les cellules épithéliales normales et cancéreuses, de même que l'activation de Fak en relation avec la différenciation des cellules NE, les niveaux d'expression de Fak dans divers types de cellules prostatiques humaines cancéreuses sont comparés.

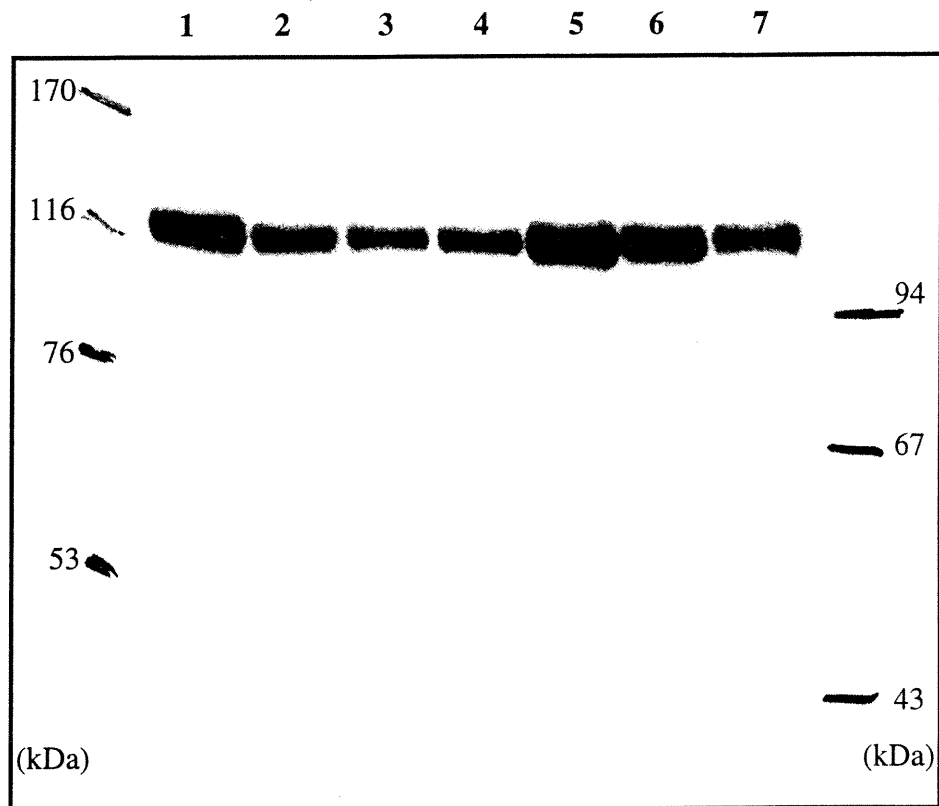


Figure 43 Expression de Fak dans diverses cellules prostatiques

Des extraits protéiques de cellules prostatiques sont séparés sur SDS-PAGE et les niveaux de la protéine Fak sont évalués par immunodétection avec un anti-Fak. Les cellules utilisées sont: PC-3 (1); LNCaP (2); LNCaP-C4 (3); LNCaP-C4-2 (4); PC-3M (5); DU145 (6); cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire de 3 jours (7).

Tel qu'il est possible de le constater à la figure 43, les cellules LNCaP expriment moins de Fak alors que les PC-3M et les PC-3 en expriment le plus. Suivent les DU145 et les sous-lignées des LNCaP, les C4-2 et les C4. Ces résultats sont en accord avec la corrélation déjà établie entre les niveaux de Fak exprimés dans les diverses lignées parentales (LNCaP, DU145 et PC-3) et leur agressivité à former des tumeurs dans les souris athymiques (Tremblay *et al.*, 1996b). Les résultats illustrés à la figure 43 vont aussi dans ce sens, c'est-à-dire que les niveaux de Fak dans la sous-lignée dérivée des PC-3 sont plus élevés que ceux de leur lignée parentale. Or, les PC-3M ont un plus grand pouvoir métastasant et expriment la plus grande quantité de Fak.

Les études d'activité kinasique de la protéine Fak réalisées avec les lignées parentales LNCaP et PC-3 ont déjà montré l'absence d'activité kinasique dans les LNCaP (Tremblay *et al.*, 1996b; Slack *et al.*, 2001). Cette absence d'activité n'a pu être expliquée par des mutations rendant Fak inactive, puisque qu'aucune mutation n'a été trouvée dans l'ADNc de Fak (complètement séquencé) des LNCaP (résultats non montrés). Il est à noter que les LNCaP ont aussi une morphologie différente de celle des PC-3 et adhèrent peu au substratum lorsque cultivées en feuillets. De plus, le faible pouvoir tumorigénique des LNCaP chez la souris athymique peut être modifié par la présence de Gelfoam[®] un produit similaire au Matrigel qui mime la matrice extracellulaire (Chung *et al.*, 1992). La non-fonctionnalité des complexes impliquant Fak dans les LNCaP est donc proposée comme hypothèse. Dans le but de vérifier cette hypothèse, les protéines des cellules PC-3 et LNCaP sont marquées métaboliquement avec de la méthionine et de la cystéine marquées au ³⁵S, à la suite d'une pré-incubation des cellules dans un milieu dépourvu de méthionine et de cystéine non radioactives. Les protéines ainsi marquées sont immunoprécipitées avec l'anticorps dirigé contre Fak et révélées par autoradiographie à la suite de leur séparation par SDS-PAGE.

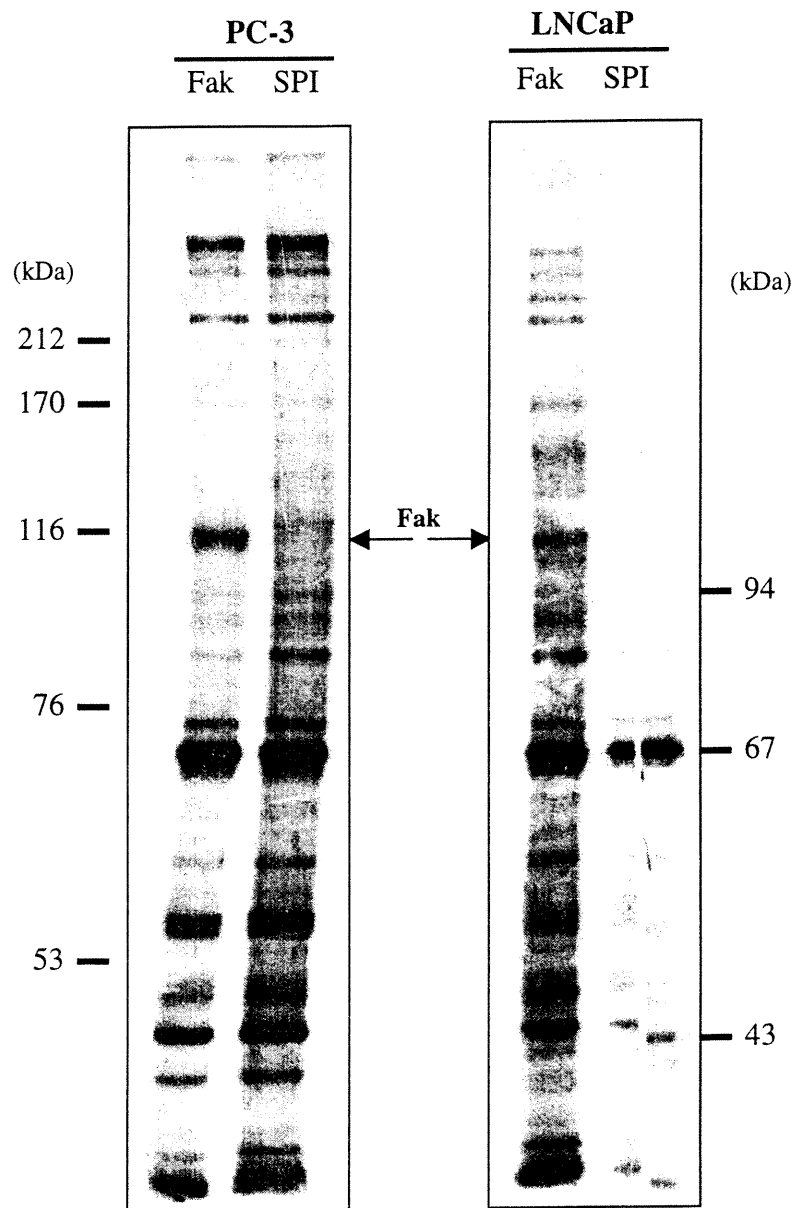


Figure 44 Comparaison de protéines complexées à Fak dans les cellules PC-3 et LNCaP marquées à la méthionine-³⁵S

Les protéines nouvellement synthétisées des cellules PC-3 et LNCaP sont marquées à la méthionine-³⁵S. Des extraits protéiques de ces cellules sont immunoprécipités avec l'anticorps contre Fak ou avec du sérum pré-immun de souris (SPI). Fak, les protéines qui y sont complexées, ainsi que les protéines se liant de façon non-spécifique immunoglobulines sont visualisées par exposition du gel à un film radiographique.

Tel qu'il est possible de le constater à la figure 44, plusieurs protéines radioactives sont retrouvées à la fois dans les immunoprécipités contrôles et ceux de Fak dans les cellules PC-3 et LNCaP. La seule protéine différente migre à la position de Fak et semble aussi être en plus faible quantité dans les LNCaP.

Puisque cette approche n'est pas satisfaisante pour démontrer les différences de fonctionnalité des protéines associées à Fak dans les cellules PC-3 et LNCaP, les cellules sont cultivées sur de la matrice extracellulaire naturelle (nECM), tel qu'il a déjà été décrit pour les cellules épithéliales prostatiques canines (Chevalier et Chapdelaine, 1991). Cette méthode, adaptée d'autres auteurs (Gospodarowicz *et al.*, 1980; Barsky *et al.*, 1983), permet d'enlever la couche de cellules sans affecter la nECM. Les cellulesensemencées sur une telle nECM adhèrent plus rapidement et plus solidement au substratum de culture (Vlodavsky *et al.*, 1980). L'induction de l'expression de Fak, dans les cellules épithéliales prostatiques, est plus rapide dans ces conditions de culture que dans les conditions normales (Tremblay *et al.*, 1996a). La phosphorylation de Fak est aussi augmentée (Tremblay *et al.*, 1996a). Il est donc possible que la présence d'une nECM prostatique permette qu'aient lieu, dans les LNCaP ainsi cultivées, des interactions entre les intégrines et Fak qui modifient/modulent l'activité de Fak.

Des cellules LNCaP sont doncensemencées sur de la nECM préparée à partir de feuillets de cellules LNCaP ou PC-3 et examinées dès 48 à 72h, soit une période inférieure à leur temps de doublement de 60 à 72h (tableau 1). Tel qu'il est possible de l'observer à la figure 45, les LNCaP cultivées sur de la nECM, à même densité d'ensemencement (figures 45B et 45C), ont un aspect plus étalé et allongé que les LNCaP contrôles cultivées sur plastique (figure 45A) après une culture de même durée. Cette morphologie rappelle les élongations de type dendritique, caractéristiques des cellules NE (Chen *et al.*, 1993).

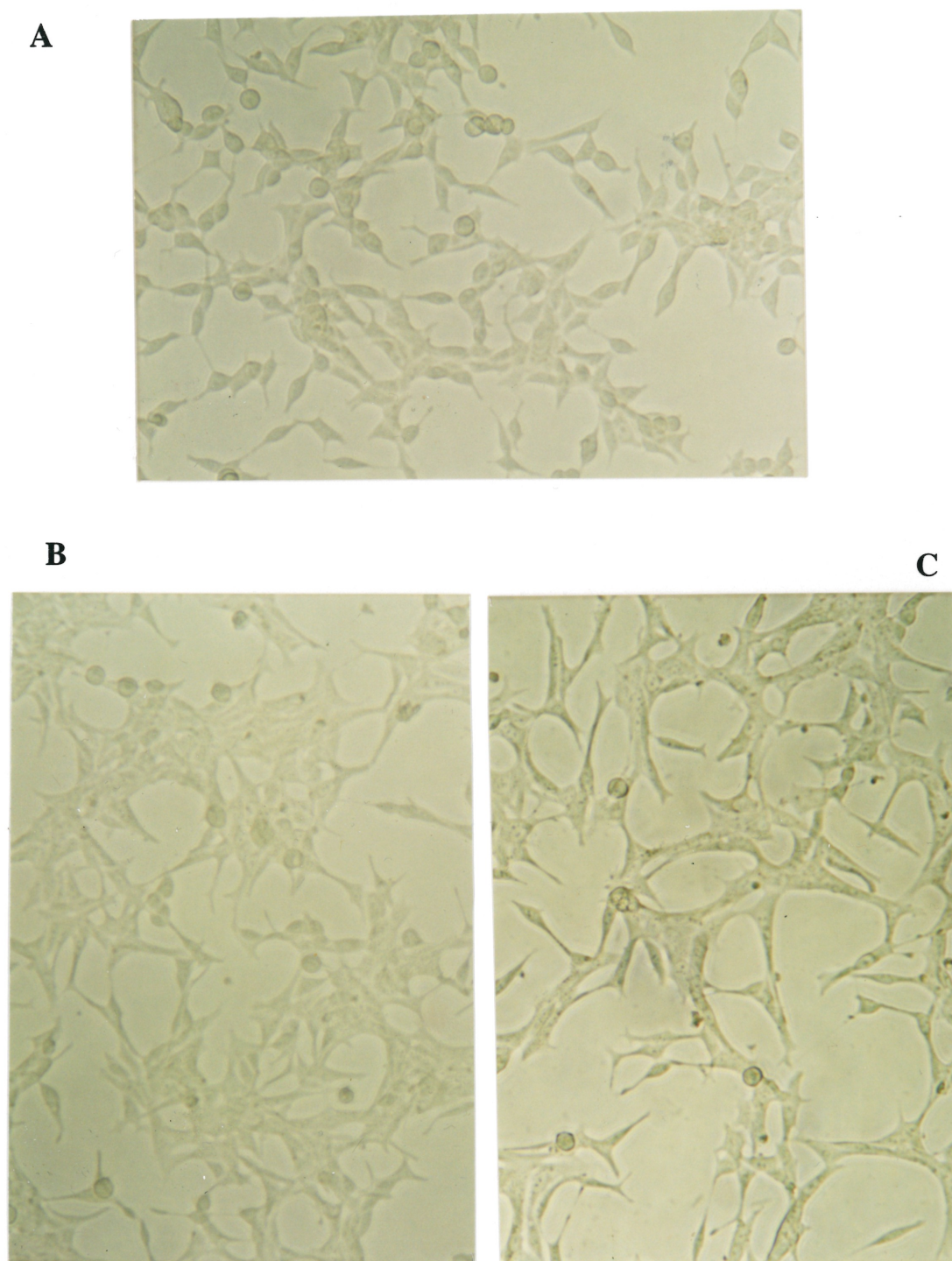


Figure 45 Morphologie des cellules LNCaP

A Cellules LNCaP cultivées sur du plastique. **B** Cellules LNCaP cultivées sur de la matrice extracellulaire naturelle produite par d'autres cellules LNCaP. **C** Cellules LNCaP cultivées sur de la matrice extracellulaire naturelle produite par des cellules PC-3. Dans tous les cas, les cellules sont ensemencées à la même densité et cultivées de façon identique pendant 72h. X 100.

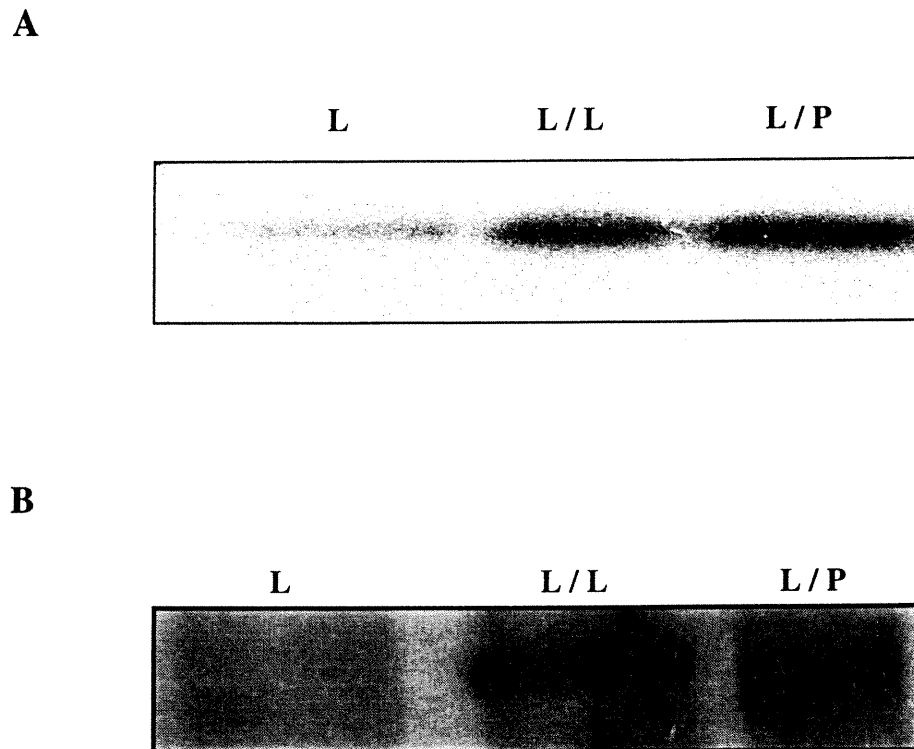


Figure 46 Expression et activation accrues de Fak dans les cellules LNCaP cultivées sur de la matrice extracellulaire naturelle

A Immunodétection de Fak. **B** Niveaux endogènes de phosphotyrosine de Fak détectés par immunoprécipitation de Fak suivie de l'immunodétection à l'anti-phosphotyrosine. Les cellules LNCaP sont cultivées sur du plastique (L); les cellules LNCaP sont cultivées sur de la matrice extracellulaire naturelle produite par d'autres cellules LNCaP (L/L); les cellules LNCaP sont cultivées sur de la matrice extracellulaire naturelle produite par des cellules PC-3 (L/P). Résultats représentatifs de 3 expériences distinctes.

De pair avec ces résultats, les niveaux de Fak sont augmentés dans les LNCaP cultivées sur la matrice comparativement aux LNCaP cultivées sur le plastique (figure 46A). De même, l'activation de Fak peut alors être révélée par les niveaux de pY de la protéine (Fak) immunoprécipitée (figure 46B).

Ces résultats montrent qu'il est possible de moduler l'activation de Fak, de même que le degré d'étalement des cellules LNCaP en ajoutant de la nECM. Ces résultats vont de pair avec les résultats récents montrant que l'expression accrue des intégrines (principalement α_v) dans ces cellules conduit à l'activation de Fak (Zheng *et al.*, 1999). Les résultats sur la modulation de l'activité et l'expression de Fak, ainsi que ceux impliquant les intégrines (Zheng *et al.*, 1999) sont corroborés par les résultats de l'équipe de Parsons démontrant que l'autophosphorylation de Fak dépend de l'adhésion des cellules (Slack *et al.*, 2001).

Puisque la bombésine est un activateur de Fak, la réponse (quant à l'action de la bombésine sur les niveaux de phosphorylation de Fak) des cellules prostatiques cancéreuses humaines de phénotypes divers est la suite logique des résultats précédents.

Des sous-lignées de cellules PC-3M ont été développées chez la souris par injection orthotopique (directement dans la prostate) de cellules PC-3M (Stephenson *et al.*, 1992). Les lignées dérivées, PC-3M-LN4 et PC-3M-Pro4 demeurent agressives (LN4 > Pro4) et forment des métastases dans les ganglions lymphatiques et la prostate, respectivement (Stephenson *et al.*, 1992). Dans le cas des cellules PC-3M-Pro4 (figure 47A), l'activation de Fak par la bombésine suit la même cinétique que les PC-3 (Aprikian *et al.*, 1997), c'est-à-dire qu'à une concentration de 10nM, la bombésine a un effet maximal suite au traitement des cellules pendant 10 min. L'effet de la bombésine, toujours à 10nM, est maximal dès 1 min de traitement des cellules PC-3M-LN4 (figure 47B).

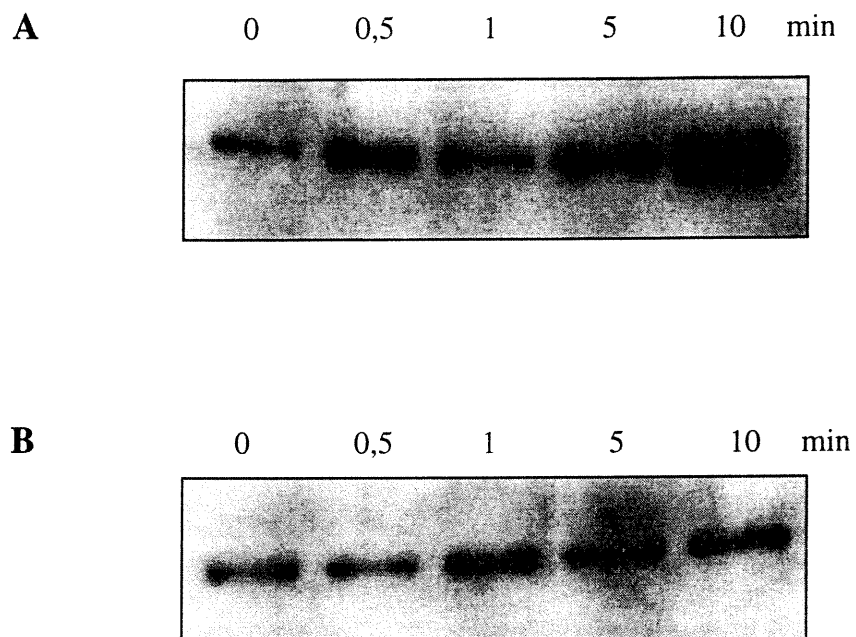


Figure 47 Activation de Fak par la bombésine dans les lignées dérivées des PC-3

Niveaux endogènes de phosphorylation sur tyrosine de Fak détectés par immunoprécipitation de Fak suivie de l'immunodétection à l'anti-phosphotyrosine. Les cellules sont traitées avec 10nM de bombésine pour les temps indiqués. **A** Cellules PC-3M-Pro4. **B** Cellules PC-3M-LN4. Résultats représentatifs de 3 expériences distinctes.

Ces résultats démontrent que des mécanismes semblables sont en place dans des lignées cellulaires prostatiques cancéreuses présentant des caractéristiques différentes, mais formant toutes des métastases. Ces résultats vont de pair avec les résultats récents démontrant que les niveaux de Fak dans les lignées prostatiques cancéreuses humaines vont de pair avec leur potentiel métastasant et leur capacité migratoire (Slack *et al.*, 2001). L'inhibition de Fak par la surexpression de FRNK ou encore par l'ajout d'un inhibiteur des kinases de la famille de Src relie directement Fak à la capacité migratoire de ces cellules (Slack *et al.*, 2001).

Puisque Fak est une molécule importante qui régule la forme des cellules, leur motilité et leur adhésion, il reste à vérifier si son activation est aussi contrôlée par la bombésine dans les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire, tout en sachant que la bombésine n'est pas un FC pour ces cellules (Chevalier *et al.*, 1984). Puisque les niveaux de Fak dans ces cellules augmentent de pair avec leur étalement, la bombésine est ajoutée au troisième jour (J3) de culture. Dans ces cellules, suite à l'immunoprécipitation de Fak, le niveau de pY de Fak augmente en fonction du temps de traitement à la bombésine (figure 48A) et de la dose de bombésine utilisée (figure 48B). L'activation est maximale dès la dose de 5nM de bombésine et ce, de façon équivalente suite à 2 ou 5 min de traitement. Ces résultats confirment que la voie de Fak dans le modèle de chien est sensible à l'action de la bombésine et est comparable à celle des cellules PC-3. La bombésine affecte la motilité des cellules PC-3 et non leur prolifération, de même que celle des cellules canines. Il est donc possible de proposer, par analogie, un rôle de la bombésine dans l'étalement de ces cellules en culture primaire.

Plusieurs molécules bioactives peuvent activer Fak, notamment les FC, certains lipides et quelques produits de sécrétion des cellules NE. Dans la prostate humaine, les cellules NE expriment divers produits de sécrétion (Aprikian *et al.*, 1993). Afin de vérifier si, par analogie avec la bombésine, leur action conduit aussi à l'activation de Fak (augmentation de ses niveaux de pY), plusieurs produits

de sécrétion des cellules NE sont testés, à une même dose (10nM). Des résultats typiques sont présentés à la figure 49. Comparativement à la bombésine, les composés les plus efficaces (selon la compilation de trois expériences distinctes) sont: neuromédine B, TSH, PTHrP, calcitonine, sérotonine, VIP. La PTH, la neurotensine, la bradykinine et la katacalcine ont un effet similaire à celui de la bombésine.

Dans les cellules endothéliales et les monocytes, le VEGF active Fak et la paxilline (Liu, *et al.*, 1997; Abedi et Zachary, 1997; Wang *et al.*, 1997). Étant donné que le VEGF est localisé dans les cellules NE prostatiques (Chevalier *et al.*, sous presse) et qu'il favorise l'autophosphorylation de son récepteur Flt-1 dans les cellules PC-3 (figure 39), son effet sur Fak est étudié dans les cellules PC-3. Le traitement de ces cellules avec 45ng/mL de VEGF₁₆₅, soit environ 1,2nM, pendant 10 min cause une forte augmentation des niveaux de pY de Fak (figure 50). Il s'agit de la première démonstration de l'activation de Fak par le VEGF dans des cellules qui sont d'origine prostatique, suggérant que le VEGF soit aussi capable d'agir directement sur des cellules cancéreuses en plus d'induire l'angiogénèse. Ces données, couplées à l'observation que dans la prostate, les cellules NE n'expriment pas toutes les mêmes neuropeptides (Aprikian *et al.*, 1993; Abrahamsson, 1999; Ismail *et al.*, sous presse), ajoutent de l'importance au rôle central que Fak pourrait avoir dans la progression du cancer de la prostate. Ces résultats donnent aussi une importance insoupçonnée au VEGF dans les cellules épithéliales prostatiques. Puisque ces travaux sont obtenus à la toute fin de mes études, je n'ai pu aller plus loin dans cette voie prometteuse. Néanmoins, des résultats obtenus au laboratoire après mon départ vont dans ce sens et contribuent à donner de l'importance au VEGF dans la progression du CaP.

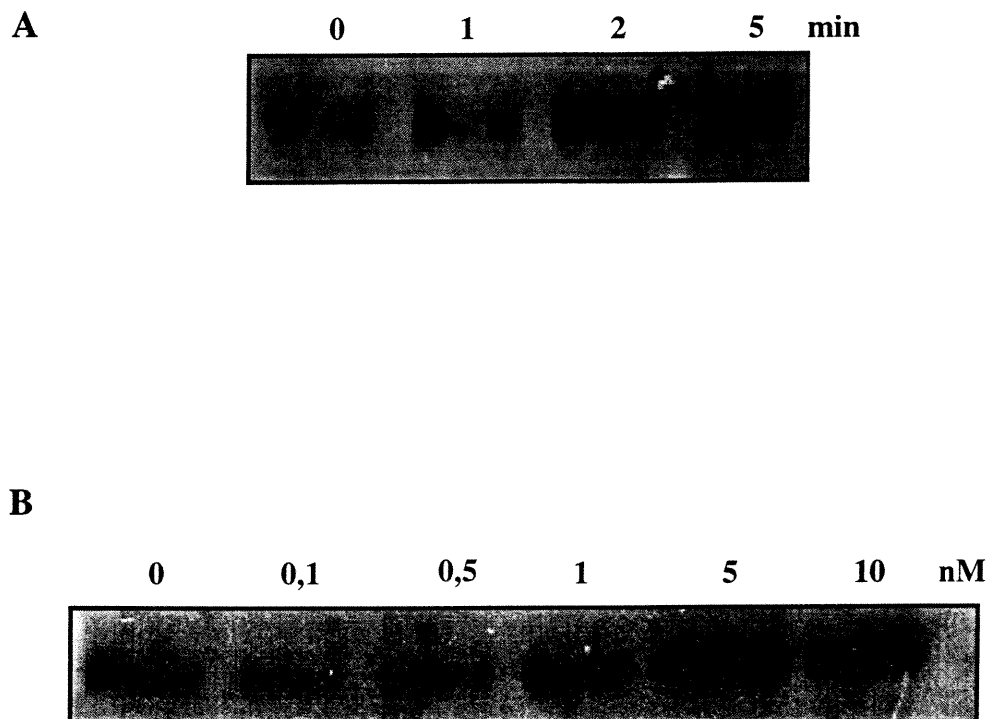


Figure 48 Activation de Fak par la bombésine dans les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire

Niveaux endogènes de phosphorylation sur tyrosine de Fak détectés par immunoprécipitation de Fak suivie de l'immunodétection à l'anti-phosphotyrosine. **A** Temps-réponse. Les cellules sont traitées pour les temps indiqués avec 10nM de bombésine. **B** Dose-réponse. Les cellules sont traitées à la bombésine aux doses indiquées pendant 5 min. Résultats représentatifs de 2 expériences distinctes.

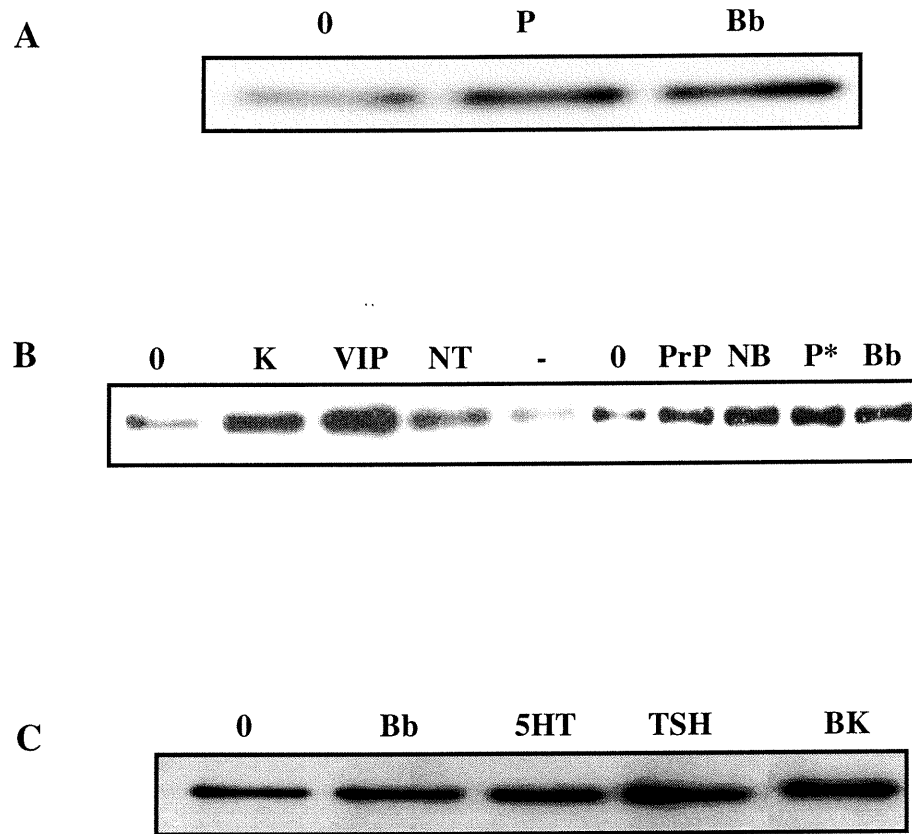


Figure 49 Activation de Fak par différents produits de sécrétion des cellules neuroendocrines dans les cellules PC-3

Niveaux endogènes de phosphorylation sur tyrosine de Fak détectés par immunoprécipitation de Fak suivie de l'immunodétection à l'anti-phosphotyrosine. Dans tous les cas les produits sont testés à 10nM, sauf P* avec 1nM, et les cellules PC-3 sont traitées pendant 10 min. Sans traitement (0); hormone parathyroïdienne (P); bombésine (Bb); katalcalcine (K); peptide intestinal vasoactif (VIP); neurotensine (NT); peptide contrôle – fragment d'albumine (-); peptide relié à l'hormone parathyroïdienne (PrP); neuromédine B (NB); sérotonine (5HT), hormone thyroïdienne (TSH); bradykinine (BK). Résultats représentatifs de 3 expériences distinctes.

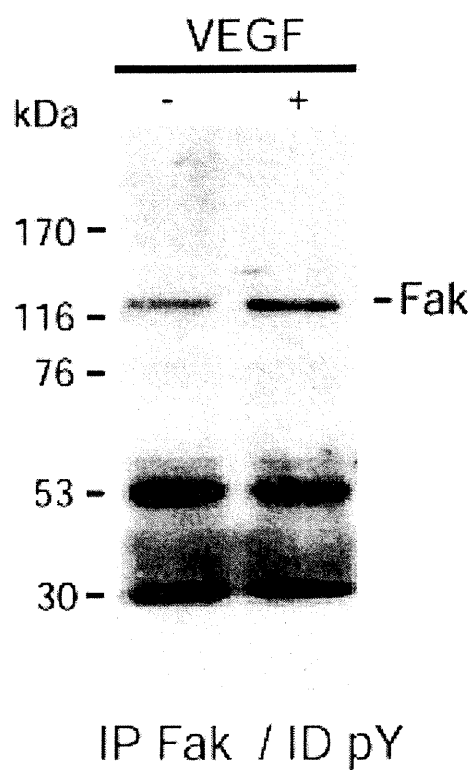


Figure 50 Activation de Fak par le VEGF dans les cellules PC-3

Des extraits protéiques de PC-3 traitées (+) ou non (-) avec 45ng/mL de VEGF sont immunoprécipités avec un anticorps contre Fak. Les immunoprécipités sont ensuite soumis à une immunodétection avec l'anti-phosphotyrosine. Résultat représentatif de 4 expériences distinctes.

DISCUSSION

La présente partie est divisée en sections dont les premières portent sur les résultats présentés, suivies de la conclusion et de la proposition de perspectives qui en découlent.

La prostate de chien constitue depuis les années 40, un modèle avantageux par rapport aux rongeurs pour étudier les pathologies prolifératives de la prostate. Ce modèle *in vivo* demeure cependant peu utilisé, mis à part pour le développement de méthodes chirurgicales, l'effet des manipulations hormonales sur les populations cellulaires et quelques traitements de chimiothérapie pour le CaP. Les récentes découvertes du PIN chez le chien ainsi que celle d'une incidence plus élevée du CaP pourraient susciter plus d'intérêt et une utilisation accrue de ce modèle animal (Waters *et al.*, 1996; Waters et Bostwick, 1997a; 1997b; Waters *et al.*, 1998). *In vitro*, en plus des cultures primaires des cellules basales largement utilisées au laboratoire d'accueil, le groupe de Pienta a immortalisé les cellules épithéliales de prostate de chien (Lehr *et al.*, 1998) alors que les groupes de Pierrepont et Cussenot ont développé des lignées cellulaires à partir d'adénocarcinomes prostatiques canins (Eaton et Pierrepont, 1988; Anidjar *et al.*, 2001).

1. Études sur le PGF

Des études réalisées antérieurement ont déjà démontré que les cellules épithéliales prostatiques, canines et humaines normales en culture primaire, répondent préférentiellement aux sérums canin et humain. L'activité mitogénique est associée à des protéines de 150 kDa chez le chien et 50 kDa chez l'humain, ainsi qu'à des composés d'environ 1,5 à 2,0 kDa, présents chez les deux espèces (Chapdelaine et Chevalier, 1985). Chez le chien, le traitement de la fraction de 150 kDa avec de l'acide acétique, suivi d'une chromatographie sur tamis moléculaire, permet de récupérer une partie de l'activité dans les fractions de 1,5 à

2,0 kDa (Chevalier *et al.*, 1993). La nature peptidique de cette fraction a été démontrée par des hydrolyses enzymatique et acide (Chevalier *et al.*, 1993). Puisque la précipitation au sulfate d'ammonium du sérum, suivie de la dialyse entraîne la perte de l'activité mitogénique (dissociation complète; non publié), ceci laisse croire que le PGF est présent sous une forme libre de faible poids moléculaire (taille inférieure aux pores de la membrane à dialyse) qui est aussi associée à une protéine liante ou de transport. Cette situation est similaire à celle des IGF-I et -II (Baxter, 2000) et à celle des FGF (Hanneken *et al.*, 1994). Dans le cas des IGF, différentes protéines liantes, les IGFBP, contrôlent la biodisponibilité des IGF. Dans le cas des FGF, c'est l'héparine qui est principalement responsable de la biodisponibilité des membres de cette famille. De plus, des formes solubles des récepteurs (FGF-BP) ont été décrites et elles agiraient, de concert avec l'héparine, pour réguler l'activité biologique des FGF (Hanneken *et al.*, 1994). Une situation analogue a aussi été décrite pour le TGF β , où le TGF β sécrété par diverses cellules, dont les cellules prostatiques, est inactif (Wilding, 1991). La dissociation du TGF β de son précurseur requiert soit son clivage protéolytique, soit des changements au niveau de la température ou encore du pH (Sporn *et al.*, 1987; Lyons *et al.*, 1990).

La séparation d'ultrafiltrat de sérum de chien sur un tamis moléculaire (fraction libre; 1,5 à 2,0 kDa) et la mesure subséquente de son activité sur l'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN reproduisent fidèlement les résultats obtenus sur le nombre de cellules, ce qui valide le test d'incorporation de thymidine. Étant donné que le PGF est un peptide relativement hydrophobe, retenu sur colonne C-18, le protocole de purification à partir du sérum tient principalement compte de ses caractéristiques hydrophobes. Puisque le sérum est une riche source de lipides, ce protocole de purification incorpore aussi une étape de «délipidation», l'activité mitogénique demeurant dans la fraction aqueuse (Chevalier *et al.*, 1993). L'utilisation d'ultrafiltrat provenant directement du sérum peut être une alternative adéquate comme source de PGF si le volume de l'échantillon est petit et si l'ultrafiltration est suivie de la mesure de l'activité

biologique du PGF par test d'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN, tout en contrôlant l'apport des sels (isotonicité) qui pourraient provoquer des interférences.

Les résultats obtenus démontrent que le PGF libre humain se comporte comme le PGF canin lorsque le protocole établi pour le PGF canin est appliqué. La fraction libre du PGF humain, extraite du sérum, a aussi un poids moléculaire de 1,5 à 2,0 kDa. De plus, le PGF libre humain est retenu sur colonne C-18 et est élué dans les mêmes conditions que son homologue canin.

La comparaison de l'activité PGF des sérums humain et canin normaux et de leurs fractions libre et liée indique une distribution similaire de l'activité. Cette activité est principalement sous forme liée. Le sérum canin est plus actif que le sérum humain lorsqu'il est testé sur des cellules canines. Les résultats d'activité mitogénique des différents sérums humains sur les cellules prostatiques sont prometteurs dans le contexte de changements possibles des niveaux de PGF et de son importance dans les pathologies prolifératives de la prostate. Selon ces résultats, il semble que l'activité des sérums normaux ne varie pas en fonction de l'âge. Par contre, celle des sérums des patients APS+ est plus importante que celle des sérums de référence du même groupe d'âge. La différence ne peut s'expliquer par la provenance (prélèvement, préparation, entreposage) des sérums, car cette source était la même. Le fait de regrouper les sérums permet aussi de minimiser les effets qui pourraient être causés par un ou deux échantillons; chaque catégorie contenant au moins dix échantillons différents. Ces résultats ont aussi été confirmés lors de la comparaison des activités relatives des fractions libres et liées de sérums d'hommes sans évidences de pathologies prolifératives prostatiques à celles des sérums de patients APS+. De plus, une augmentation de l'activité du PGF libre a été observée chez les patients APS+ par rapport aux hommes "normaux". L'activité du PGF libre chez ces patients migre aussi dans la région de 1,5 à 2,0 kDa sur tamis moléculaire (Bio-Gel P-30; résultats non montrés). L'activité accrue de la fraction libre pourrait être la conséquence d'une protéolyse

de la protéine liante, libérant ainsi le PGF libre, ou encore d'une baisse des niveaux de protéine liante, situation similaire à celle déjà rapportée pour les IGFBP (Cohen *et al.*, 1992). Cependant, l'absence d'information sur la condition exacte des patients (sérums regroupés) empêche de tirer des conclusions autre que l'observation que, dans tous les cas, l'activité associée aux sérums des patients APS+ est plus élevée que celle des sérums d'hommes normaux. En effet, tel que présenté à la section 1.3.3.2., un taux d'APS nul ou faible peut être synonyme d'absence de pathologies prostatiques ou encore d'un cancer traité, alors que des valeurs comprises entre 4 et 10ng/mL représentent une zone grise au moment du diagnostic mais deviennent hautement révélatrices lors d'une récurrence du cancer. Cette étude pilote permet de suggérer que le PGF sérique, de même que ses proportions libres et liées, puissent devenir d'intérêt clinique. Sa mesure devra alors tenir compte des connaissances complètes de la situation des patients (âge, taux exact d'APS, stade du cancer, traitements, récurrence, dépendance du cancer aux hormones, présence de métastases, etc...). Un aspect non négligeable à considérer sera l'effet potentiel de l'APS sérique.

Le comptage des cellules au Coulter s'est révélé non satisfaisant pour évaluer la réponse des cellules prostatiques canines en culture primaire aux différents stimuli, alors évidente lors de l'observation des cellules au microscope. Les cellules canines sont relativement résistantes à la trypsine et restent souvent agrégées les unes aux autres malgré les divers traitements étudiés (résultats non montrés). La sous-estimation du nombre réel de cellules a mené à l'utilisation de la coloration des protéines cellulaires des feuillets au bleu de méthylène. Cette technique, bien que qualitative plutôt que quantitative, a permis de démontrer les effets dose-réponse attendus du sérum d'une culture primaire à l'autre et a permis une certaine uniformisation des réponses et le suivi de façon fiable du PGF au cours de son processus de purification.

L'effet du PGF sur la synthèse d'ADN a aussi été démontré après avoir défini différents paramètres. Les résultats présentés à la figure 22 montrent l'importance

de synchroniser les cellules avant l'ajout du PGF afin de maximiser son effet. Ces résultats démontrent aussi l'importance de n'ajouter le précurseur (thymidine tritiée) qu'à la fin de la période d'incubation afin de ne pas masquer l'effet du PGF en raison de la non-linéarité de la cinétique d'incorporation à l'ADN du précurseur pendant une période prolongée. Cet essai, caractéristique des cellules en phase S, permet de reproduire fidèlement et d'appuyer les résultats obtenus sur le nombre de cellules et de démontrer que le PGF agit comme facteur de progression. Étant donné l'interférence, sur l'incorporation de thymidine, des solvants utilisés au cours de la purification du PGF, le nombre élevé de bioessais alors requis, de même que les quantités restreintes de PGF, d'autres méthodes ont été adaptées de méthodes déjà existantes (solubilisation du bleu de méthylène, test MTT et quantification d'ADN par fluorescence).

Les critères choisis étaient l'utilisation de plaques à 96 puits qui permet de réduire les volumes des échantillons précieux et de traiter plusieurs échantillons de façon simultanée et la réduction du nombre de cellules requises (rendement variant selon le poids de la prostate).

La solubilisation du bleu de méthylène pour ensuite en mesurer l'absorbance est une méthode relativement fiable. Cette méthode se comporte sensiblement comme le MTT, un test où la formation de cristaux de formazan reflète l'activité d'une déshydrogénase mitochondriale qui varie proportionnellement à la quantité de cellules vivantes. Ces deux méthodes, le MTT et la solubilisation du bleu de méthylène, montrent, tout comme la détermination du nombre de cellules par comptage (Chevalier *et al.*, 1984), l'effet dose-réponse du sérum. L'étendue de la réponse au sérum dépend de la densité cellulaire et est abolie par inhibition de contact lorsque le nombre de cellules est trop élevé.

La méthode basée sur la quantité d'ADN, où le fluorochrome utilisé s'intercale dans l'ADN, ne semble pas aussi sensible. Parmi les réactifs utilisés, c'est le YO-PRO qui donne les meilleurs résultats. Cependant, le YO-PRO peut aussi

s'intercaler dans l'ARN (Haugland, 1992), quoique plus faiblement. L'utilisation de RNase I dans certains puits en parallèle aurait pu informer sur la proportion de fluorescence occasionnée par l'ARN, mais puisque les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants, cette possibilité n'a pas été examinée. La quantification de l'ADN avec les deux réactifs de Hoechst et avec l'éthidium homodimère-1 s'est avérée non satisfaisante, bien que les contrôles de réactivité des trois fluorochromes sur l'ADN de thymus de veau étaient adéquats. La lyse des cellules étant observable au microscope, le peu de sensibilité obtenu pourrait s'expliquer par le faible nombre de cellules prostatiques par puits. Chaque cellule épithéliale prostatique contient 7pg d'ADN (Blaheta *et al.*, 1991). Puisque le rendement d'adhésion des cellulesensemencées est de l'ordre de 10%, il est estimé que chaque puits, au troisième jour de culture, contient environ 7ng d'ADN pour 10 000 cellulesensemencées. Ceci est en dessous du seuil détecté selon la courbe standard d'ADN de thymus de veau. Selon les tests effectués en fonction de l'ensemencement, la coloration au bleu de méthylène révèle que 6 000 cellules recouvrent complètement la surface d'un puits, pour un maximum possible de 42ng d'ADN détectable. En raison de l'inhibition de contact, une caractéristique des cellules non transformées, ces conditions ne doivent prévaloir qu'à la fin de la culture. Dans les conditions optimales, la quantité d'ADN des cellules non-traitées est estimée à 7ng d'ADN et la quantité d'ADN des cellules stimulées par le PGF atteindrait un maximum de 42ng d'ADN. Cette dernière quantité est au niveau du seuil limite de détection de la courbe standard d'ADN dans les plaques à 96 puits.

Compte-tenu des résultats obtenus avec les diverses méthodes, celle qui est sélectionnée pour évaluer la prolifération des cellules prostatiques est la méthode du MTT. Elle permet l'utilisation de plaques à 96 puits et ainsi de réduire les volumes d'échantillon à utiliser et le nombre de cellules à ensemenecer. Le test au MTT reflète adéquatement l'activité mitogénique du PGF sur les cellules. De plus, le produit de la réaction est aisément quantifiable par mesure spectrophotométrique et reflète l'activité d'une enzyme mitochondriale. Il a été

clairement démontré que l'augmentation du produit de la réaction (transformation du MTT) est directement relié au nombre de cellules (Romijn *et al.*, 1988). Cette méthode est depuis devenue la méthode de choix afin de quantifier l'effet du PGF ou de tout autre stimulus sur la prolifération des cellules épithéliales canines en culture primaire. Elle a aussi plus récemment été appliquée aux lignées cancéreuses prostatiques humaines et les résultats obtenus avec les sérums et le PGF montrent, tout comme ceux présentés à la figure 26 (synthèse d'ADN), des effets sélectifs sur les lignées les plus agressives (androgéno-indépendantes et peu différenciées: PC-3 et PC-3M-LN4) et aucun effet sur la lignée LNCaP (androgéno-dépendante et différenciée).

Puisque les cellules prostatiques normales en cultures primaires sont aussi hormono-indépendantes, c'est-à-dire que leur taux de prolifération est inchangé en présence des stéroïdes sexuels et en présence d'antagonistes des différents stéroïdes endogènes (Chevalier *et al.*, 1984; 1991), il est possible de proposer que le PGF agisse préférentiellement sur les cellules prostatiques selon leur phénotype ou stade de différenciation. Une étude restreinte de spécificité avait déjà démontré que le PGF est actif sur les cellules épithéliales prostatiques, mais inactif sur les fibroblastes prostatiques (Chapdelaine et Chevalier, 1985). D'autres études sont nécessaires pour vérifier si le PGF joue un rôle sur d'autres types de cellules épithéliales comme c'est le cas pour d'autres FC connus. Un mode d'action qui diffère selon le type de cellules, fibroblastes versus cellules épithéliales, a déjà été démontré pour le TGF- β (Sporn *et al.*, 1987) et pour le KGF (Canatan *et al.*, 1996; De Bellis *et al.*, 1998).

La définition des conditions d'électrophorèse permettant de séparer le PGF sur un gel de polyacrylamide en conditions natives (première dimension) puis en conditions dénaturantes (deuxième dimension), a permis de détecter les peptides de la préparation par coloration à l'argent. Étant donné la taille du PGF et celle des ampholines, la focalisation isoélectrique avec sa grande quantité d'urée

interférant à la fois avec la coloration à l'argent et avec le test biologique n'a pu être utilisée.

2. PGF et tyrosine kinase

Les facteurs de croissance (FC) agissent principalement par le biais de récepteurs possédant une activité TK intrinsèque ou associée. Les études réalisées avec le PGF démontrent qu'il a la capacité d'agir au niveau de la synthèse d'ADN et de la division des cellules épithéliales prostatiques (canines en culture primaire et humaines cancéreuses). Il est donc possible que le PGF, de façon similaire à la plupart des FC connus, agisse par le biais de l'activation de TK. Des résultats du laboratoire d'accueil obtenus antérieurement ont montré qu'une panoplie de FC connus (prolactine, insuline, EGF, FGFb, FGFa, IGF-I, arginine-vasopressine, bombésine, bradykinine, kallikréine) ainsi que certains éléments, tels le sélénium et le chlorure de zinc, utilisés seuls ou en présence de 10% de sérum canin, ne sont pas mitogéniques sur les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire (Chevalier *et al.*, 1991). Il est possible qu'une combinaison de ces FC puisse agir en synergie et activer la prolifération des cellules épithéliales prostatiques. Cependant, les résultats obtenus démontrent que la fraction de PGF peut à elle seule reproduire des effets mitogéniques aussi importants que ceux induits par le sérum. Il est toutefois possible qu'un groupe de facteurs possédant des caractéristiques similaires co-purifient et soient responsables de l'activité mitogénique du PGF. Il a été démontré que les cultures primaires de cellules épithéliales de prostates humaines prolifèrent uniquement si plusieurs facteurs aux propriétés distinctes (insuline, sélénium, hydrocortisone, facteur hypophysaire) sont ajoutés au milieu de culture (Peehl, 1992). Par ailleurs, les cellules humaines prostatiques normales en culture primaire prolifèrent en réponse au PGF libre, dans un milieu sans suppléments ni sérum (Chapdelaine et Chevalier, 1985). Par conséquent, le PGF et les molécules de signalisation qui permettent son effet biologique sont potentiellement des éléments-clés de la prolifération des cellules épithéliales prostatiques canines et humaines. Étant donné que le PGF n'est pas

complètement purifié, les premières tentatives d'identification de sa voie de signalisation ont été effectuées avec du sérum de chien. Ces études avaient pour but d'examiner les TK affectées lorsque les cellules sont traitées avec différentes sources de PGF. Ces études préliminaires ont permis de démontrer l'augmentation de la phosphorylation sur tyrosine d'une protéine de 50 kDa. Cependant, il n'a pas été possible d'exclure la contribution des immunoglobulines provenant du sérum canin sur la phosphorylation observée. L'application de la technique de renaturation en gel des kinases, couplée à l'utilisation d'une fraction semi-purifiée du PGF canin (P-30), a permis d'augmenter la sensibilité de l'essai. Cet essai reflète une activité enzymatique plutôt que les niveaux de phosphorylation des protéines sur tyrosine. Dans ces conditions, l'effet du PGF sur l'activité kinasique d'une tyrosine kinase de 50 kDa a été clairement établi. D'autres travaux effectués au laboratoire d'accueil avaient déjà démontré que la principale TK de la prostate humaine est cytosolique et son poids moléculaire apparent est de 50 kDa (Durocher *et al.*, 1989; 1992). De même, la principale TK dans la prostate canine fait aussi 50 kDa (Nguyen *et al.*, 1996; Allard *et al.*, 1997). Une activité kinasique, retrouvée dans la fraction membranaire des cellules prostatiques et comprenant une (des) TK active(s) de 50 kDa a aussi été mise en évidence. Cette activité fait partie d'un complexe de haut poids moléculaire (Nguyen *et al.*, 1996; Allard *et al.*, 1997) et elle n'est pas attribuée à Src, Csk ou Lyn alors que ces dernières se retrouvent dans la fraction cytosolique (Allard *et al.*, 1997). De plus, la proportion de l'activité TK membranaire devient majoritaire dans les cellules en division (Bourassa *et al.*, 1991b; Nguyen *et al.*, 1996). La TK de 50 kDa dont l'activité augmente avec le temps de traitement au PGF pourrait donc être cette kinase qui se déplace à la membrane. Elle pourrait aussi être la kinase associée au récepteur du PGF. La possibilité que cette TK soit intrinsèque au récepteur du PGF n'est pas exclue mais est peu probable puisque l'analyse de la taille de divers récepteurs de FC, dont la structure comporte un domaine extracellulaire de liaison du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine kinasique, indique qu'aucun de ces récepteurs ne possède un si petit poids moléculaire. Une des deux sous-unités du récepteur du HGF a un poids moléculaire d'environ 50 kDa, mais

celle-ci ne possède ni passage transmembranaire, ni activité kinasique (Vigna *et al.*, 1994). Le modèle que nous proposons ressemble à la situation observée avec plusieurs cytokines et veut que la p50 soit une kinase associée à un récepteur de FC dépourvu d'activité TK. Dans ces cas-ci, les TK de la famille de Jak, ainsi que celles de la famille de Src, interagissent avec des récepteurs dépourvus d'activité kinasique. La p50 pourrait aussi être une TK qui n'est pas associée à un récepteur mais qui agirait en aval dans la cascade de signalisation et interviendrait très tôt à la suite de la stimulation des cellules par le PGF. Il est aussi possible que plusieurs p50 co-migrent dans les gels. Des résultats obtenus récemment au laboratoire démontrent que lorsque les cellules canines en culture primaire sont traitées avec le PGF puis recueillies et séparées en fractions cytosolique et membranaire, l'activité kinasique augmentée par la suite du traitement au PGF est retrouvée dans la fraction membranaire. Ce résultat n'exclue pas la possibilité que la p50 puisse être transloquée à partir du cytosol. Les conditions favorisant ce déplacement sont inconnues. Il est peu probable que la p50 soit un membre de la famille de Src puisque les anticorps dirigés contre les membres de la famille de Src et utilisés sur des préparations où l'activité de la p50 est présente, ne montrent aucune réactivité par rapport à la bande de 50 kDa (résultats non montrés). Certains nouveaux membres apparentés à la famille de Src ont bien un poids moléculaire de l'ordre de 50 kDa (Cance *et al.*, 1994). Cependant, contrairement à la p50 activée par le PGF, ceux-ci ne peuvent s'associer aux membranes comme le font les membres de la famille de Src à moins d'interagir avec une autre protéine déjà ancrée à la membrane.

À la lumière de ces résultats, nous proposons que la p50 puisse faire partie de la voie de signalisation du PGF qui mène à la prolifération des cellules épithéliales prostatiques. Peu de kinases impliquées dans les cascades de signalisation des FC connus ont un poids moléculaire de 50 kDa. Ceci exclut aussi les membres de la famille des MAPK, principalement en raison de leur poids moléculaire, mais aussi en raison de leur double spécificité (tyrosine et sérine/thréonine kinase). Cependant, les MAPK pourraient probablement correspondre aux deux bandes

retrouvées sous la bande de 50 kDa (analyse des acides aminés phosphorylés non montrée). L'absence de résidus sérine et thréonine parmi les acides aminés phosphorylés sur la p50 peut s'expliquer par leur labilité relative en milieu alcalin (2h à 56°C dans une solution de 2N KOH) (Durocher et Chevalier, 1994). Une nouvelle phosphoprotéine de 50 kDa mais dépourvue d'activité kinasique, cdc37, est associée de façon transitoire à Raf et à la p60Src (Perdew *et al.*, 1997). Cette protéine de 50 kDa est essentielle à l'activité de Raf (formation d'un complexe ternaire composé de Raf, cdc37 et hsp90) et par le fait, à la transmission du signal par la voie de signalisation de Ras/Raf/MAPK (Grammatikakis *et al.*, 1999). Cdc37 stabiliserait les protéines qui sont impliquées dans la réactivation des kinases et elle pourrait aussi bloquer le site actif des kinases, en plus d'être impliquée dans la régulation des kinases dépendantes des cyclines (cdk) (Hunter et Poon, 1997). Il appert que les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de la p50 changent lors de la stimulation des cellules avec un mitogène. Il est donc peu probable que cette p50 soit la TK dont l'activité augmente lorsque les cellules sont traitées avec du PGF. La cdc37 est plutôt située dans le cytoplasme, près du noyau, et elle n'est pas associée aux membranes. Il est intéressant de souligner que cdc37 est exprimée dans la prostate cancéreuse et pré-cancéreuse (Stepanova *et al.*, 2000). Des souris transgéniques exprimant cdc37 dans la prostate montrent une variété d'anomalies reliées à la croissance de la prostate, telles que l'hyperplasie et la dysplasie des cellules épithéliales (Stepanova *et al.*, 2000). Finalement, une TK de 55 kDa identifiée dans les membranes de muqueuses gastriques a récemment été décrite en utilisant un anticorps fabriqué à partir de la protéine partiellement purifiée extraite du gel (Majumdar et Goldenring, 1998). La protéine immunoprécipitée était capable de s'autophosphoryler et de phosphoryler l'énolase, un substrat des membres de la famille de Src (Majumdar et Goldenring, 1998). Selon les auteurs, cette p55 pourrait être la p54 hautement similaire à Src dont l'activité est augmentée par un traitement à la gastrine (Singh *et al.*, 1994). Les caractéristiques de cette TK sont similaires à celles de la p50 dont l'activité est augmentée par le traitement des cellules au PGF mais qui n'est pas reconnue par les anticorps dirigés contre Src. Des études supplémentaires sont

requis afin de confirmer ou d'infirmier l'existence d'un lien entre la p50 stimulée par le PGF et la p55 gastrique.

3. Caractérisation de tyrosine kinases exprimées dans les cellules épithéliales prostatiques en culture primaire

L'importance des TK en tant que récepteurs de FC ou encore de molécules de signalisation dans les voies régulant les fonctions des cellules n'est plus à démontrer. En ce sens, l'identification de TK exprimées dans les cellules épithéliales prostatiques constitue un avantage majeur afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de l'induction de la prolifération de ces cellules à la suite de leur adhésion et étalement en feuillet primaire.

Les cellules en cultures primaires sont un bon modèle mimant le CaP humain avancé. En effet, lorsque les cellules prolifèrent, elles reproduisent fidèlement les conditions observées dans le CaP androgéno-indépendant (présence du récepteur des androgènes, réponse à un FC, insensibilité aux hormones). Dès le début des années 1980, le laboratoire d'accueil a postulé que les cellules en culture primaire, qui expriment aussi des cytokératines spécifiques aux cellules basales, seraient en fait des cellules souches à partir desquelles les cellules différenciées sont issues. Cette hypothèse, maintenant généralement acceptée, provient de l'observation que lorsque les cellules épithéliales de prostate canine sont cultivées pendant deux à trois semaines, elles changent de densité et de taille et synthétisent la PAP, un marqueur de différenciation des cellules prostatiques (Chevalier *et al.*, 1981; Dionne *et al.*, 1983). L'étude des mécanismes qui contrôlent les fonctions de ces cellules normales devrait permettre d'identifier des modulateurs de leurs fonctions. De telles études, réalisées de pair avec des cellules prostatiques humaines cancéreuses, offrent la possibilité d'établir un parallèle entre les cellules normales qui prolifèrent en culture primaire et la phase androgéno-indépendante du CaP.

Les cellules immatures, fraîchement dissociées, de la prostate normale de chien sont dites au repos car elles ne synthétisent pas d'ADN. Ces cellules expriment peu de tyrosine kinases, tel que révélé par le faible niveau de protéines phosphorylées sur tyrosine (résultats non montrés). Certaines TK connues, telles Fak et Src, ne sont pas exprimées dans ces cellules. Comme c'est le cas pour la grande majorité des cellules normales, les cellules épithéliales prostatiques canines doivent adhérer à un substratum avant d'entrer dans le cycle cellulaire. Dans le cas présent, la vitronectine soluble, contenue dans le sérum de veau foetal dialysé, enrobe les cellules et permet leur adhésion (Chevalier et Chapdelaine, 1991). La vitronectine étant une protéine de la matrice extracellulaire, la présence de son récepteur sur des cellules épithéliales prostatiques isolées a été vérifiée (Tremblay *et al.*, 1996a). Ces cellules adhèrent aussi plus rapidement à une ECM naturellement produite par des cellules homologues et qui contient de la vitronectine (Chevalier et Chapdelaine, 1991; Tremblay *et al.*, 1996a). Ces conditions favorisent l'expression de certaines kinases, notamment Fak (Tremblay *et al.*, 1996a). Étant donné que l'adhésion et l'étalement des cellules sont des étapes importantes pour leur progression dans le cycle cellulaire, l'étude de kinases exprimées dans ces cellules au début de leur culture peut contribuer à décortiquer les mécanismes impliqués.

Quelques groupes se sont intéressés aux protéines dont la présence est requise afin que les cellules adhèrent au pétri et qu'elles entrent et progressent dans le cycle cellulaire où interviennent alors les cyclines, leurs kinases et leurs inhibiteurs. Ainsi, en utilisant un inhibiteur des TK, il a été démontré que les fibroblastes avaient absolument besoin de TK pour pouvoir franchir le point de restriction G₁/M (Kuzumaki *et al.*, 1996). De plus, un signal autre que celui passant par les MAPK, précédant l'activation de Raf et passant par le biais des TK, serait nécessaire pour que des cellules adhérentes entrent dans le cycle cellulaire (Le Gall *et al.*, 1998). Ces travaux démontrent l'importance des TK possiblement localisées dans les plaques d'adhésion puisque ces signaux font suite à l'adhésion des cellules, pour contrôler l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire.

La sélection des différentes TK dont la cinétique d'expression est étudiée dans cette thèse vient du fait qu'elles ont, pour la plupart, été identifiées par clonage moléculaire d'une banque d'ADNc construite à partir des cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire (72h post-ensemencement, donc en prolifération) et criblée avec un anticorps contre la phosphotyrosine. Cette approche a permis d'identifier 4 TK: Fak, Fer, Lyn et le R-KGF. Src, Csk et le récepteur 1 du FGF (R1-FGF) ont aussi été étudiés en parallèle. La cinétique d'expression de ces TK montre qu'elles ne sont pas exprimées dans les cellules immatures fraîchement isolées de la prostate (sauf pour Lyn, Csk et p50Src), mais leur expression est induite de façon parallèle à l'étalement des cellules. L'importance de la synthèse de nouvelles protéines est démontrée par la présence de cycloheximide dans le milieu de culture. Il avait déjà été montré que, contrairement à l'adhésion initiale des cellules (24h), l'étalement des cellules épithéliales prostatiques canines nécessite la synthèse de nouvelles protéines qui sont aussi requises pour leur division (Chevalier *et al.*, 1991).

Puisque plusieurs protéines phosphorylées sur tyrosine (dont Fak, Src et Csk) sont localisées dans les plaques d'adhésion, points de contacts entre la membrane plasmique d'une cellule et les protéines de l'ECM, il est possible de proposer que les résultats obtenus reflètent la nécessité de ces kinases pour la formation des plaques d'adhésion, l'étalement des cellules qui en découle, ainsi que l'entrée subséquente dans le cycle cellulaire.

Le KGF est un membre de la famille des FGF décrit comme agissant spécifiquement sur les cellules épithéliales. Le KGF a été cloné dans la prostate canine (Canatan *et al.*, 1996). Dans la prostate humaine, le KGF serait produit par les cellules stromales et exercerait une action paracrine sur les cellules épithéliales, favorisant ainsi la prolifération des cellules épithéliales humaines (De Bellis *et al.*, 1998). L'expression du récepteur du KGF et du R1-FGF dès les premiers jours de culture pourrait suggérer que ces facteurs soient requis très tôt dans les processus

mis en branle dans les cellules épithéliales prostatiques en culture primaire. À cet égard, la nécessité du récepteur 1 du FGF afin que les cellules cancéreuses prostatiques traversent le point de restriction G₂/M du cycle cellulaire vient d'être rapportée (Ozen *et al.*, 2001). L'absence de phosphorylation du R1-FGF pourrait soit s'expliquer par l'absence du ligand ou encore par une activation précédant la prolifération des cellules prostatiques canines (72h de culture).

Fer est une TK exprimée de façon ubiquitaire. Selon les différentes écoles de pensée, Fer pourrait exercer plusieurs fonctions dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules. Ainsi, dans certaines cellules, Fer est impliquée dans la voie de signalisation des cadhérines, étant donné son association avec certaines caténines (Kim et Wong, 1995). Fer est aussi impliquée dans la voie des intégrines où il a été démontré que Fer pouvait s'associer à Fak et ainsi coupler la voie de signalisation des intégrines à celle des cadhérines (Arregui *et al.*, 2000). Certains FC (EGF et PDGF) ont la capacité d'activer Fer et de favoriser la phosphorylation de la cortactine (Kim et Wong, 1995; 1998). De plus, un signal de localisation nucléaire a été décrit pour Fer (Hao *et al.*, 1991). L'importance de cette séquence de localisation nucléaire, ainsi que sa translocation dans le noyau en phase G₁/S du cycle cellulaire, ont été démontrées (Ben-Dor *et al.*, 1999) dans le noyau où Fer peut potentiellement exercer de nouvelles fonctions. L'expression de Fer est augmentée dans les cas de CaP comparativement à la prostate normale ou hyperplasique (Allard *et al.*, 2000a). De plus, dans les cellules épithéliales de prostate de chien, Fer est retrouvée presque exclusivement dans le cytoplasme (non publié), alors que dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines, Fer se retrouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Allard *et al.*, 2000a). Cette différence de localisation pourrait potentiellement être reliée à la transformation des cellules. Dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines, la forte diminution de l'expression de Fer (suite à la transfection d'un ARN anti-sens) inhibe la prolifération des cellules en feuillet et la formation des colonies en agar mou et ce, sans affecter de façon notable l'adhésion de ces cellules (Allard *et al.*, 2000a). L'absence d'effet sur l'adhésion des cellules suggère que Fer n'est pas

impliquée dans les interactions cellule-ECM. À cet égard, Fer n'est pas associée à Fak dans les conditions de culture primaire, tel que démontré dans cette thèse. Cependant, la récente démonstration d'une telle association, par le biais de peptides synthétiques, suggère que Fer pourrait être impliquée dans les interactions cellule-ECM (Arregui *et al.*, 2000). Fer pourrait donc jouer un rôle dans les interactions cellule-ECM, cellule-cellule, dans la structure des cellules normales (effet sur le cytosquelette), ou encore dans la division des cellules, de par sa localisation nucléaire dans les cellules cancéreuses. En fait, différentes fonctions de Fer pourraient exister selon le phénotype des cellules (normales ou cancéreuses), la distribution intracellulaire de Fer et l'expression de ses partenaires de signalisation.

Lyn est un membre de la famille de Src dont la présence a surtout été décrite dans les cellules hématopoïétiques (Yamanashi *et al.*, 1989). Cependant, son expression a aussi été rapportée dans le cancer de l'endomètre chez la femme (Couchman *et al.*, 1997). Dans le système nerveux central, Lyn est couplée au récepteur du glutamate et induit un signal qui passe par la voie des MAPK (Hayashi *et al.*, 1999). De façon générale, Lyn est exprimée sous forme d'un doublet de 53 et 56 kDa. Cette différence de taille des protéines Lyn, produites par épissage alternatif, est attribuée à une petite région dans la portion N-terminale de la protéine (Yamanashi *et al.*, 1987). Aucun rôle distinct pour les deux protéines n'a encore été établi. Dans la prostate canine, la forme de 56 kDa a été obtenue lors du criblage à l'anticorps contre la phosphotyrosine. Cependant, les deux formes sont exprimées conjointement et toutes deux s'associent à Fak. L'expression de p56Lyn, dans les cellules épithéliales en culture primaire, augmente préférentiellement par rapport à celle de p53Lyn, dont le niveau demeure à peu près inchangé et est peu affecté par la présence de cycloheximide dans le milieu de culture. Ces résultats suggèrent la possibilité de rôles distincts pour les deux formes de Lyn.

L'expression de Fak en fonction du temps de culture montre que cette kinase est détectée alors que les cellules ont déjà adhéré au pétri et se sont étalées pour entrer en synthèse d'ADN. À la lumière de ces résultats, il semble que Fak n'est pas directement impliquée dans l'adhésion proprement dite des cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lorsque des cellules, dont le gène de Fak a été inactivé (Fak^{-/-}), sont mises en culture, qu'elles adhèrent bien au pétri et qu'en plus, elles présentent un nombre élevé de points de contacts focaux (Illic *et al.*, 1995). Ces cellules présentent par contre un défaut majeur au niveau de leur capacité à se déplacer et à migrer (Sieg *et al.*, 1998). Fak permettrait plutôt la formation de points de contact et leur disparition avec le mouvement des cellules. Fak pourrait donc être importante pour l'étalement des cellules, un processus qui implique un mouvement des cellules. Dans plusieurs types de cancers, dont celui de la prostate, Fak est surexprimée et activée (Tremblay *et al.*, 1996b). Des changements des patrons d'expression des intégrines ont été rapportés dans les lignées cellulaires prostatiques humaines cancéreuses (Witkowski *et al.*, 1993; Haywood-Reid *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1999). Fak pourrait donc exercer une fonction qui permettrait aux cellules cancéreuses prostatiques de se déplacer et de se disséminer dans l'organisme. Cette hypothèse a récemment été mise de l'avant par les résultats de l'équipe de Parsons, montrant que la capacité migratoire des PC-3 et DU145 est directement reliée à l'expression et l'activation de Fak et que l'activité de Fak dépend de l'adhésion des cellules (Slack *et al.*, 2001). La participation de Fak à d'autres processus n'est pas à exclure puisque de nouvelles fonctions sont maintenant associées aux intégrines. Ainsi, les intégrines peuvent activer une forme latente du TGF β (Munger *et al.*, 1999), elles sont impliquées dans la modulation de l'apoptose (Brassard *et al.*, 1999), dans l'angiogénèse (Friedlander *et al.*, 1995; Eliceiri *et al.*, 1998; Soldi *et al.*, 1999) et dans la voie de signalisation du récepteur de l'urokinase (Wei *et al.*, 1996; 1999).

L'association de Src et de Fak a fait l'objet de plusieurs études, dont certaines sont contradictoires. Une association entre ces deux TK n'a pu être démontrée dans les fibroblastes 3T3 (Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1996). Dans ces

cellules, la bombésine, qui active à la fois Fak et Src, agit de façon distincte sur ces deux kinases, démontrant ainsi qu'il s'agit de deux événements reliés, mais indépendants l'un de l'autre (Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1996). L'équipe de Schaller a montré, à l'aide de peptides synthétiques, que Fak et Src s'associent, *in vitro*, par les domaines SH2 et SH3 de Src (Thomas *et al.*, 1998). Les résultats présentés dans cette thèse démontrent une association entre Fak et Src dans les cellules en culture. Ce complexe est mis en évidence à la suite du traitement des cellules avec de l'orthovanadate de sodium, à titre d'inhibiteur des phosphotyrosine phosphatases (PTP). Il est donc possible de proposer que l'orthovanadate (ajouté au milieu sans sérum) empêche la déphosphorylation des résidus tyrosine de Src et/ou de Fak et stabilise leur association et la formation de complexes de signalisation. D'ailleurs, des fibroblastes déficients en PTP-PEST (une phosphotyrosine phosphatase) montrent une forte augmentation des niveaux de phosphorylation de Fak (Angers-Loustau *et al.*, 1999), suggérant que les niveaux de phosphorylation de Fak soient régulés par cette phosphatase. En utilisant l'approche avec l'orthovanadate de sodium, l'interaction de Fak et de p53/56Lyn, un membre de la famille de Src, a aussi été démontrée. Lyn pourrait jouer un rôle redondant à celui de Src dans les cellules prostatiques, tel que démontré chez les souris à la suite de l'inactivation des gènes de divers membres de la famille de Src (Hibbs et Dunn, 1997). L'association de Lyn à Fak dans les cellules B appuie cette hypothèse (Mlinaric-Rascan et Yamamoto, 2001).

La présence d'une forme de Src de 50 kDa, distincte du produit de clivage protéolytique en N-terminal de p60Src retrouvé dans les plaquettes (Dhar et Shukla, 1991), et présente principalement dans les cellules quiescentes, ouvre la voie à une nouvelle avenue de recherche. En effet, cette p50Src détectée dans les cellules prostatiques posséderait son domaine N-terminal puisque l'anticorps dirigé contre les acides aminés 2 à 17 de v-Src reconnaît à la fois la p50Src et la p60Src. De plus, puisque la p50Src immunoprécipitée par l'anticorps reconnaissant le domaine N-terminal est active sur l'énolase (observations non publiées), cela implique que son domaine kinasique est fort probablement intact.

Les résultats obtenus à la suite de la focalisation isoélectrique dans les lignées humaines et des deux anticorps utilisés en immunodétection, montrent aussi la présence de protéines distinctes (p50Src et p60Src), de même qu'une forme de 48 kDa. Différentes isoformes de p60Src ont été décrites (Budde, 1993; Kefalas *et al.*, 1995). Elles seraient reliées à divers degrés de phosphorylation de la protéine, ailleurs que sur Tyr416 et Tyr527, deux résidus importants pour l'activité de Src (Budde, 1993). Des études visant à élucider la structure de ces kinases, telles que mises en évidence dans les cellules prostatiques, devraient permettre de déterminer les parties tronquées de la p60 pour arriver à générer des protéines de 48-50 kDa c'est-à-dire, si elles sont le résultat d'un épissage alternatif plutôt que d'un clivage protéolytique et finalement, l'activité kinasique de ces protéines, leur rôle dans la prostate. La détermination des conditions exactes qui favorisent leur expression plutôt que celle de la p60Src donnerait possiblement un aperçu de leur fonction. Dans les cellules intestinales de rat, il a été démontré que la gastrine induisait la phosphorylation sur tyrosine de huit protéines dont deux ont un poids moléculaire d'environ de 62 et 54 kDa (Singh *et al.*, 1994). Ces protéines seraient similaires à Src puisqu'elles sont immunoprécipitées et immunodéctées par un anticorps reconnaissant Src (Singh *et al.*, 1994). Les divers membres de la famille de Src ont une homologie de l'ordre de 70% (Cance *et al.*, 1994), mais ils ne sont généralement pas reconnus par des anticorps spécifiques à Src lorsque ceux-ci sont utilisés pour des immunodétections. Une nouvelle famille de protéines qui possèdent environ 50% d'homologie avec Src a récemment été identifiée. Ses membres, p50Brk (Mitchell *et al.*, 1994), p56Sik (Vasioukhin *et al.*, 1995) et p94Fnk (ou Rak) (Cance *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994), possèdent certaines des caractéristiques des membres de la famille de Src, dont un poids moléculaire du même ordre et celle d'être des substrats de Csk (Cance *et al.*, 1994). Sik possède environ 80% d'homologie avec Brk (Vasioukhin *et al.*, 1995). Ces kinases n'ont toutefois pas la possibilité de s'ancrer à la membrane, puisqu'elles ne possèdent pas de glycine en position 2 (Mitchell *et al.*, 1994; Cance *et al.*, 1994; Vasioukhin *et al.*, 1995).

Les kinases étudiées dans les cellules épithéliales prostatiques sont vraisemblablement impliquées dans les mécanismes d'étalement des cellules et d'entrée dans le cycle cellulaire. Il est à noter que ces deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives. L'association de Fak et de Src ainsi que celle de Fak et de Lyn, suggère que dans ces conditions, Src et Lyn pourraient être localisées dans les plaques d'adhésion puisqu'il s'agit de la principale localisation de Fak. De plus, dans les cellules prostatiques cancéreuses PC-3, Csk est associée à la paxilline, qui interagit avec Fak (Tremblay *et al.*, 1996b). La paxilline peut aussi se retrouver dans les plaques d'adhésion. Le rôle de Fer dans les cellules normales reste à être élucidé compte tenu de sa localisation dans leur cytoplasme. Il est possible que les interactions entre deux cellules, impliquant les cadhérines et Fer, soient aussi activées, à un degré moindre, par la liaison de la cellule aux protéines de la matrice extracellulaire (Arregui *et al.*, 2000). Fer pourrait donc se retrouver dans les plaques d'adhésion. Un rôle pour Fer sur le cytosquelette et la forme des cellules, étant donné la phosphorylation de la cortactine par Fer pourrait aussi être plausible. Finalement, les membres de la famille du R-FGF (R1-FGF et R-KGF) sont probablement requis pour l'entrée ou la progression dans le cycle cellulaire. Les FGF pourraient aussi avoir un rôle dans les interactions cellule-cellule, tel que suggéré par l'augmentation du nombre de cellules qui s'attachent à une autre couche de cellules du même type en présence de FGF-2 (Richard *et al.*, 1995).

En accord avec les travaux de Kuzumaki *et al.* (1996) et Le Gall *et al.* (1998), ces différentes TK pourraient être requises pour l'entrée dans le cycle cellulaire. En effet, l'adhésion de fibroblastes au substratum joue un rôle primordial pour qu'ils franchissent le point de restriction G₁/S (Kuzumaki *et al.*, 1996). La présence d'inhibiteurs de TK, l'herbimycine A et la génistéine, empêche ces cellules de passer ce point de restriction (Kuzumaki *et al.*, 1996). Ceci indique que l'activité des TK est essentielle. La nécessité d'un signal autre que celui médié par les MAPK, mais qui dépend de l'adhésion des cellules au substratum, a aussi été démontrée (Le Gall *et al.*, 1998). L'inhibition de l'activité kinasique (inhibiteurs spécifiques) ou l'abolition de l'expression des TK (ARN anti-sens,

«gene knockout») étudiées pourrait révéler leur degré d'implication dans l'entrée du cycle cellulaire ou dans sa progression. Ces études pourraient aussi révéler l'implication de ces TK dans l'étalement ou la motilité des cellules. Fak pourrait être concernée puisque les protéines de l'ECM génèrent des signaux de survie qui passent par Fak (Illic *et al.*, 1998). La régulation du cycle cellulaire par des signaux transmis par Fak a aussi été démontrée à l'aide de diverses mutations introduites dans le gène *Fak* (Zhao *et al.*, 1998).

Globalement, les cellules prostatiques au repos, ou quiescentes, qui n'incorporent pas de thymidine à leur ADN (Chevalier *et al.*, 1981), ont une faible activité kinasique et n'expriment que peu de TK (Nguyen *et al.*, 1996). Ces cellules sont en G₀ ou hors du cycle cellulaire. Lorsque ces cellules sont dissociées et mises en culture, elles adhèrent au substratum grâce à la vitronectine (Chevalier et Chapdelaine, 1991), puis, alors qu'elles s'étalent, elles requièrent la synthèse de nouvelles protéines, dont les niveaux maximaux correspondent à l'entrée dans le cycle cellulaire (G₁-S), pour se diviser. Ces cellules normales finissent par cesser de se diviser pour commencer à se différencier (Chevalier *et al.*, 1981).

La présente étude de la cinétique d'induction de certaines TK exprimées à la suite de l'ensemencement des cellules, permet de proposer un rôle critique de ces TK lors de l'étalement des cellules pour progresser dans le cycle cellulaire. Il est possible que certaines de ces TK soient contenues dans les plaques d'adhésion alors que d'autres seraient responsables de la prolifération des cellules épithéliales prostatiques. Des études plus approfondies sur le rôle de chacune d'entre elles et l'effet de leur absence ou perte d'activité permettront de mieux identifier celles qui prennent part activement à ces mécanismes comparativement à celles qui ont un rôle accessoire.

4. Clonage par PCR de kinases exprimées dans les cellules épithéliales de prostate de chien

Depuis la première utilisation de la technique de clonage des kinases en utilisant une approche par PCR (Wilks, 1989), plusieurs nouvelles kinases ont été identifiées. Cette méthode est basée sur la présence de séquences ultra-conservées dans le domaine catalytique des kinases. En effet, onze sous-domaines conservés, séparés par des régions plus ou moins conservées de taille variable, ont été découverts à la suite de la comparaison de la séquence de 65 kinases (sérine/thréonine et tyrosine) et de l'alignement de leurs acides aminés (Hanks *et al.*, 1988). En choisissant deux sous-domaines parmi les plus longs et les plus conservés, Wilks a amplifié par PCR, à partir de l'ARNm de cellules d'une lignée hématopoïétique, les séquences entre ces deux sous-domaines (Wilks, 1989). À partir des 200 clones obtenus, il a identifié quatre kinases connues et il a démontré l'existence de deux nouvelles kinases (Wilks, 1989).

Dans une approche similaire et à partir de cellules de l'intestin de souris, de tumeurs mammaires humaines, de tumeurs du côlon humain et de la prostate, plusieurs groupes ont réussi à identifier des kinases connues ainsi que quelques nouvelles kinases. Ainsi, dans les cellules de l'intestin de souris, sept kinases connues, une nouvelle TK nommée Sik et une nouvelle S/TK nommée Ink76 ont été identifiées (Siyanova *et al.*, 1994). Dans les tissus mammaires humains cancéreux, quatre TK ont été retrouvées, dont deux nouvelles, Brk et une autre encore non-identifiée (Mitchell *et al.*, 1994). Toujours à partir de tumeurs mammaires humaines et d'une lignée cellulaire de tumeur mammaire humaine, 23 kinases déjà connues et 9 potentiellement nouvelles kinases ont aussi été retrouvées (Cance *et al.*, 1993). Ces travaux ont conduit à l'identification de Rak, (Cance *et al.*, 1994), qui s'est finalement avérée être identique à Frk, une kinase identifiée par un autre groupe (Lee *et al.*, 1994). À partir de tissus du cancer du côlon humain, dix TK connues et une nouvelle TK, aussi identifiée par le même groupe dans les tumeurs mammaires, ont été retrouvées (Craven *et al.*, 1995). Dans ce même tissu (côlon), un autre groupe a identifié 26 différentes TK, dont

une seule était une nouvelle TK, nommée CCK-4 (Mossie *et al.*, 1995). Cette méthode a été légèrement modifiée et a été utilisée dans la prostate humaine afin d'établir un profil d'expression des TK, parmi lesquelles différentes TK connues ont été identifiées (Robinson *et al.* 1996).

Au cours de notre étude sur les cellules basales canines en culture primaire, un total de 218 clones ont été étudiés ici, dont 33 contenaient la séquence d'une des sept kinases suivantes: PCTAIRE-1b, Kp78/cTAK1, Ryk, Sek, Jak1, Lyn et Flt-1. Parmi les kinases identifiées par l'approche PCR, le laboratoire s'intéresse plus particulièrement à Kp78/cTAK1 (en raison de son activation suite au traitement avec le TGF- β), Lyn (en raison de son poids moléculaire et de sa baisse d'expression suite au traitement avec le TGF- β) et, suite à son identification par cette méthode, Flt-1 (en raison de sa présence dans les cellules prostatiques et de son activation par le VEGF dans ces mêmes cellules). Revoyons brièvement les kinases obtenues par cette approche ainsi que leur implication dans diverses cellules ou tissus.

PCTAIRE, une S/TK exprimée de façon ubiquitaire, est homologue à une des cyclines dépendantes des kinases (cdk) qui phosphoryle p34cdc2 (Okuda *et al.*, 1992). PCTAIRE fait partie des enzymes impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, mais des résultats laissent croire qu'elle pourrait être importante dans les processus de différenciation de nombreuses cellules (Rhee et Wolgemuth, 1995). PCTAIRE-1 peut aussi s'associer à la protéine 14-3-3 (Le Bouffant *et al.*, 1998), un intermédiaire de la voie de signalisation de Ras. Ceci suggère soit une localisation de 14-3-3 dans le noyau ou encore celle de PCTAIRE hors du noyau.

Kp78 est une S/TK de la famille des MARKS dont le rôle n'est pas encore parfaitement connu et dont la déduction de sa séquence prévoit une protéine de 78 kDa. cTAK1, un autre membre de la famille des MARKS a la capacité de phosphoryler la phosphatase cdc25 (Peng *et al.*, 1998). cTAK1 n'a aucun lien avec TAK-1, un membre de la famille des MAPKKK activé par le TGF- β (Hirose

et al., 1994; Yamaguchi *et al.*, 1995). Le rôle de cTAK1 dans les cellules épithéliales prostatiques demeure énigmatique et la possibilité que cette kinase soit la S/TK d'environ 78 kDa dont l'activité est augmentée sous l'effet du TGF- β dans les lignées cellulaires PC-3 et DU145 (Atfi *et al.*, 1995) fait présentement l'objet de recherches au laboratoire.

Ryk serait une TK ubiquitaire de type récepteur mais dont aucun ligand n'est connu. C'est l'analyse de la séquence de Ryk qui prédit qu'il s'agit d'une TK et la présence possible de deux passages transmembranaires permet de supposer qu'il s'agit d'un récepteur (Tamagnone *et al.*, 1993). De plus, sa séquence est hautement conservée (Stacker *et al.*, 1993). Le poids moléculaire de Ryk, tel que déterminé par immunodétection, varie selon le type de cellule étudié, probablement en raison de la présence de sites potentiels de N-glycosylation (Serfas et Tyner, 1998). Plusieurs groupes ont identifié Ryk en utilisant l'approche par le PCR et l'ont nommée différemment sans savoir qu'il s'agissait en fait de la même protéine (Serfas et Tyner, 1998). Cependant, les tentatives visant à démontrer que Ryk possède une activité TK ont échoué (Serfas et Tyner, 1998). Il semble que chez les embryons de souris, Ryk soit préférentiellement exprimée dans les tissus qui sont en train de se différencier, mais aucun rôle biologique ne peut lui être conféré (Serfas et Tyner, 1998).

Sek est une TK de type récepteur qui appartient à la famille des Eph (Gilardi-Hebenstreit *et al.*, 1992). Sek est principalement impliquée dans le développement embryonnaire du système nerveux (Mori *et al.*, 1995) et elle interagit avec Fyn, un membre de la famille de Src (Ellis *et al.*, 1996). Les ligands de la famille des Eph, les Éphrines, commencent à être identifiés mais leurs fonctions exactes ne sont pas connues. Il semble cependant qu'elles soient impliquées dans l'inhibition de contact, la migration, l'adhésion et la forme des cellules neuronales (Wilkinson, 2000).

Jak1 fait partie de la famille des Jak, des TK cytosoliques qui s'associent aux récepteurs des cytokines dépourvus d'activité TK intrinsèque, ainsi qu'aux récepteurs de FC (Heim, 1996). Jak2, sous l'action de diverses cytokines, interagit avec Raf-1 (Xia *et al.*, 1996). En général, l'activation des Jak favorise le recrutement des STAT, qui se font phosphoryler par les Jak pour ensuite former des dimères actifs à titre de facteurs de transcription (Heim, 1996). La découverte de l'action d'un membre de la famille des STAT, STAT3, en tant qu'oncogène donne une nouvelle perspective à cette voie de signalisation (Bromberg *et al.*, 1999). Elle lui confère un rôle possiblement important dans la progression du cancer, notamment dans la protection contre l'apoptose. Jak1 fait partie des TK identifiées dans le profil des TK prostatiques humaines (Robinson *et al.*, 1996).

La présence de Lyn, un membre de la famille de Src, dans les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire a aussi été révélée par l'approche de criblage des clones avec un anticorps anti-phosphotyrosine. L'utilisation d'anticorps a confirmé l'expression de la protéine sous la forme d'un doublet de 53 et 56 kDa (Hibbs et Dunn, 1997). L'interaction de Lyn avec Fak lui confère un rôle actif dans les cellules épithéliales de prostate canine. La diminution des niveaux d'expression de Lyn sous l'influence du TGF- β (Atfi *et al.*, 1994), qui inhibe la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses humaines, permet de suggérer un rôle pour Lyn dans la voie de signalisation des FC. Un rôle précis et distinct de Src peut être envisagé, mais une redondance avec Src n'est pas à exclure, tel que démontré par l'association de Fak et de Lyn dans les cellules B (Mlinaric-Rascan et Yamamoto, 2001).

La présence de Flt-1, un des récepteurs à activité TK du VEGF, principalement impliqué dans l'angiogénèse, dans les cellules épithéliales prostatiques est, à prime abord, pour le moins inattendue compte tenu du type de cellules utilisées. En effet, jusqu'à tout récemment, Flt-1 était considéré comme spécifique aux cellules endothéliales (Neufeld *et al.*, 1999). Par ailleurs, sa présence a été démontrée dans certains autres tissus humains, tels les testicules (Ergun *et al.*, 1997), les astrocytes

(Krum et Rosenstein, 1998), la thyroïde (Wang *et al.*, 1998), le poumon (Holm *et al.*, 1996), les glandes mammaires (Speirs et Atkin, 1999) et les muscles lisses de l'utérus (Brown *et al.*, 1997), en plus des cellules endothéliales (Wang et Keiser, 1998) et des monocytes (Barleon *et al.*, 1996). Flt-1 a aussi été identifié dans la prostate ventrale du rat (Häggström *et al.*, 1998). Il est intéressant de souligner que KDR (le récepteur-2 du VEGF, aussi connu sous le nom de Flk-1) fait partie des dix TK connues présentes dans le cancer du côlon (Craven *et al.*, 1995). Cependant, puisque dans certains cas l'ARN est extrait d'un homogénat de tissu, il est possible que la présence de vaisseaux sanguins (cellules endothéliales) contribue à la détection de Flt-1 ou de KDR/Flk-1.

5. Expression et activation de Flt-1 par le VEGF

La parfaite homologie de séquence entre le fragment amplifié chez le chien et la séquence du gène humain disponible dans les banques de données permet de croire que ce clone correspond bien au transcrit de Flt-1. Cependant, les études au niveau de la protéine et qui sont réalisées par immunodétection avec deux anticorps montrent plusieurs bandes de poids moléculaires très variés (non montrés). Ces résultats ne peuvent s'expliquer par la protéolyse des protéines car les mêmes échantillons, soumis à d'autres immunodétections, montrent des protéines intactes. De plus, lorsqu'un des anticorps a été pré-incubé avec un peptide contrôle (celui qui a servi à immuniser les lapins), la réactivité de la majorité des bandes a été déplacée. Ceci suggère que la détection avec l'anticorps est spécifique, mais que l'anticorps détecte aussi plusieurs autres protéines que la protéine-cible, Flt-1.

Une approche alternative a été développée, basée sur le fait qu'à titre de récepteur pourvu d'activité TK, Flt-1 initie une voie de signalisation et soit phosphorylée sur tyrosine de façon endogène. Selon ces prémisses, Flt-1 devrait faire partie des protéines repêchées lors de l'immunoprécipitation de l'extrait cellulaire avec un anticorps dirigé contre la phosphotyrosine. Cette approche a

permis de diminuer sensiblement le nombre de bandes détectées. En effet, l'immunodétection, avec l'un des anticorps contre Flt-1, d'un tel immunoprécipité révèle deux à trois bandes (selon les préparations) dont la majeure dans les cellules canines migre à environ 180 kDa et les autres aux environs de 75 à 100 kDa. Ces bandes se retrouvent dans le placenta humain, qui sert de contrôle, et dans les cellules PC-3. L'immunodétection avec l'autre anticorps contre Flt-1 a aussi permis de réduire le nombre de bandes, mais de façon moins marquée et sans révéler de bande majeure au poids moléculaire attendu.

Parallèlement à l'obtention de ces résultats, le Dr Laurent Guy (urologue Français, *fellow* au laboratoire) a confirmé la localisation préférentielle du VEGF dans les cellules NE (Harper *et al.*, 1996). D'autres auteurs ont plutôt démontré une distribution du VEGF dans tous les compartiments de la prostate humaine: stroma et cellules épithéliales (Ferrer *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1997). Ces résultats, apparemment contradictoires, dépendent de la concentration à laquelle est utilisé l'anticorps. En effet, la titration de l'anticorps sur des coupes consécutives de prostate humaine a montré que l'intensité de l'immunodétection varie. Les résultats obtenus montrent que lorsque la concentration de l'anticorps est élevée, il réagit positivement avec les cellules endothéliales, le stroma et les cellules épithéliales (basales, sécrétrices et NE), tandis que lorsque la concentration de l'anticorps diminue (anticorps plus dilué), seules les cellules NE sont marquées (Chevalier *et al.*, sous presse). Les cellules NE peuvent donc représenter une source plus importante de VEGF que les autres compartiments ou types de cellules de la prostate.

Ces résultats, associés à l'expression d'une protéine phosphorylée sur tyrosine reconnue par l'anticorps contre Flt-1 dans les cellules PC-3 ont conduit à la démonstration, pour la première fois sur des cellules prostatiques, de l'action directe du VEGF. En effet, le traitement des cellules PC-3 avec 45ng/mL de VEGF₁₆₅ provoque une augmentation des niveaux de phosphorylation de la bande majeure immunoprécipitée par l'anti-phosphotyrosine et détectée par l'anti-Flt-1,

suggérant que cette bande puisse bien représenter Flt-1. Comme les autres bandes ne sont pas affectées par le VEGF, il est peu probable qu'elles représentent des récepteurs de plus faible poids moléculaire, semblable à ceux rapportés de 120-130 kDa et de faible affinité (Ferrara et Davis-Smyth, 1997), ou encore des formes solubles de Flt-1 puisque l'anticorps reconnaît une séquence de 17 acides aminés située dans la portion C-terminale du récepteur, région qui est absente des formes solubles. Il pourrait s'agir des protéines qui comprennent des séquences similaires à celle reconnue comme épitope par l'anticorps contre Flt-1.

La neuropiline-1 est un nouveau récepteur accessoire pouvant lier le VEGF₁₆₅ (Soker *et al.*, 1998) et qui se retrouve à la surface des cellules tumorales, dont les LNCaP et les PC-3 (Soker *et al.*, 1996). La neuropiline-1 est dépourvue d'activité catalytique et elle sert plutôt de co-récepteur pour la liaison du VEGF à Flk-1/KDR (Soker *et al.*, 1998). Une forme soluble de la neuropiline-1, récemment identifiée dans les cellules PC-3 et LNCaP, pourrait agir en prévenant la liaison des VEGF₁₂₁ et VEGF₁₆₅ à leurs récepteurs (Gagnon *et al.*, 2000). Alors que la présence de la neuropiline-1 suggère que le VEGF pourrait agir directement sur les cellules PC-3 et LNCaP, les auteurs de l'article n'ont pas réussi à démontrer que ces cellules expriment Flt-1 ou Flk-1/KDR (Soker *et al.*, 1998). Les résultats présentés ici montrent que Flt-1, ou une protéine similaire reconnue par l'anti-Flt-1 et phosphorylée sur tyrosine, est exprimée dans les PC-3 et les J3. Par ailleurs, des résultats récents de pontage du ¹²⁵I-VEGF incubé avec les cellules prostatiques cancéreuses humaines (PC-3 et LNCaP), de même qu'endothéliales (HUVEC), ont montré des liaisons spécifiques semblables (déplacées par le VEGF et non par le EGF) au niveau de protéines de surface dont l'une, compatible avec la taille du récepteur Flt-1 (Chevalier *et al.*, sous presse) et retrouvée ici à 180 kDa, dont la phosphorylation est augmentée par le VEGF. Des études montrent l'expression de Flt-1 dans la prostate humaine cancéreuse (Ferrer *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2000) ainsi que dans les cellules DU145 et LNCaP, mais l'absence de Flt-1 dans la prostate normale (Ferrer *et al.*, 1999). Quant à son expression dans la prostate hyperplasique, aussi documentée par ces deux équipes, elle demeure controversée,

puisque non observée par immunohistochimie mais validée par PCR où l'ARNm de Flt-1 est retrouvé dans les cellules épithéliales isolées de prostatites hyperplasiques (Hahn *et al.*, 2000). Puisqu'il est possible que l'une des bandes phosphorylées sur tyrosine soit Flt-1, d'autres études, avec des anticorps plus spécifiques ou des sondes moléculaires, seraient nécessaires pour confirmer les résultats d'augmentation dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux. Quant à Flk-1/KDR, ce récepteur serait présent dans la prostate normale et hyperplasique et absent dans la prostate cancéreuse ainsi que dans les deux lignées cellulaires testées (Ferrer *et al.*, 1999). L'expression de Flt-4 (le récepteur à activité TK du VEGF-C et du VEGF-D) a été démontrée dans les vaisseaux lymphatiques de prostatites humaines et corrélée avec la présence de métastases chez ces patients (Tsurusaki *et al.*, 1999).

D'autres fonctions ont été rapportées pour le VEGF, dont un rôle dans la survie des cellules endothéliales. Ainsi, le VEGF cause une diminution de l'apoptose puisqu'il a été démontré qu'il pouvait activer la kinase Akt de la voie de signalisation de survie des cellules (Gerber *et al.*, 1998). Ceci a été démontré pour les cellules endothéliales en utilisant des dominants-négatifs d'Akt et où le VEGF favorise la survie en élevant l'activité d'Akt (Fujio et Walsh, 1999).

La possibilité que le VEGF joue un ou des rôles sur des cellules non-endothéliales a été démontrée de différentes façons. La présence du VEGF a été rapportée dans différentes cellules (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). L'action du VEGF en tant que facteur autocrinien favorisant la prolifération des cellules a été démontrée au niveau des cellules épithéliales de la rétine (Guerrin *et al.*, 1995) et des cellules du système pileux de la peau (Lachgar *et al.*, 1996). L'effet du VEGF sur l'activation de différents intermédiaires de la cascade de signalisation des FC dans les myocytes cardiaques de rat serait le résultat de l'ischémie (Seko *et al.*, 1998). La régulation de l'expression du VEGF dans les cellules tumorales de côlon pourrait dépendre de l'expression de Src puisque la transfection d'ARNm

anti-sens spécifique à Src induit une diminution de l'expression du VEGF (Fleming *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1998).

Par ailleurs, la présence de Flt-1 et Flk-1/KDR a aussi été démontrée dans les cellules épithéliales et stromales extraites de tissus mammaires cancéreux (Speirs et Atkins, 1999). Dans ce tissu, la présence de Flt-4 est reliée à l'angiogénèse (Valtola *et al.*, 1999). Les travaux de Wang et Keiser (1998) sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, montrent que l'ajout de VEGF *in vitro* favorise la migration de ces cellules et la sécrétion d'une métalloprotéinase. La migration des monocytes est reliée à l'activation de Flt-1 (Barleon *et al.*, 1996) et à l'augmentation de l'expression de certaines intégrines (Heil *et al.*, 2000). Les résultats présentés ici indiquent clairement que, dans les cellules PC-3, le VEGF active une protéine ayant les propriétés de Flt-1 ainsi que Fak. Puisque l'action du VEGF sur Fak a aussi été décrite dans les cellules endothéliales et que Fak est associée à la motilité des cellules, le VEGF pourrait agir sur les cellules épithéliales prostatiques cancéreuses de la même façon que sur les cellules endothéliales, c'est-à-dire en favorisant l'invasion des cellules tumorales et par le fait même, la formation de métastases.

La démonstration que l'activité de Fak est augmentée par le VEGF dans les cellules endothéliales, de même que la phosphorylation subséquente de la paxilline (Abedi et Zachary, 1997), a permis de démontrer l'implication des intégrines dans les voies de signalisation affectées par les VEGF. En effet, l'angiogénèse induite par le VEGF et mesurée par la formation des vaisseaux sanguins dans la cornée de lapin, passe par l'intégrine α_v en association avec β_3 ou β_5 (Friedlander *et al.*, 1995). De plus, l'interaction directe entre Flk-1 et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ dans les cellules endothéliales vient confirmer l'importance de cette paire (Soldi *et al.*, 1999). Dans un modèle *in vivo* étudiant l'angiogénèse dans la peau de souris porteuses d'implants, les résultats d'un autre groupe montrent que ce sont plutôt les intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ qui sont importantes pour l'angiogénèse (Senger *et al.*, 1997). Ce groupe a toutefois admis que la motilité des cellules endothéliales

requiert la participation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et d'un de ses ligands, l'ostéopontine (Senger *et al.*, 1996). Une protéine de 190 kDa, différente du récepteur du PDGF et phosphorylée sur tyrosine en réponse au PDGF, s'associe aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ dans les fibroblastes (Bartfeld *et al.*, 1993). Compte tenu des résultats obtenus dans les cellules prostatiques et du poids moléculaire rapporté pour Flk-1, cette protéine de 190 kDa pourrait être Flk-1.

Plusieurs données expérimentales obtenues antérieurement, couplées aux résultats présentés concernant le VEGF, Flt-1 et Fak, permettent de proposer un modèle qui relie les intégrines, et plus spécifiquement la paire $\alpha_v\beta_3$ dans le contrôle de la motilité des cellules prostatiques. En effet, il a déjà été démontré que la vitronectine était essentielle à l'adhésion des cellules épithéliales prostatiques canine au substratum de culture (Chevalier et Chapdelaine, 1991). La vitronectine est aussi une des composantes de l'ECM fabriquée par ces cellules (Chevalier et Chapdelaine, 1991). De plus, l'invasion des cellules prostatiques cancéreuses humaines LNCaP requiert la fonctionnalité de cette paire d'intégrines et met aussi en cause Fak (Zheng *et al.*, 1999). Étant donné l'importance de la vitronectine et de son récepteur dans la prostate, en plus de l'effet du VEGF sur l'activité de Fak et la présence des récepteurs du VEGF, il est possible de proposer que toutes ces protéines interagissent pour réguler la motilité des cellules épithéliales prostatiques, comme c'est le cas pour les cellules endothéliales et les monocytes. Le rôle du VEGF dans les cellules épithéliales prostatiques cancéreuses, passant par les intégrines et Fak, est plausible étant donné la localisation du VEGF dans les cellules NE et l'action de la bombésine, un analogue du GRP produit par les cellules NE, sur la motilité des cellules prostatiques (Aprikian *et al.*, 1997). À ces avancés viennent s'ajouter les résultats récents d'action du VEGF sur la motilité des cellules PC-3 (Chevalier *et al.*, sous presse) et ceux présentés démontrant que les cellules LNCaP cultivées sur l'ECM produite par les PC-3 ou d'autres LNCaP, ont des niveaux d'expression et d'activation de Fak qui sont plus élevés que chez les LNCaP cultivées sur du plastique. La composition de l'ECM produite par les cellules prostatiques

humaines n'a pas été analysée, mais puisqu'elle joue un rôle similaire à celle produite par les cellules canines, i.e. expression et activation accrues de Fak (Tremblay *et al.*, 1996a), il est possible que la vitronectine soit l'une des protéines actives de l'ECM prostatique humaine.

L'ensemble de ces résultats n'empêche pas le rôle du VEGF dans l'angiogénèse mais ils vont au-delà, lui conférant un rôle supplémentaire dans la progression du cancer par une action directe sur la motilité des cellules cancéreuses. À cet égard, Flt-1 s'avère une molécule de choix puisque dans les cellules endothéliales, ce récepteur semble impliqué dans les phénomènes d'invasion et de motilité (Ferrara et Davis-Smyth, 1997; Witte *et al.*, 1998). L'apport de Flk-1, des formes solubles des récepteurs de la famille du VEGF et de la neuropiline-1 devrait aussi être considéré si l'on veut comprendre le rôle du VEGF dans la progression du CaP.

6. Rôle des cellules neuroendocrines dans la progression du cancer de la prostate

La présence des cellules NE dans le CaP est associée à un mauvais pronostic (Aprikian *et al.*, 1998). Les travaux d'Aprikian et ses collègues ont montré il y a plusieurs années que dans la prostate humaine, plusieurs produits de sécrétion étaient exprimés par les cellules NE (Aprikian *et al.*, 1993). L'effet paracrinien de ces produits sur les cellules tumorales prostatiques *in vitro* a été démontré en étudiant l'effet de la bombésine, un analogue du GRP, sur la prolifération (Bologna *et al.*, 1989), la motilité et l'invasion des cellules tumorales prostatiques PC-3 (Hoosein *et al.*, 1993; Aprikian *et al.*, 1997), de même que plus récemment avec l'effet de la calcitonine sur la prolifération des LNCaP (Jongsma *et al.*, 2000). Le mécanisme par lequel la bombésine active les cellules prostatiques cancéreuses implique d'abord sa liaison à des récepteurs de type GRP (Han *et al.*, 1997). Ceci provoque rapidement l'augmentation du calcium intracellulaire (Aprikian *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1997) et la stimulation des niveaux de phosphorylation de Fak ainsi que son association avec plusieurs intégrines β (Aprikian *et al.*, 1997). Cette

stimulation provoque aussi l'association de Src à une protéine nucléaire de 110 kDa (Allard *et al.*, 2000b). Certains des effets moléculaires de la bombésine sur les cellules PC-3 ont aussi été obtenus avec des fibroblastes de souris (Zachary *et al.*, 1993). Cependant, certaines différences entre les deux modèles ont aussi été observées, telle que la nécessité de la PKC.

Les résultats d'invasion, bien que variables quant à l'étendue de la réponse d'une expérience à l'autre, ont permis de confirmer que la bombésine augmente l'habileté de cellules PC-3 à traverser une couche de protéines de type ECM (Matrigel). Il semble que la technique des chambres de Boyden possède certaines limites, possiblement reliées au type de cellules utilisées. Une alternative au comptage des cellules pourrait être un marquage préalable à la thymidine tritiée, suivie de la mesure de la radioactivité des cellules ayant traversé dans l'autre chambre (Xie *et al.*, 1995), en s'assurant que les conditions expérimentales (temps de migration court, synthèse d'ADN, FC dans le Matrigel et temps de doublement) ne gênent pas l'effet recherché. À cet égard, la bombésine n'affecte pas l'incorporation de thymidine des cellules PC-3 (Han *et al.*, 1997) ni leur croissance, évaluée par le test du MTT (non publié). D'autres méthodes ou marqueurs (fluorochrome ou agent radioactif non métabolisé par les cellules), l'utilisation de transwell, la vidéomicroscopie, l'incision des feuillets ou « wound assay » pourraient aussi être envisagées. Cette dernière méthode, soit une incision du feuillet suivie de la mesure de sa largeur suite à la migration des cellules, a été utilisée avec succès sur les cellules PC-3 pour montrer les effets de la bombésine, du VEGF (Chevalier *et al.*, sous presse) et de la PTH (non publié).

En accord avec les résultats du laboratoire, les travaux de Zheng et de ses collègues (1999) appuient l'hypothèse que le phénotype invasif des cellules prostatiques cancéreuses dépend de la voie de signalisation de Fak. En effet, en transfectant les cellules avec de l'ADNc de FRNK (qui correspond à la portion C-terminale de Fak dépourvue d'activité catalytique et capable d'inhiber Fak), les cellules ne peuvent plus migrer (Zheng *et al.*, 1999). Il a déjà été démontré que les LNCaP ne possèdent pas la capacité de migrer et la présence de bombésine

n'affecte pas cette propriété (Hoosein *et al.*, 1993). De plus, ces cellules n'expriment que de très faibles niveaux de Fak et la protéine ne semble pas phosphorylée sur tyrosine et n'a pas la capacité de s'autophosphoryler (Tremblay *et al.*, 1996b). Le potentiel tumorigénique des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques humaines est relié aux niveaux d'expression de Fak. En effet, les cellules les moins tumorigéniques, les LNCaP, expriment moins cette protéine alors que les plus tumorigéniques, les PC-3M, expriment des niveaux élevés de Fak. La séquence du gène de Fak dans les LNCaP et les PC-3 étant identique à celle du gène humain répertorié dans les banques de données, la faible motilité, le peu d'étalement et le faible taux de tumorigénicité de ces cellules ne peuvent donc être imputables à la présence d'une protéine Fak mutée. Il est toutefois possible que la protéine exprimée dans les PC-3 et les PC-3M soit modifiée par rapport à celle dans les LNCaP en raison d'une régulation post-traductionnelle. Ainsi, lorsque les protéines nouvellement synthétisées sont marquées aux acides aminés soufrés-³⁵S, il y a présence d'un doublet à la position de migration de Fak dans les cellules LNCaP, et une seule bande à cette même position dans les PC-3. Ceci pourrait résulter d'une différence des niveaux de phosphorylation de Fak. Il est possible que les protéines associées à Fak soient exprimées de façon différente dans les deux lignées. Il n'est cependant pas possible actuellement, sur la base des expériences réalisées, de déterminer lesquelles pourraient jouer un rôle inhibiteur ou un rôle stimulateur puisque la majorité des protéines détectées, mis à part Fak, se retrouvent aussi dans les immunoprécipités contrôles.

La démonstration que le «VEGF-related protein» (VRP), aussi connu comme le VEGF-C, active RAFTK (mieux connue sous le nom de Pyk2) et la paxilline par le biais de Flt-4 ou Flk-1 dans les cellules érythroleucémiques humaines (HEL) et de moëlle osseuse, laisse supposer d'autres fonctions pour Pyk2 (Wang *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Ainsi, il a été démontré que la surexpression de Fak conduit à une motilité accrue (Reiske *et al.*, 1999), alors que la surexpression de Pyk2 conduit plutôt les cellules vers l'apoptose (Xiong et Parsons, 1997). De plus, ces deux protéines n'ont pas la même distribution cellulaire (Fak étant localisée

dans les plaques d'adhésion et Pyk2 étant péri-nucléaire) et Pyk2 n'est pas phosphorylée sur tyrosine de façon constitutive (Sieg *et al.*, 1998). Une autre différence fondamentale est la nécessité de mobiliser du calcium pour l'activation de Pyk2 par différents facteurs, alors que cette étape de la cascade de signalisation n'est pas requise pour l'activation Fak (Zheng *et al.*, 1998). Par ailleurs, dans les cellules PC-3, le GRP active la mobilisation du calcium intracellulaire (Han *et al.*, 1997), de même que celle de Fak (Aprikian *et al.*, 1997). Des résultats contradictoires ont été rapportés quant à l'activation de Pyk2 en relation avec l'adhésion des cellules à un substratum (implication des intégrines) (Sasaki *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1998). Le rôle complémentaire de Pyk2 et de Fak est exclu étant donné que les souris portant une inactivation du gène de Fak meurent à l'état embryonnaire (Illic *et al.*, 1995). De plus, dans la prostate, l'expression de Fak augmente de pair avec la progression du cancer (Tremblay *et al.*, 1996b) alors que l'expression de Pyk2 diminue dans les mêmes circonstances (Stanzione *et al.*, 2001).

Les résultats obtenus montrent que les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de Fak sont augmentés lorsque les cellules LNCaP sont cultivées sur l'ECM produite soit par les PC-3, soit par les LNCaP. Cette observation suggère que l'ECM naturelle permet une interaction efficace entre Fak et les intégrines. Ceci est en accord avec les travaux de Zheng et ses collègues qui ont montré que lorsque les LNCaP sont transfectées avec la sous-unité β_{3A} des intégrines et que les cellules adhèrent par la suite à la vitronectine, les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de Fak sont aussi augmentés et les cellules ont la capacité de migrer (Zheng *et al.*, 1999). La vitronectine pourrait possiblement être aussi produite par les LNCaP et les PC-3. Des études supplémentaires devraient permettre de vérifier si cette hypothèse est plausible, ainsi que d'établir si cette interaction entre la vitronectine et Fak est responsable de la phosphorylation de Fak. Dans ce cas, cette interaction aurait lieu même en l'absence de transfection des LNCaP avec l'intégrine β_3 . D'autres intégrines, dont la β_5 et de façon un peu moindre, la β_1 , peuvent aussi s'associer à α_v et former un récepteur pour la vitronectine.

Cependant, d'autres travaux montrent que seule l'intégrine α_v est anormale (mobilité électrophorétique et analyse par FACS) dans les LNCaP et non pas la β_3 (Witkowski *et al.*, 1993; Haywood-Reid *et al.*, 1997). La découverte qu'une protéine de l'ECM, le collagène, sert de ligand à des récepteurs possédant une activité TK intrinsèque (Shrivastava *et al.*, 1997), ouvre les portes à la possibilité d'autres types d'interactions. Aucune indication n'existe quant à la voie de signalisation qui pourrait être ainsi activée.

Dans le contexte d'un rôle plus étendu des cellules NE, divers produits de sécrétion des cellules NE ont été testés quant à leur capacité à activer Fak dans les cellules PC-3. Ceci va de pair avec l'hétérogénéité des cellules NE vis-à-vis leurs produits de sécrétion dans la prostate humaine (Aprikian *et al.*, 1993; Abrahamsson, 1999). De plus, plusieurs de ces produits peuvent activer Fak dans d'autres types de cellules. Ainsi, la neuromédine B, un membre de la famille du GRP auquel appartient la bombésine, active Fak dans des cellules de glioblastome de rat ou encore dans des fibroblastes de souris transfectés avec le récepteur de la neuromédine B (Tsuda *et al.*, 1997). Les mécanismes d'activation de Fak par la neuromédine B dans ces deux types de cellules diffèrent de ceux de la thrombine, de l'angiotensine et de l'endothéline, principalement au niveau de l'implication de la PKC (Tsuda *et al.*, 1997). Dans la prostate, seul l'effet de la bombésine sur Fak a été rapporté (Aprikian *et al.*, 1997). Par ailleurs, les résultats présentés ici démontrent que la phosphorylation de Fak est affectée différemment par les produits de sécrétion des cellules NE. La présence de divers récepteurs de ces produits de sécrétion est rapportée par plusieurs groupes. Les récepteurs suivants sont exprimés à la surface des cellules épithéliales prostatiques: GRP (Aprikian *et al.*, 1996; Wasilenko *et al.*, 1997; Bartholdi *et al.*, 1998; Markwalder et Reubi, 1999), VIP (Reubi *et al.*, 2000), calcitonine (Jongsma *et al.*, 2000), somatostatine (Reubi *et al.*, 1995; Nilsson *et al.*, 1995), neurotensine (Elek *et al.*, 2000), bradykinine (Walden *et al.*, 1999), et sérotonine (Abdul *et al.*, 1994). Cependant, il semble que parmi ces produits de sécrétion, seules la GRP et le produit du gène relié à la calcitonine ont un effet stimulateur sur la motilité des cellules les cellules

PC-3 *in vitro* tandis que la substance P inhibe la motilité de ces cellules (Nagakawa *et al.*, 1998). La bombésine ne favorise pas l'adhésion des cellules PC-3, mais plutôt leur motilité (Aprikian *et al.*, 1997). L'efficacité de la bombésine a été démontrée dans d'autres systèmes (lignée cellulaire cancéreuse de côlon humain, fibroblastes 3T3 et fibroblastes de poumon) où elle affecte l'adhésion, l'étalement, la prolifération et/ou la migration des cellules (Saurin *et al.*, 1999; Yule et White, 1999). Il est probable que les différents produits de sécrétion qui ont la capacité d'élever les niveaux de phosphorylation de Fak affectent aussi la motilité des cellules PC-3, étant donné la démonstration du lien entre les niveaux de phosphorylation de Fak et la capacité migratoire des PC-3 (Slack *et al.*, 2001). Des études plus approfondies de dose-réponses ainsi que cinétiques sont nécessaires afin d'évaluer les effets des différents produits de sécrétion des cellules NE sur les cellules PC-3, notamment quant à la motilité, telle que démontrée pour le VEGF et la bombésine (Chevalier *et al.*, sous presse), puis l'invasion. Le lien entre Fak et la motilité des cellules, tel que démontré par la transfection de FRNK dans les LNCaP et les PC-3 et DU-145, est clairement démontré (Zheng *et al.*, 1999; Slack *et al.*, 2001). La possibilité que la plupart des produits de sécrétion des cellules NE affectent d'abord d'autres voies de signalisation puis, ou simultanément, Fak n'est pas exclue et doit être considérée puisque Fak détient un rôle central dans plusieurs voies de signalisation et qu'un bon nombre de FC (IGF, EGF, PDGF) peuvent aussi stimuler son activité. Les molécules de signalisation qui permettent le couplage entre les différents récepteurs (dont ceux couplés aux protéines G et ceux à activité TK) et les intégrines devront être identifiées.

Les récepteurs couplés aux protéines G sont aussi sujets à la phosphorylation, notamment par des TK. Ces TK permettent la désensibilisation des récepteurs, l'arrêt de leur activation et favorisent leur internalisation (Carman *et al.*, 1999). La localisation de ces kinases dans les cavéoles, et leur association avec la cavéoline-1, permettrait d'inhiber leur activité kinasique et, par le fait même, de prévenir la désensibilisation des récepteurs (Carman *et al.*, 1999). Plusieurs molécules de

signalisation sont retrouvées dans les cavéoles, ce qui facilite les interactions entre ces molécules. La nécessité de la cavéoline-1 dans la signalisation induite par les intégrines a été démontrée (Wei *et al.*, 1999), ce qui permet de proposer le couplage de diverses voies sous l'influence de la cavéoline-1. C'est le cas de la voie de signalisation induite par l'insuline où le récepteur de l'insuline se lie à la cavéoline-1 (Yamamoto *et al.*, 1998) et son substrat, IRS-1, se lie aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Vuori et Ruoslahti, 1994). L'association de la cavéoline-1 aux intégrines α permet aussi le recrutement de Fyn (un membre de la famille de Src) et de Shc afin d'activer la voie de signalisation de Ras (Wary *et al.*, 1998). Le rôle des intégrines α comme membres actifs des voies de signalisation a aussi été démontré lors de la stimulation des cellules PC-3 par la bombésine où une protéine d'environ 95 kDa s'associe à α_v (Aprikian *et al.*, 1997). Cette protéine de 95 kDa, phosphorylée sur tyrosine, n'est pas une intégrine β (β_1 , β_3 , β_5) et son identité demeure inconnue (Aprikian *et al.*, 1997). De plus, Flk-1, s'associe aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Soldi *et al.*, 1999) et son ligand, le VEGF, provoque une augmentation de l'activité de Fak (Abedi et Zachary, 1997). Puisque l'action de la bombésine passe par sa liaison à son récepteur, couplé aux protéines G, l'activation rapide d'intermédiaires de la cascade impliquant les protéines G doit précéder l'activation de Fak. De tels intermédiaires seraient donc vraisemblablement situés en amont de Fak et interagiraient possiblement avec les intégrines, tel que démontré par les résultats avec la 95 kDa dont la phosphorylation par la bombésine précède celle de Fak et dont la phosphorylation maximale a lieu à des doses plus faibles de bombésine que celles requises pour Fak (Aprikian *et al.*, 1997). Ces intermédiaires pourraient donc être l'adénylate cyclase, la PI3-K ou les petites protéines G (Rho/Rac). À cet égard, le rôle de la PI3-K et sa nécessité absolue sont de plus en plus mis en évidence dans divers systèmes. Dans les cellules du pancréas de rat, la présence de la PI3-K est requise pour l'activation de Fak par l'EGF (Tapia *et al.*, 1999). Dans le processus de migration des cellules d'ovaires de hamsters chinois (CHO) surexprimant Fak, l'association de la PI3-K à Fak est requise pour que les cellules puissent migrer (Reiske *et al.*, 1999). L'activation directe de la PI3-K par les protéines G abonde dans ce sens (Dhanasekaran *et al.*, 1998). De plus, la

production d'IP₃ par la PLC permet l'activation de Pyk2, l'autre membre de la famille de Fak (Dhanasekaran *et al.*, 1998), mais certains mécanismes peuvent être indépendants de la PLC, comme c'est le cas pour l'action de l'EGF sur Fak (Tapia *et al.*, 1999). Puisqu'il faut quelques minutes avant de pouvoir observer l'activation de Fak par la bombésine dans les cellules épithéliales prostatiques, il est plausible que l'action de la bombésine sur Fak se fasse par le biais de la PI3-K.

L'action des produits de sécrétion des cellules NE prostatiques, vraisemblablement médiée par le biais de leur récepteur respectif, converge vers Fak. Fak devient donc une molécule centrale et importante à plusieurs points de vue et la corrélation établie entre Fak et la progression du CaP prend alors toute sa signification (Tremblay *et al.*, 1996*b*). En effet, les travaux réalisés chez l'humain, et corroborés par le modèle canin (Tremblay *et al.*, 1996*a*), ont démontré la corrélation statistiquement significative entre les niveaux de Fak, tant au point de vue de l'ARNm que de sa protéine, et le CaP avancé (Tremblay *et al.*, 1996*b*). L'augmentation de la présence de cellules NE avec le CaP (Aprikian *et al.*, 1998), et par le fait même de leurs produits de sécrétion, va de pair avec l'effet de certains de ces produits sur l'activation de Fak et la migration (motilité ou invasion) des cellules prostatiques cancéreuses. Par exemple, le VEGF, qui dans la prostate est principalement localisé dans les cellules NE, peut être considéré comme un produit de sécrétion des cellules NE, facilitant leur phénotype agressif. Le VEGF favorise aussi la motilité des cellules endothéliales (Abedi et Zachary, 1997) et des cellules des muscles lisses des vaisseaux sanguins (Wang et Keiser, 1998). De plus, dans le cas des cellules endothéliales, le VEGF active Fak (Abedi et Zachary, 1997) de la même façon que dans les cellules PC-3. Le rôle précis du VEGF dans la prostate doit être approfondi et revu à la lumière de résultats opposés quant aux niveaux du VEGF dans le CaP, et son association avec l'angiogénèse et le stade du cancer (Ferrer *et al.*, 1997; Woessner *et al.*, 1998; Borre *et al.*, 2000; Latil *et al.*, 2000).

7. Conclusion

Les résultats présentés permettent d'augmenter les connaissances au sujet du rôle des facteurs de croissance (FC) et des produits de sécrétion des cellules NE dans la régulation de la prolifération et autres fonctions des cellules épithéliales prostatiques. Ces nouvelles connaissances démontrent qu'un FC prostatique, le PGF, purifié à partir du sérum humain ou canin, active une tyrosine kinase de 50 kDa. L'identité de cette kinase demeure toutefois inconnue mais ouvre une nouvelle voie de recherche. Les études ont mené à la démonstration d'autres isoformes de Src encore jamais démontrées. L'expression d'un récepteur du VEGF, Flt-1, a été démontrée dans les cellules épithéliales de prostate. La localisation du VEGF dans les cellules NE prostatiques, étudiée en parallèle à ces travaux, favorise l'hypothèse d'une action de ce FC sur les cellules épithéliales. Cette action se traduit par une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de Fak et de la bande qui correspond à Flt-1. L'action du VEGF, de divers autres produits de sécrétion des cellules NE et de plusieurs FC connus, sur Fak, en plus de la corrélation entre la présence de Fak et le CaP avancé, en font un point de convergence extrêmement important qui gagnerait à être exploité comme stratégie en vue de développer des traitements contre la progression du CaP. L'activation constitutive de certaines voies de signalisation, notamment celle des FC ou encore d'oncogènes tels que Fak, contribue de façon non négligeable au développement ou à la progression du CaP. La nécessité d'une thérapie génique, spécifique aux cellules prostatiques par le biais d'un promoteur spécifique à la prostate, afin de permettre l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs ou l'inhibition de protéines telles Fak dans le but de prévenir le développement de tumeurs devient alors une nécessité. Étant donné la réactivité croisée de toutes les voies de signalisation, il est improbable qu'une action contre une seule composante soit la thérapie ultime. L'attaque sur divers fronts a potentiellement plus de chances de réussir.

8. Perspectives

Les résultats découlant de cette recherche ouvrent la voie à trois champs d'action.

Le premier concerne le PGF, dont la détermination de sa séquence demeure l'étape critique pour les études subséquentes. Une séquence partielle du PGF ouvrira la porte au développement de sondes et d'anticorps pour cribler une banque peptidique et y repêcher la séquence complète du PGF. La génération d'anticorps permettrait le développement d'un test radioimmunologique afin de doser les quantités libres et liées du PGF dans le sang puisque ces proportions semblent varier lorsque des sérums d'hommes ayant un taux d'APS élevé sont utilisés. Des analyses individuelles seront requises pour être en mesure de déceler les variations propres à la condition de chaque patient. Ces analyses ne pourront être effectuées que lorsque des travaux préliminaires auront permis d'optimiser les conditions pour mesurer sa concentration (préparation de l'échantillon, quantités de sérum à utiliser, méthode de séparation du PGF libre vs le PGF lié, effet de l'absorption de nourriture, *etc*). La régulation du PGF par l'APS pourrait s'avérer un mécanisme affectant la proportion du PGF libre qui se libère de sa protéine liante, tout comme c'est le cas des IGFBP (Cohen *et al.*, 1992). En effet, dans le cas de l'IGFBP-3, il a été démontré que l'APS était responsable de la libération de l'IGF de sa protéine liante, l'IGFBP-3 (Cohen *et al.*, 1992). Si un tel mécanisme prend place dans le cas du PGF, une étude approfondie serait nécessaire afin de connaître les circonstances favorisant un tel effet et sa relation avec les niveaux de PGF et d'APS. Le PGF libre peut être extrait de sa forme liée, en partie suite à un traitement du sérum canin avec de l'acide et/ou de la chaleur (Chevalier *et al.*, 1993), mais complètement si les protéines sont précipitées au sulfate d'ammonium et le PGF libre dialysé. Puisqu'il a été démontré que la proportion de PGF libre était accrue chez les hommes APS+ par rapport aux hommes de 20 à 40 ans, la possibilité qu'une augmentation d'APS relâche le PGF libre par une protéolyse au niveau de la protéine liante demeure possible et pourrait ainsi favoriser la prolifération accrue des cellules prostatiques androgéno-indépendantes. Les

hormones stéroïdiennes sont essentielles pour le développement de la prostate et le maintien de sa fonction et l'influence de ces hormones est à la base des traitements anti-androgéniques utilisés pour le CaP. Ces hormones peuvent possiblement affecter la synthèse, la disponibilité et l'activité du PGF. La connaissance des conditions hormonales des patients ainsi que l'utilisation des modèles (notamment le chien) devraient permettre de déterminer s'il existe une interrelation entre les hormones stéroïdiennes et le PGF. Puisque le PGF s'avère très efficace dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales prostatiques, la connaissance de son mécanisme d'action s'avérera cruciale dans le développement d'antagonistes et/ou dans le blocage de son récepteur ou de diverses composantes de sa cascade de signalisation, dont fait partie la TK p50. L'identification de la p50 devrait aussi permettre de mieux comprendre la voie de signalisation activée par le PGF. L'identification de son récepteur pourra se faire par la méthode de pontage du ligand à son récepteur en utilisant du PGF purifié et marqué à l'iode radioactif. À ce moment, plusieurs avenues pourront être possibles, dont la production d'anticorps contre le récepteur, son clonage et sa régulation. L'ensemble de ces études devrait permettre de mieux cerner le rôle du PGF dans le développement et la progression du CaP.

Un second champ d'action concerne le VEGF et son rôle dans le CaP, nonobstant celui sur Fak et le phénotype agressif des cellules cancéreuses. La découverte de la présence du transcrit de Flt-1 dans les cellules épithéliales prostatiques canines en culture a permis de réaliser les premières études présentées ici. D'autres, de plus longue haleine, seront requises afin de comprendre l'importance de cette découverte. Des études classiques de cinétiques de liaison du ligand devront aussi être envisagées. Le séquençage complet de l'ADNc de Flt-1, et des deux autres récepteurs s'ils s'avèrent être présents (hybridation in situ, immunohistochimie, PCR), pourrait permettre de détecter les différences possibles entre les protéines présentes dans les cellules endothéliales au regard des cellules épithéliales. L'utilisation d'anticorps hautement spécifiques sera souhaitable afin de ré-évaluer la distribution de ces récepteurs dans une banque de tissus

prostatiques. La production de tels anticorps pourrait facilement être réalisée à partir de l'ADNc couplé à la protéine de fusion glutathione S-transférase. La distribution du VEGF dans tous les types de cellules de la prostate ou préférentiellement dans les cellules NE, selon la dilution de l'anticorps utilisé, laisse supposer des patrons d'expression différents du VEGF et amène la possibilité de fonctions différentes du VEGF selon le compartiment dans lequel il est retrouvé (Chevalier *et al.*, sous presse). Le rôle précis de Flt-1 et FLK dans l'effet associé au VEGF pourra être déterminé par des constructions au niveau de l'ARNm (dominant négatif ou "kinase-dead", surexpression, anti-sens, chimères) et la transfection de ces constructions dans les cellules. L'évaluation de leur réponse, sous l'effet du VEGF, devra être réalisée du point de vue de la migration des cellules (effet probablement associé au VEGF) et de Fak. La possibilité d'une corrélation entre le nombre de cellules NE qui expriment le VEGF et le pronostic des patients a aussi été analysée et les résultats sont hautement significatifs (Andonian *et al.*, en préparation). Les résultats ont permis de démontrer que le nombre de cellules NE qui expriment le VEGF n'est pas relié au nombre de vaisseaux sanguins (cellules marquées au facteur VIII). De plus, le nombre de cellules VEGF-positives est augmenté dans les régions de PIN par rapport aux régions normales et dans les régions cancéreuses par rapport aux régions normales. Quant à la relation du VEGF avec le phénotype du cancer, il a été démontré que les patients qui présentent une pénétration capsulaire et une invasion des vésicules séminales ont un nombre de cellules NE VEGF positives plus élevé. La poursuite de telles études permettra donc une meilleure connaissance de l'effet du VEGF sur les cellules épithéliales et son implication dans la progression du CaP.

Le troisième champ d'études concerne Fak. Son rôle central tel que mis en évidence par l'action des produits de sécrétion des cellules NE devra être mieux cerné. Puisque Fak joue une part active dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la forme des cellules et leur mouvement, les altérations au niveau de l'expression de la protéine, réalisées par des constructions au niveau de l'ARNm, devraient affecter le phénotype global des cellules. L'abolition de la protéine ou, au

contraire, sa surexpression devrait permettre de comprendre un peu plus l'importance de Fak dans les cellules épithéliales prostatiques. Un autre aspect à vérifier est le lien possible entre le statut hormonal des patients (androgéno-dépendant versus androgéno-indépendant) ou la tendance à former des métastases et l'expression et l'activation de Fak. L'étude de ce lien pourrait être réalisée en utilisant des cellules qui dérivent de la même souche, mais qui ont des caractéristiques distinctes du point de vue de l'hormono-indépendance ou de la capacité à former des métastases et les différentes constructions réalisées. Des cellules utiles à ce point de vue seraient les LNCaP et ses dérivés (C4 et C4-2), ainsi que les PC-3 et ses dérivés (PC-3M, LN4 et Pro4). L'effet des différentes constructions sur la formation de tumeurs et de métastases devra alors être établi. L'étendue de l'effet des produits de sécrétion des cellules NE suggère que l'inhibition d'un seul de ces produits risque de s'avérer inutile. Par contre, l'effet de ces produits sur les cellules exprimant les différentes constructions de Fak ou sur les lignées dérivant les unes des autres, pourrait indiquer des pistes importantes. Par exemple, le fait que les cellules LN4 ont une cinétique d'activation de Fak par la bombésine qui est différente de celle des autres lignées est probablement significatif mais demande une étude plus grande et plus approfondie. Dans tous les cas, l'objectif ultime est de comprendre les mécanismes qui causent ou favorisent la formation des tumeurs et des métastases. Des études à caractère plus clinique, telles la distribution de Fak dans la prostate, son expression dans les prostatites normales, hyperplasiques ou cancéreuses, la corrélation entre l'étendue de la différenciation neuroendocrine et la présence de Fak ou encore la présence de Fak dans les cellules qui juxtaposent les cellules NE pourront aussi être envisagées. Ces études pourraient aussi inclure Flt-1 ou Flk-1 et Flt-4, ainsi que les récepteurs des produits de sécrétion des cellules NE qui se seront avérés importants dans les études de motilité/invasion des PC-3, dans le cas où leur rôle dans la migration des cellules épithéliales prostatiques aura été établi. Si Fak a un rôle à jouer dans le développement et la progression du CaP, ces études devraient être en mesure de mettre en évidence un des mécanismes

impliqués et permettre de se servir de Fak comme cible de thérapie ou encore comme outil de diagnostic.

Avec le vieillissement de la population, l'incidence du CaP ne fait qu'augmenter et les coûts reliés à son traitement et à son dépistage sont très élevés. Aucun outil de dépistage n'est entièrement fiable et les thérapies utilisées actuellement pour le traitement du CaP avancé ne montrent que des effets transitoires. Globalement, les trois champs d'études proposés, tirés des prémisses établies par cette thèse, permettront d'envisager l'utilisation du PGF, de la p50, du VEGF et/ou de Fak à des fins de dépistage ou thérapeutiques. Ceci favorisera un meilleur suivi des patients atteints du CaP et des traitements plus adéquats et plus efficaces par rapport à leur survie. Avec son haut taux d'incidence, le premier cancer chez l'homme et le deuxième plus meurtrier, il est impératif de mieux comprendre la biologie du cancer de la prostate.

Sources Documentaires

- Abdul, M., Anezinis, P.E., Logothetis, C.J., Hoosein, N.M.** (1994) Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. *Anticancer Research* **14**: 1215-1230.
- Abedi, H., Zachary, I.** (1997) Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 15442-15451.
- Abrahamsson, P.A.** (1999) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* **39**: 135-148.
- Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Mäkinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., Stacker, S.A.** (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 548-553.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y.** (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 5592-5595.
- Allard, P., Atfi, A., Landry, F., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1997) Estradiol activates p60^{src}, p53/56^{lyn} and renatured p50/55 protein tyrosine kinases in the dog prostate. *Molecular and Cellular Endocrinology* **126**: 25-34.
- Allard, P., Zoubeydi, A., Nguyen, L.T., Tessier, S., Tanguay, S., Chevrette, M., Aprikian, A.G., Chevalier, S.** (2000a) Links between Fer tyrosine kinase expression levels and prostate cell proliferation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **159**:63-77.
- Allard, P., Beaulieu, P., Aprikian, A.G., Chevalier, S.** (2000b) Bombesin modulates the association of Src with a nuclear 110kDa protein expressed in dividing prostate cells. *Journal of Andrology* **21**: 367-375.
- Almeida, E.A.C., Illic, D., Han, Q., Hauck, C.R., Jin, F., Kawakastu, H., Schlaepfer, D.D., Damsky, C.H.** (2000) Matrix survival signaling: from

- fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH₂-terminal kinase. *Journal of Cell Biology* **149**: 741-754.
- Anderson, D., Koch, C.A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M.F., Pawson, T.** (1990) Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma1, GAP, and Sec to activated growth factor receptors. *Science* **250**: 979-982.
- Andre, E., Becker-Andre, M.** (1993) Expression of an N-terminally truncated form of focal adhesion kinase in brain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **190**: 140-147.
- Angelsen, A., Mecsei, R., Sandvik, A.K., Waldum, H.L.** (1997) Neuroendocrine-cell in the prostate of the rat, guinea pig, cat, and dog. *Prostate* **33**: 18-25.
- Angers-Loustau, A., Côté, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L.A., Tremblay, M.L.** (1999) Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **144**: 1019-1031.
- Anidjar, M., Villette, J.M., Devauchelle, P., Delisle, F., Cotard, J.P., Billotey, C., Cochand-Priollet, B., Copin, H., Barnoux, M., Triballeau, S., Rain, J.D., Fiet, J., Teillac, P., Berthon, P., Cussenot, O.** (2001) In vivo model mimicking natural history of dog prostate cancer using DPC-1, a new canine prostate carcinoma cell line. *Prostate* **46**: 2-10
- Aoki, M., Batista, O., Bellacosta, A., Tsichlis, P., Vogt, P.K.** (1998) The Akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14950-14955.
- Aprikian, A.G., Cordon-Cardo, C., Fair, W.R., Reuter, V.E.** (1993) Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma. *Cancer* **71**: 3952-3965.
- Aprikian, A.G., Han, K., Chevalier, S., Bazinet, M., Viallet, J.** (1996) Bombesin specifically induces intracellular calcium mobilization via gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **16**: 297-306.

- Aprikian, A.G., Tremblay, L., Han, K., Chevalier, S.** (1997) Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *International Journal of Cancer* **72**: 498-504.
- Aprikian, A.G., Han, K., Guy, L., Landry, F., Bégin, L.R., Chevalier, S.** (1998) Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. *Prostate Suppl* **8**: 52-61.
- Arregui, C., Pathre, P., Lilien, J., Balsamo, J.** (2000) The nonreceptor tyrosine kinase Fer mediates cross-talk between N-cadherin and β 1-integrins. *Journal of Cell Biology* **149**: 1263-1273.
- Assoian, R.K., Zhu, X.** (1997) Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 93-98.
- Atfi, A., Drobetsky, E., Boissonneault, M., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1994) Transforming growth factor β down-regulates Src family protein tyrosine kinase signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 30688-30693.
- Atfi, A., Lepage, K., Allard, P., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1995) Activation of a serine/threonine kinase signaling pathway by transforming growth factor type β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 12110-12114.
- Attwell, S., Roskelley, C., Dedhar, S.** (2000) The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* **19**: 3811-3815.
- Aumüller, G.** (1983) Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *Prostate* **4**: 195-214.
- Aumüller, G., Leonhardt, M., Janssen, M., Konrad, L., Bjartell, A., Abrahamsson, P.A.** (1999) Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* **53**: 1041-1048.
- Aumüller, G., Leonhardt, M., Renneberg, H., von Rahden, B., Bjartell, A., Abrahamsson, P.A.** (2001) Semiquantitative morphology of human prostatic

development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate* **46**: 108-115.

Avraham, S., London, R., Fu, Y., Ota, S., Hiregowdara, D., Li, J., Jiang, S., Pasztor, L.M., White, R.A., Groopman, J.E., Avraham, H. (1995) Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 27742-27751.

Ayala, A.G., Ro, J.Y., Babaian, R., Troncoso, P., Grignon, D.J. (1989) The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* **13**: 21-27.

Banyard, J., Zetter, B.R. (1999) The role of cell motility in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 449-458.

Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., Marme, D. (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87**: 3336-3343.

Baron, V., Calleja, V., Ferrari, P., Alengrin, F., Van Obberghen, E. (1998) p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 7162-7168.

Barrack, E.R., Berry, S.J. (1987) DNA synthesis in the canine prostate: effects of androgen and estrogen treatment. *Prostate* **10**: 45-56.

Barsky, S.H., Siegal, G.P., Jannotta, F., Liotta, L.A. (1983) Loss of basement membrane components by invasive tumors but not their benign counterparts. *Laboratory Investigation* **49**: 140-147.

Bartfeld, N.S., Pasquale, E.B., Geltosky, J.E., Languino, L.R. (1993) The avb3 integrin associates with a 190-kDa protein that is phosphorylated on tyrosine in response to platelet-derived growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 17270-17276.

Bartholdi, M.F., Wu, J.M., Pu, H., Troncoso, P., Eden, P.A., Feldman, R.I. (1998) *In situ* hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP

- receptor) expression in prostatic carcinoma. *International Journal of Cancer* **79**: 82-90.
- Basset, P., Okada, A., Chenard, M.P., Kannan, R., Stoll, I., Anglard, P., Bellcocq, J.P., Rio, M.C.** (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biology* **15**: 535-541.
- Baxter, R.C.** (2000) Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)* **278**: E967-E976.
- Beato, M.** (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**: 335-344.
- Beato, M., Truss, M., Chavez, S.** (1996) Control of transcription by steroid hormones. *Annals of the New York Academy of Sciences* **784**: 93-123.
- Ben-Dor, I., Bern, O., Tennenbaum, T., Nir, U.** (1999) Cell cycle-dependent nuclear accumulation of the p94fer tyrosine kinase is regulated by its NH2 terminus and is affected by kinase domain integrity and ATP binding. *Cell Growth & Differentiation* **10**: 113-129.
- Bergan, R., Kyle, E., Nguyen, P., Trepel, J., Ingui, C., Neckers, L.** (1996) Genistein-stimulated adherence of prostate cancer cells is associated with the binding of focal adhesion kinase to beta-1-integrin. *Clinical & Experimental Metastasis* **14**: 389-398.
- Berruti, A., Dogliotti, L., Mosca, A., Bellina, M., Mari, M., Torta, M., Tarabuzzi, R., Bollito, E., Fontana, D., Angeli, A.** (2000) Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma. *Cancer* **88**: 2590-2597.
- Blaheta, R.A., Franz, M., Auth, M.K.H., Wenisch, H.J.C., Marku, B.H.** (1991) Basic principles of three rapid fluorochrome assays for DNA quantification and cell counting. *Transplantation Proceedings* **23**: 461-463.
- Blaschuk, O.W., Munro, S.B., Farookhi, R.** (1995) Cadherins, steroids and cancer. *Endocrine* **3**: 83-89.
- Blutt, S.E., Weigel, N.L.** (1999) Vitamin D and prostate cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **221**: 89-98.

- Boissonneault, M., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1995) The enhancement by pervanadate of tyrosine phosphorylation on prostatic proteins occurs through the inhibition of membrane-associated tyrosine phosphatases. *Molecular and Cellular Biochemistry* **153**: 139-144.
- Bologna, M., Festuccia, C., Muzi, P., Biordi, L., Ciomei, M.** (1989) Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* **63**: 1714-1720.
- Bonkhoff, H., Wernert, N., Dhom, G., Remberger, K.** (1991) Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate* **19**: 91-98.
- Bonkhoff, H., Stein, U., Remberger, K.** (1994) Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: Simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Human Pathology* **25**: 42-46
- Bonkhoff, H., Remberger, K.** (1996) Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* **28**: 98-106.
- Bonkhoff, H.** (1998) Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Supplement 8*: 18-22.
- Borgström, P., Bourdon, M.A., Hillan, K.J., Sriramarao, P., Ferrara, N.** (1998) Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* **35**: 1-10.
- Borre, M., Nerstrom, B., Overgaard, J.** (2000) Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Clinical Cancer Research* **6**: 1882-1890.
- Bosland, M.C.** (1992) Animal models for the study of prostate carcinogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement 16H*: 89-98.

- Bostwick, D.G., Brawer, M.K.** (1987) Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* **59**: 788-794.
- Bourassa, C., Chapdelaine, A., Roberts, K.D., Chevalier S.** (1988) Enhancement of the detection of alkali-resistant phosphoproteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **169**: 356-362.
- Bourassa, C., Nguyen, L.T., Durocher, Y., Roberts, K.D., Chevalier, S.** (1991a) Prostatic epithelial cells in culture: phosphorylation of protein tyrosyl residues and tyrosine protein kinase activity. *Journal of Cellular Biochemistry* **46**: 291-301.
- Bourassa, C., Nguyen, L.T., Roberts, K.D., Chevalier, S.** (1991b) Characterization of protein kinase activity in the canine prostate. *Biochemistry and Cell Biology* **69**: 146-153.
- Brassard, D.L., Maxwell, E., Malkowski, M., Nagabhushan, T.L., Kumar, C.C., Armstrong, L.** (1999) Integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediated activation of apoptosis. *Experimental Cell Research* **251**: 33-45.
- Brady-Kalnay, S., Tonks, N.K.** (1995) Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors. *Current Opinion in Cell Biology* **7**: 650-657.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., Darnell Jr, J.E.** (1999) *Stat3* as an oncogene. *Cell* **98**: 295-303.
- Broome, M.A., Hunter, T.** (1996) Requirement for c-Src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 16798-16806.
- Brown, L.F., Detmar, M., Tognazzi, K., Abu-Jawdeh, G., Iruela-Arispe, M.L.** (1997) Uterine smooth muscle cells express functional receptors (Flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation* **76**: 245-255.
- Brown, M.T., Cooper, J.A.** (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica et Biophysica Acta* **1287**: 121-149.
- Brunton, V.G., Ozanne, B.W., Paraskeva, C., Frame, M.C.** (1997) A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an in vitro model for the progression of colon cancer. *Oncogene* **14**: 283-293.

- Budde, R.J.A.** (1993) Evidence for kinetically distinct forms of pp60^{c-src} with different K_m values for their protein substrate. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 24868-24872.
- Bui, M., Reiter, R.E** (1999) Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 391-399.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., Picard, D.** (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO Journal of Biological Chemistry* **15**: 2174-2183.
- Canatan, H., Chang, W.Y., Sugimoto, Y., Shidaifat, F., Kulp, S.K., Brueggemeier, R.W., Lin, Y.C.** (1996) Keratinocyte growth factor (KGF/FGF-7) has a paracrine role in canine prostate: molecular cloning of mRNA encoding canine KGF. *DNA and Cell Biology* **15**: 247-254.
- Cance, W.G., Craven, R.J., Weiner, T.M., Liu, E.T.** (1993) Novel protein kinases expressed in human breast cancer. *International Journal of Cancer* **54**: 571-577.
- Cance, W.G., Craven, R.J., Bergman, M., Xu, L.H., Alitalo, K., Liu, E.T.** (1994) Rak, a novel nuclear tyrosine kinase expressed in epithelial cells. *Cell Growth & Differentiation* **5**: 1347-1355.
- Cans, C., Baldin, V., Mils, V., Ducommun, B.** (1998) Les phosphatases CDC25: régulateurs du cycle cellulaire et oncogènes potentiels. *Médecine/Sciences* **14**: 269-274.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S.** (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**: 281-302.
- Carman, C.V., Lisanti, M.P., Benovic, J.L.** (1999) Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 8858-8864.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A.** (1996)

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**: 435-439.

Carpenter, G., Cohen, S. (1979) Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry* **48**: 193-216.

Carson, J.P., Kulik, G., Weber, M.J. (1999) Antiapoptotic signaling in LNCaP prostate cancer cells: a survival signaling pathway independent of phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt/protein kinase B. *Cancer Research* **59**: 1449-1453.

Carter, B.S., Carter, H.B., Isaacs, J.T. (1990) Epidemiologic evidence regarding predisposing factors to prostate cancer. *Prostate* **16**: 187-197.

Casamassima, A., Rozengurt, E. (1998) Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130(Cas), focal adhesion kinase, and paxillin. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a p130(Cas).Crk complex. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 26149-26156.

Chapdelaine, A., Chevalier, S. (1985) Growth promoting factors for normal canine and human prostatic cells in culture. In: *Regulation of Androgen Action: the Proceedings of an International Symposium*. N. Bruchovsky, A. Chapdelaine, F. Neumann éditeurs, 205-210.

Chapman, H.A. (1997) Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 714-724.

Chen, R.J., Glezerson, G., Taylor, L.F., Grundle, H.A.J., Naude, J.H. (1993) The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *Journal of Urology* **150**: 365-368.

Chevalier, S., Bleau, G., Roberts, K.D., Chapdelaine, A. (1980) Characterization of canine prostatic cells from normal and hyperplastic glands. *Molecular and Cellular Endocrinology* **20**: 59-70.

Chevalier, S., Bleau, G., Roberts, K.D., Chapdelaine, A. (1981) Proliferation and differentiation of canine prostatic epithelial cells in culture. *Molecular and Cellular Endocrinology* **24**: 195-208.

- Chevalier, S., Bleau, G., Roberts, K.D., Chapdelaine, A.** (1984) Nonsteroidal serum factors involved in the regulation of the proliferation of canine prostatic epithelial cells in culture. *Prostate* **5**: 503-512.
- Chevalier, S., Chapdelaine, A.** (1988) Requirements for attachment and subsequent growth of canine prostatic epithelial cells in culture. *Prostate* **12**: 231-241.
- Chevalier, S., Chapdelaine, A.** (1991) Involvement of vitronectin and of a natural extracellular matrix in prostatic cell to cell contact and interaction with the substratum in culture. *Prostate* **18**: 9-24.
- Chevalier, S., McKercher, G., Chapdelaine, A.** (1991) Serum and prostatic growth-promoting factors for steroid-independent epithelial cells of adult dog prostate. *Prostate* **19**: 207-220.
- Chevalier, S., McKercher, G., Chapdelaine, A.** (1993) 150-kDa proteins in dog serum bind 1.5-kDa growth-promoting factors for androgen-independent canine prostatic epithelial cells. *Journal of Andrology* **14**: 411-418.
- Chevalier, S., Aprikian, A.G., Beauregard, G., Defoy, I., Nguyen, L.T., Guenette, R.S., Tenniswood, M., Chapdelaine, A.** (1996) Action, localization and structure-function relationship of growth factors and their receptors in the prostate. *Reproductive Medicine Review* **5**: 73-105.
- Chevalier, S., Defoy, I., Lacoste, J., Hamel, L., Guy, L., Bégin, L.R., Aprikian, A.G.** (sous presse) Vascular Endothelial Growth Factor and Signaling in the Prostate: More than Angiogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Chiao, J.W., Hsieh, T.C., Xu, W., Sklarew, R.J., Kancherla, R.** (1999) Development of human prostate cancer cells to neuroendocrines-like cells by interleukin-1. *International Journal of Oncology* **15**: 1033-1037.
- Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M.** (1996) The cell-death machine. *Current Biology* **6**: 555-562.
- Chou, E., Simons, J.W.** (1997) The molecular biology of prostate cancer morbidity and mortality: accelerated death from ejaculate poisoning? *Urologic Oncology* **3**: 79-84.

- Chow, L.M., Fournel, M., Davidson, D., Veillette, A.** (1993) Negative regulation of T-cells receptor signaling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* **365**: 156-160.
- Chow, L.M., Jarvis, C., Hu, Q., Nye, S.H., Gervais, F.G., Veillette, A., Matis, L.A.** (1994) Ntk: a csk-related protein-tyrosine kinase expressed in brain and T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4975-4979.
- Chung, L.W.K., Li, W., Gleave, M.E., Hsieh, J.T., Wu, H.C., Sikes, R.A., Zhau, H.E., Bandyk, M.G., Logothetis, C.J., Rubin, J.S., von Eschenbach, A.C.** (1992) Human prostate cancer model: roles of growth factors and extracellular matrices. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* **16H**: 99-105.
- Clark, E.A., Brugge, J.S.** (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**: 233-239.
- Clemens, T.L., Adams, J.S., Henderson, S.L., Holick, M.F.** (1982) Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D₃. *Lancet* **1**: 74-76.
- Coffey, D.S** (1993) Prostate cancer: An overview of an increasing dilemma. *Cancer* **71**: 880-885.
- Coffey Jr, R., Leof, E., Shipley, G., Moses, H.** (1987) Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *Journal of Cellular Physiology* **132**: 143-148.
- Cohen, P., Grawes, H.C.B., Peehl, D.M., Kamarli, M., Giudice, L.C., Rosenfeld, R.G.** (1992) Prostate-specific antigen is an insulin-like growth factor-binding protein-3 protease found in seminal plasma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **75**: 1046-1053.
- Cohen, P., Peehl, D.M., Stamey, T.A., Wilson, K.F., Clemmons, D.R., Rosenfeld, R.G.** (1993) Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **76**: 1031-1035.

- Cohen, R.J., Glezerson, G., Haffejee, Z.** (1991) Neuroendocrine cells: a new prognostic parameter in prostate cancer. *British Journal of Urology* **68**: 258-262.
- Collins, L.R., Minden, A., Karin, M., Brown, J.H.** (1996) $G\alpha_{12}$ stimulates c-jun NH2-terminal kinase through the small G proteins Ras and Rac. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 17349-17353.
- Colombel, M., Symmans, G., Gil, S., O'Toole, K., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C., Korsmeyer, S., Buttgan, R.** (1993) Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancer. *American Journal of Pathology* **143**: 390-400.
- Cooney, K.A.** (1998) Hereditary prostate cancer in African-American families. *Seminars in Urologic Oncology* **16**: 202-206.
- Cooney, K.A., McCarthy, J.D., Lange, E., Huang, L., Miesfeldt, S., Montie, J.E., Oesterling, J.E., Sandler, H.M., Lange, K.** (1997) Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *Journal of the National Cancer Institute* **89**: 955-959.
- Cooper, J.A., Whyte, P.** (1989) RB and the cell cycle: entrance or exit? *Cell* **58**: 1009-1011.
- Cooper, J.A., Howell, B.** (1993) The when and how of Src regulation. *Cell* **73**: 1051-1054.
- Couchman, G.M., Bentley, R., Tsao, M.S., Raszmann, K., McLachlan, J.A., Walmer, D.K.** (1997) p53lyn and p56lyn: A new signaling pathway in human endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **4**: 103-109.
- Courtneidge, S.A.** (1985) Activation of the pp60c-Src kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation. *EMBO Journal* **4**: 1471-1477.
- Courtneidge, S.A., Fumagalli, S., Kogel, M., Superti-Furga, G., Twamley-Stein, G.M.** (1993) The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions. *Development Supplement*: 57-64.
- Craven, R.J., Xu, L.H., Weiner, T.M., Fridell, Y.W., Dent, G.A., Srivastava, S., Varnum, B., Liu, E.T., Cance, W.G.** (1995) Receptor tyrosine kinases

- expressed in metastatic colon cancer. *International Journal of Cancer* **60**: 791-797.
- Crouch, M.F., Hendry, I.A.** (1993) Growth factor second messenger systems: Oncogenes and the heterotrimeric GTP-binding protein connection. *Medicinal Research Reviews* **13**: 105-123.
- Culig, Z., Hobish, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch G., Klocker, H.** (1994) Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Research* **54**: 5474-5478.
- Culig, Z., Hobish, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Hittmair, A., Zhang, J., Thurnher, M., Bartsch, G., Klocker, H.** (1996) Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* **28**: 392-405.
- Daniel, J.M., Reynolds, A.B.** (1997) Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *BioEssays* **19**: 883-891.
- Davies, P., Eaton, C.L.** (1991) Regulation of prostate growth. *Journal of Endocrinology* **131**: 5-17.
- Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., Yancopoulos, G.D.** (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* **266**: 816-819.
- De Bellis, A., Crescioli, C., Grappone, C., Milani, S., Ghiandi, P., Forti, G., Serio, M.** (1998) Expression and cellular localization of keratinocyte growth factor and its receptor in human hyperplastic prostate tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**: 2186-2191.
- De Marzo, M.A., Nelson, W.G., Meeker, A.K., Coffey, D.S.** (1998) Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *Journal of Urology* **60**: 2381-2389.
- Dedhar, S.** (1995) Integrin mediated signal transduction in oncogenesis: an overview. *Cancer and Metastasis Reviews* **14**: 165-172.

- Dedhar, S., Hannigan, G.R.** (1996) Integrin cytoplasmic interactions and bi-directional transmembrane signaling. *Current Opinion in Cell Biology* **8**: 657-669.
- Deftos, L.J.** (1998) Granin-A, parathyroid hormone-related protein, and calcitonin gene products in neuroendocrine prostate cancer. *Prostate Supplement* **8**: 23-31.
- Denhardt, D.T., Feng, B., Dylan, R.E., Cocuzzi, E.T., Malyankar, U.M.** (1993) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka, EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacology & Therapeutics* **59**: 329-341.
- Denning, M.F., Dlugosz, A.A., Threadgill, D.W., Magnuson, T., Yuspas, S.H.** (1996) Activation of the EGF-receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of PKC δ . *Journal of Biological Chemistry* **271**: 5325-5331.
- Dhanasekaran, N., Reddy, E.P.** (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**: 1447-1455.
- Dhanasekaran, N., Tsim, S.T., Dermott, J.M., Onesime, D.** (1998) Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* **17**: 1383-1394.
- Dhar, A., Shukla, S.D.** (1991) Involvement of pp60-Src in platelet-activating factor stimulated platelets. Evidence for translocation from cytosol to membrane. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 18797-18801.
- Di Sant'Agnes, P.A.** (2000) Divergent neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Seminars in diagnostic Pathology* **17**: 149-161.
- Di Sant'Agnes, P.A., De Mesy Jensen, K.L., Chirukian, C.J., Agarwal, M.M.** (1985) Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **109**: 607-612
- Diaz, M., Abdul, M., Hoosein, N.** (1998) Modulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer by interleukin-1 and -2. *Prostate Supplement* **8**: 32-36.

- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A., Schlessinger, J.** (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* **383**: 547-550.
- Dionne, F.T., Chevalier, S., Bleau, G., Roberts, K.D., Chapdelaine, A.** (1983) Induction of acid phosphatase synthesis in canine prostatic epithelial cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* **33**: 113-126.
- Djakiew, D., Pflug, B.R., Delsite, R., Onoda, M., Lynch, J.H., Arand, G., Thompson, E.W.** (1993) Chemotaxis and chemokinesis of human prostate tumor cell lines in response to human prostate stromal cell secretory proteins containing a nerve growth factor-like protein. *Cancer Research* **53**: 1416-1420.
- Dong, J.T., Lamb, P.W., Rinker-Schaeffer, C.W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J.T., Barrett, J.C.** (1995) *KAI1*, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* **268**: 884-886.
- Dong, J.T., Suzuki, H., Pin, S.S., Bova, G.S., Schalken, J.A., Isaacs, W.B., Barrett, J.C., Isaacs, J.T.** (1996) Down-regulation of the *KAI1* metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Research* **56**: 4387-4390.
- Dorkin, T.J., Robinson, M.C., Marsh, C., Bjartell, A., Neal, D.E., Leung, H.Y.** (1999) FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* **18**: 2755-2761.
- Dragovich, T., Rudin, C.M., Thompson, C.B.** (1998) Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* **17**: 3207-3213.
- Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., Alitalo, K.** (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**: 946-949.
- Duncan, M.D., Harmon, J.W., Duncan, K.L.K.** (1996) Actin disruption inhibits bombesin stimulation of focal adhesion kinase (pp125^{FAK}) in prostate carcinoma. *Journal of Surgical Research* **63**: 359-363.
- Dunning, W.F.** (1963) Prostate cancer in the rat. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* **12**: 351-369.

- Duque, J.L.F., Loughlin, K.R., Adam, R.M., Kantoff, P.W., Zurakowski, D., Freeman, M.R.** (1999) Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* **54**: 523-527.
- Durocher, Y., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1989) Tyrosine protein kinase activity of human hyperplastic prostate and carcinoma cell lines PC3 and DU145. *Cancer Research* **49**: 4818-4823.
- Durocher, Y., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1992) Identification of cytosolic protein tyrosine kinases of human prostate by renaturation after SDS/PAGE. *Biochemical Journal* **284**: 653-658.
- Durocher, Y., Chevalier, S.** (1994) Detection of phosphotyrosine in glutaraldehyde-crosslinked and alkali-treated phosphoproteins following their partial acid hydrolysis in gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **28**: 101-113.
- Eaton, C.L., Pierrepoint, C.G.** (1988) Growth of a spontaneous canine prostatic adenocarcinoma *in vivo* and *in vitro*: Isolation and characterization of a neoplastic prostatic epithelial cell line, CPA 1. *Prostate* **12**: 129-143.
- Ekman, P., Pan, Y., Dich, J.** (1997) Environmental and genetic factors: a possible link with prostate cancer. *British Journal of Urology* **79**: 35-41.
- El-Bayoumy, K.** (1991) The role of selenium in cancer prevention. In: *Cancer Prevention* V.T. Devita, S. Hellman, S. Rosenberg éditeurs, 1-15.
- Elek, J., Pinzon, W., Park, K.H., Narayanan, R.** (2000) Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Research* **20**: 53-58.
- Eliceiri, B.P., Klemke, R., Strömblad, S., Cheresh, D.A.** (1998) Integrin $\alpha_v\beta_3$ requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *Journal of Cell Biology* **140**: 1255-1263.
- Ellis, C., Kasmi, F., Ganju, P., Walls, E., Panayotou, G., Reith, A.D.** (1996) A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59Fyn. *Oncogene* **12**: 1727-1736.
- Ergun, S., Kilic, N., Fiedler, W., Mukhopadhyay, A.K.** (1997) Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue.

Molecular and Cellular Endocrinology **131**: 9-20.

- Evans, C.P., Elfman, F., Parangi, S., Conn, M., Cunha, G., Shuman, M.A.** (1997) Inhibition of prostate cancer neovascularization and growth by urokinase-plasminogen activator receptor blockade. *Cancer Research* **57**: 3594-3599.
- Fair, W., Fleshner, N.E., Heston, W.** (1997) Cancer of the prostate: A nutritional disease? *Urology* **50**: 840-848.
- Feng, S., Xu, J., Wang, F., Kan, M., McKeehan, W.L.** (1996) Nuclear localization of a complex of fibroblast growth factor (FGF)-1 and an NH₂-terminal fragment of FGF receptor isoforms R4 and R1 α in human liver cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1310**: 67-73.
- Ferrara, N., Carvermoore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O Shea, K.S., Powellbraxton, L., Hillian, K.J., Moore, M.W.** (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**: 439-442.
- Ferrara, N., Davis-Smyth, T.** (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews* **18**: 4-25.
- Ferrer, F.A., Miller, L.J., Andrawis, R.I., Kurtzman, S.H., Albertsen, P.C., Laudone, V.P., Kreutzer, D.I.** (1997) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *Journal of Urology* **157**: 2329-2333.
- Ferrer, F.A., Miller, L.J., Lindquist, R., Kowalczyk, P., Laudone, V.P., Albertsen, P.C., Kreutzer, D.L.** (1999) Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* **54**: 567-572.
- Fiedorek, F.T.J., Kay, E.S.** (1995) Mapping of the focal adhesion kinase (Fadk) gene to mouse chromosome 15 and human chromosome 8. *Mammalian Genome* **6**: 123-126.
- Fleming, R.Y.D., Ellis, L.M., Parikh, N.U., Liu, W., Staley, C.A., Gallick, G.E.** (1997) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon carcinoma cells by activity of src kinase. *Surgery* **122**: 501-507.
- Fleshner, N., Fair, W., Huryk, R., Heston, W.** (1999) Vitamin E inhibits the

- high-fat diet promoted growth of established human prostate LNCaP tumors in nude mice. *Journal of Urology* **161**: 1651-1654.
- Fleshner, N.E., Klotz, L.H.** (1999) Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 325-330.
- Folkman, J.** (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* **285**: 1182-1186.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L.** (1995) Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**: 66-70.
- Foster, C.S., Ke, Y.** (1997) Stem cells in prostatic epithelia. *International Journal of Experimental Pathology* **78**: 311-329.
- Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., Cheresch, D.A.** (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct α_v integrins. *Science* **270**: 1500-1502.
- Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E., Chan-Hui, P.Y.** (1996) Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *Journal of Cell Biology* **134**: 793-799.
- Frisch, S.M., Ruoslahti, E.** (1997) Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 701-706.
- Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D., Birchmeier, W.** (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *Journal of Cell Biology* **113**: 173-185.
- Fudge, K., Wang, C.Y., Stearns, M.E.** (1994) Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor α and β receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas. *Modern Pathology* **7**: 549-554.
- Fujio, Y., Walsh, K.** (1999) Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 16349-16354.
- Gagnon, M.L., Bielenberg, D.R., Gechtman, Z., Miao, H.Q., Takashima, S.,**

- Soker, S., Klagsbrun, M.** (2000) Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: *in vivo* expression and antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **97**: 2573-2578.
- Gale, N.W., Yancopoulos, G.D.** (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & Development* **13**: 1055-1066.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N.** (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 30336-30343.
- Gervais, F.G., Veillette, A.** (1995) The unique amino-terminal domain of p56Lck regulates interactions with tyrosine phosphatases in T lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 2393-2401.
- Gervais, F.G., Thornberry, N.A., Ruffolo, S.C., Nicholson, D.W., Roy, S.** (1998) Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 17102-17108.
- Giancotti, F.G.** (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 691-700.
- Gilardi-Hebenstreit, P., Nieto, M.A., Frain, M., Mattei, M.A., Chestier, P., Wilkinson, D.G., Charnay, P.** (1992) An Eph-related receptor protein tyrosine kinase gene segmentally expressed in the developing mouse hindbrain. *Oncogene* **7**: 2499-2506. [Published erratum appears in (1993) *Oncogene* **8**:1103]
- Gingras, D., Béliveau, R.** (1997) L'angiogénèse tumorale: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. *Médecine/Sciences* **13**: 1428-1435.
- Gohji, K., Fujimoto, N., Hara, I., Fujii, A., Gotoh, A., Okada, H., Arakawa, S., Kitazawa, S., Miyake, H., Kamidono, S., Nakajima, M.** (1998) Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *International Journal of Cancer* **79**: 96-101.
- Goldenberg, S.L., Bruchovsky, N., Gleave, M.E., Sullivan, L.D., Akakura, K.**

- (1995) Intermittent androgen suppression in the treatment of prostate cancer: a preliminary report. *Urology* **45**: 839-844.
- Goldman, C.K., Kendall, R.L., Cabrera, G., Soroceanu, L., Heike, Y., Gillespie, G.Y., Siegal, G.P., Mao, X., Bett, A.J., Huckle, W.R., Thomas, K.A., Curiel, D.T.** (1998) Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 8795-8800.
- Gospodarowicz, D., Delgado, D., Vlodavsky, I.** (1980) Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 4094-4098.
- Grammatikakis, N., Lin, J.H., Grammatikakis, A., Tsiichlis, P.N., Cochran, B.H.** (1999) p50^{cdc37} acting in concert with hsp90 is required for Raf-1 function. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 1661-1672.
- Gronberg, H., Xu, J., Smith, J.R., Carpten, J.D., Isaacs, S.D., Freije, D., Bura, G.S., Danber, J.E., Bergh, A., Walsh, P.C.** (1997) Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate carcinoma locus (HPC1) on chromosome 1. *Cancer Research* **57**: 4707-4709. [Published erratum appears in (1998) *Cancer Research* **58**:3191]
- Gross, J.L., Herblin, W.F., Dusak, B.A., Czerniak, P., Diamond, M.D., Sun, T., Eidsvoog, K., Dexter, D.L., Yayon, A.** (1993) Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth in vivo. *Journal of the National Cancer Institute* **85**: 121-131.
- Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M.** (1998) Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *Journal of Cell Biology* **143**: 1375-1383.
- Guerrin, M., Moukadiri, H., Chollet, P., Moro, F., Dutt, K., Malecaze, F., Plouët, J.** (1995) Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *Journal of Cellular Physiology* **164**: 385-394.
- Gumbiner, B.M.** (1995) Signal transduction by β -catenin. *Current Opinion in*

Cell Biology **7**: 634-640.

- Gumbiner, B.M.** (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**: 354-357.
- Gustin, J.A., Maehama, T., Dickson, J.E., Donner, D.B.** (2001) The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activity. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 27740-27744.
- Gutkind, J.S.** (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* **17**: 1331-1342.
- Haenszel, W., Kurihara, M.** (1968) Studies of Japanese migrants I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *Journal of the National Cancer Institute* **40**: 43-68.
- Hafez, M.M., Infante, D., Winawer, S., Friedman, E.** (1990) Transforming growth factor β 1 acts as an autocrine-negative growth regulator in colon enterocytic differentiation but not in goblet cell maturation. *Cell Growth & Differentiation* **1**: 617-626.
- Hägström, S., Wikström, P., Bergh, A., Damber, J.E.** (1998) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in the rat ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration. *Prostate* **36**: 71-79
- Hahn, D., Simak, R., Steiner, G.E., Handisurya, A., Susani, M., Marberger, M.** (2000) Expression of the VEGF-receptor Flt-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Journal of Urology* **164**: 506-510.
- Han, K., Viallet, J., Chevalier, S., Zheng, W., Bazinet, M., Aprikian, A.G.** (1997) Characterization of intracellular calcium mobilization by bombesin-related neuropeptides in PC-3 human prostate cancer cells. *Prostate* **31**: 53-60.
- Hanchette, C.L., Schwartz, G.G.** (1992) Geographic patterns of prostate cancer mortality: Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* **70**: 2861-2869.
- Hanks, S.K., Quinn A.M., Hunter T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.

- Hanks, S.K., Polte, T.R.** (1997) Signaling through focal adhesion kinase. *BioEssays* **19**: 137-145.
- Hanneken, A., Wenbin, Y., Ling, N., Baird, A.** (1994) Identification of soluble forms of the fibroblast growth factor receptor in blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 9170-9174.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., Dedhar, S.** (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β_1 -integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**: 91-96.
- Hao, Q.L., Ferris, D.K., White, G., Heisterkamp, N., Groffen, J.** (1991) Nuclear and cytoplasmic location of the FER tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 1180-1183.
- Harper, M.E., Glynne-Jones, E., Goddard, L., Thurston, V.J., Griffiths, K.** (1996) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostatic tumors and its relationship to neuroendocrine cells. *British Journal of Cancer* **74**: 910-916.
- Hatai, M., Hashi, H., Mogi, A., Soga, H., Yokota, J., Yaoi, Y.** (1994) Stimulation of tyrosine- and serine-phosphorylation of focal adhesion kinase in mouse 3T3 cells by fibronectin and fibroblast growth factor. *FEBS Letters* **350**: 113-116.
- Haugland, R.P.** (1992) Set 25: Fluorescent dyes for assessing vital cell functions. In: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes 172-180.
- Hayashi, T., Umemori, H., Mishina, M., Yamamoto, T.** (1999) The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature* **397**: 72-76.
- Haywood-Reid, P.L., Zipf, D.R., Springer, W.R.** (1997) Quantification of integrin subunits on human prostatic cell lines - comparison of nontumorigenic and tumorigenic lines. *Prostate* **31**: 1-8.
- Heil, M., Clauss, M., Suzuki, K., Buschmann, I.R., Willuweit, A., Fischer, S., Schaper, W.** (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates

- monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *European Journal of Cell Biology* **79**: 850-857.
- Heim, M.H.** (1996) The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus. *European Journal of Clinical Investigation* **26**: 1-12.
- Heim, M.H.** (1999) The Jak-STAT pathway: cytokine signaling from the receptor to the nucleus. *Journal of Receptor & Signal Transduction Research* **19**: 75-120.
- Heldin, C.H., Östman, A., Rönstrand, L.** (1998) Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1378**: F79-F113.
- Hibbs, M.L., Dunn, A.R.** (1997) Molecules in focus: *Lyn*, a *src*-like tyrosine kinase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **29**: 397-400.
- Hirose, T., Fujimoto, W., Tamaai, T., Kim, K.H., Matsuura, H., Jetten, A.M.** (1994) TAK-1: molecular cloning and characterization of a new member of the nuclear receptor superfamily. *Molecular Endocrinology* **8**: 1667-1680.
- Hobish, A., Eder, I.E., Putz, T., Horninger, W., Bartsch, G., Klocker, H., Culig, Z.** (1998) Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Research* **58**: 4640-4645.
- Hofer, D.R., Sherwood, E.R., Bromberg, W.D., Mendlsohn, J., Lee, C., Kozlowski, J.M.** (1991) Autonomous growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha. *Cancer Research* **51**: 2780-2785.
- Holm, C., Gineitis, D., McConville, G.S., Kazlauskas, A.** (1996) Expression of PDGF, VEGF and their receptors in non-small cell lung tumor cell lines. *International Journal of Oncology* **9**: 1077-1086.
- Holmes, T.C., Fadool, D.A., Ren, R., Levitan, I.B.** (1996) Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science* **274**: 2089-2091.
- Hoosein, N.M., Boyd, D.D., Hollas, W.J., Mazar, A., Henkin, J., Chung,**

- L.W.K.** (1991) Involvement of urokinase and its receptor in the invasiveness of human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Communications* **3**: 255-264.
- Hoosein, N.M., Logothetis, C.J., Chung, L.W.K.** (1993) Differential effects of peptide hormones bombesin, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin analog RC-160 on the invasive capacity of human prostatic carcinoma cells. *Journal of Urology* **149**: 1209-1213.
- Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T., Kozai, Y.** (1991) Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Research* **51**: 6180-6184.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., Murphy, G.P.** (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* **43**: 1809-1818.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H., Kemler, R.** (1994) β -Catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor. *Journal of Cell Biology* **127**: 1375-1380.
- Huggins, C., Clark, P.J.** (1940) Quantitative studies on prostatic secretion. II. The effect of castration and of estrogen injection on the normal and on the hyperplastic prostate glands of dogs. *Journal of Experimental Medicine* **72**: 747-761.
- Huggins, C., Hodges, C.V.** (1941) Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research* **1**: 293-297.
- Hulsken, J., Birchmeier, W., Behrens, J.** (1994) E-cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* **127**: 2061-2069.
- Humphrey, P.A., Zhu, X., Zarnegar, R., Swanson, P.E., Ratliff, T.L., Vollmer, R.T., Day, M.L.** (1995) Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostate carcinoma. *American Journal of Pathology* **147**: 386-396.
- Hunter, T.** (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**: 225-236.

- Hunter, T.** (1997) Oncoprotein networks. *Cell* **88**: 333-346.
- Hunter, T., Karin, M.** (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375-387.
- Hunter, T., Poon, R.Y.C.** (1997) Cdc37: a protein kinase chaperone? *Trends in Cell Biology* **7**: 157-161.
- Hynes, R.O.** (1992) Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Illic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T.** (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* **377**: 539-544.
- Illic, D., Almeida, E.A.C., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S., Damsky, C.H.** (1998) Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *Journal of Cell Biology* **143**: 547-560.
- Iizumi, T., Yazaki, T., Shori, K., Kondo, I., Koiso, K.** (1987) Establishment of a new prostatic carcinoma cell line (TSU-Pr1). *Journal of Urology* **137**: 1304-1306.
- Inazawa, J., Sasaki, H., Nagura, K., Kakazu, N., Abe, T., Sasaki, T.** (1996) Precise localization of the human gene encoding cell adhesion kinase beta (CAKbeta/PYK2) to chromosome 8 at p21.1 by fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* **98**: 508-510.
- Isaacs, J.T.** (1996) The R-3327 system of rat prostatic cancers. *Urologic Oncology* **2**: 115-116.
- Isaacs, W.B., Bova, G.S., Morton, R.A., Bussemakers, M.J.G., Brooks, J.D., Ewing, C.M.** (1994) Molecular biology of prostate cancer. *Seminars in Oncology* **21**: 514-521.
- Ischia, R., Hobisch, A., Bauer, R., Weiss, U., Gasser, R.W., Horninger, W., Bartsch, G., Jr., Fuchs, D., Bartsch, G., Winkler, H., Klocker, H., Fischer-Colbrie, R., Culig, Z.** (2000) Elevated levels of serum secretoneurin in patients with therapy resistant carcinoma of the prostate. *Journal of Urology* **163**: 1161-1164.

- Ismail, A., H.R., Landry, F., Aprikian, A.G., Chevalier, S.** (sous presse) Androgen Ablation Promotes Neuroendocrine Cell Differentiation in Dog and Human Prostate. *Prostate*.
- Israeli, R.S., Powell, C.T., Fair, W.R., Heston, W.D.** (1993) Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research* **53**: 227-230.
- Israeli, R.S., Powell, C.T., Corr, J.G., Fair, W.R., Heston W.D.** (1994) Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research* **54**: 1807-1811.
- Iwamura, M., Sluss, P.M., Casamento, J.B., Cockett, A.T.K.** (1993) Insulin-like growth factor I: Action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines. *Prostate* **22**: 243-252.
- Iwamura, M., Wu, G., Abrahamsson, P.A., di Sant'Agnesse, P.A., Cockett, A.T.K., Deftos, L.J.** (1994a) Parathyroid hormone-related protein is expressed by prostatic neuroendocrine cells. *Urology* **43**: 667-674.
- Iwamura, M., Abrahamsson, P.A., Foss, K.A., Wu, G., Cockett, A.T.K., Deftos, L.J.** (1994b) Parathyroid hormone-related protein: A potential autocrine growth regulator in human prostate cancer cell lines. *Urology* **43**: 675-679.
- Jackson, M.W., Bentel, J.M., Tilley, W.D.** (1997) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Journal of Urology* **157**: 2323-2328.
- Jarrard, D.F., Blitz, B.F., Smith, R.C., Patai, B.L., Rukstalis, D.B.** (1994) Effect of epidermal growth factor on prostate cancer cell line PC3 growth and invasion. *Prostate* **24**: 46-53.
- Jarrard, D.F., Hansen, N.M., Patai, B., Rukstalis, D.B.** (1995) Urokinase plasminogen activator is necessary but not sufficient for prostate cancer cell invasion. *Invasion Metastasis* **15**: 34-45.
- Jarrard, D.F., Paul, R., van Bokhoven, A., Nguyen, S.H., Bova, G.S., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Schalken, J., Bussemakers, M., Issacs, W.B.** (1997) P-cadherin is a basal cell-specific epithelial marker that is not expressed in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* **3**: 2121-2128.

- Jenq, W., Cooper, D.R., Ramirez, G.** (1996) Integrin expression on cell adhesion function and up-regulation of p125FAK and paxillin in metastatic renal carcinoma cells. *Connective Tissue Research* **34**: 161-174.
- Jongsma, J., Oomen, M.H., Noordzij, M.A., Romijn, J.C., van Der Kwast, T.H., Schroder, F.H., van Steenbrugge, G.J.** (2000) Androgen-independent growth is regulated by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *Prostate* **42**: 34-44.
- Jung, K., Nowak, L., Lein, M., Priem, F., Schnorr, D., Loening, S.A.** (1997) Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. *International Journal of Cancer* **74**: 220-223.
- Juniewicz, P.E., Berry, S.J., Coffey, D.S., Strandberg, J.D., Ewing, L.L.** (1994) The requirement of the testis in establishing the sensitivity of the canine prostate to develop benign prostatic hyperplasia. *Journal of Urology* **152**: 996-1001.
- Kaighn, M.E., Shankar, N., Ohnuki, Y., Lechner, F., Jones, L.W.** (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology* **17**: 16-23.
- Kamoi, K., Babaian, J.** (1999) Advances in the application of prostate-specific antigen in the detection of early-stage prostate cancer. *Seminars in Oncology* **26**: 140-149.
- Kanner, S.B., Reynolds, A.B., Vines, R.R., Parsons, J.T.** (1990) Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 3328-3332.
- Karin, M.** (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 16483-16486.
- Kassen, A., Sutkowski, D.M., Ahn, H., Sensibar, J.A., Kozlowski, J.M., Lee, C.** (1996) Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *Prostate* **28**: 89-97.
- Kato, J., Takeya, T., Grandori, C., Iba, H., Levy, J.B., Hanafusa, H.** (1986) Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60c-src to a

transforming protein. *Molecular & Cellular Biology* **6**: 4155-4160.

- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., Chambon, P.** (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**: 1491-1494.
- Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J., Parise, L.V.** (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **360**: 632-636.
- Kefalas, P., Brown, T.R., Brickell, P.M.** (1995) Signalling by the p60c-src family of protein-tyrosine kinases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **27**: 551-563.
- Kim, I.Y., Ahn, H.J., Zelner, D.J., Shaw, J.W., Sensibar, J.A., Kim, J.H., Kato, M., Lee, C.** (1996) Genetic change in transforming growth factor β (TGF- β) receptor type I correlates with insensitivity to TGF- β 1 in human prostate cancer cells. *Cancer Research* **56**: 44-48.
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N.** (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* **362**: 841-844.
- Kim, L., Wong, T.W.** (1995) The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 4553-4561.
- Kim, L., Wong, T.W.** (1998) Growth factor-dependent phosphorylation of the actin-binding protein cortactin is mediated by the cytoplasmic tyrosine kinase FER. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 23542-23548.
- Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C., Cooper, J.A., Soriano, P.** (1999) Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO Journal* **18**: 2459-2471.
- Klint, P., Kanda, S., Kloog, Y., Claesson-Welsh, L.** (1999) Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene* **18**: 3354-3364.
- Klocker, H., Culig, Z., Hobisch, A., Hittmair, A., Bartsch, G., Peterziel, H.,**

- Cato, A.C.B.** (1998) Androgen receptor mutations in prostate cancer. In: *Molecular biology of prostate cancer*. M. Wirth, J.E. Altwein, B. Schmitz-Dräger, S. Kuptz éditeurs, 81-88.
- Koegl, M., Zlatkine, P., Ley, S.C., Courtneidge, S.A., Magee, A.I.** (1994) Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochemical Journal* **303**: 749-753.
- Koivisto, P., Visakorpi, T., Rantala, I., Isola, J.** (1997a) Increased cell proliferation activity and decreased cell death are associated with the emergence of hormone-refractory recurrent prostate cancer. *Journal of Pathology* **183**: 51-56.
- Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T., Kallioniemi, O.P.** (1997b) Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Research* **57**: 314-319.
- Kornberg, L.J.** (1998) Focal adhesion kinase expression in oral cancer. *Head & Neck Surgery* **20**: 634-639.
- Koutsilieris, M.** (1993) Osteoblastic metastasis in advanced prostate cancer. *Anticancer Research* **13**: 443-449.
- Krijnen, J.L.M., Janssen, P.J.A., Ruizeveld de Winter, J.A., van Krimpen, H., Shroder, F.H., van der Kwast, T.H.** (1993) Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry* **100**: 393-398.
- Krijnen, J.L., Bogdanawicz, J.F., Seldenrijk, C.A., Mulder, P.G., van der Kwast, T.H.** (1997) The prognostic value of neuroendocrine differentiation in adenocarcinoma of the prostate in relation to progression of disease after endocrine therapy. *Journal of Urology* **158**: 171-174.
- Krum, J.M., Rosenstein, J.M.** (1998) VEGF mRNA and its receptor Flt-1 are expressed in reactive astrocytes following neural grafting and tumor cell implantation in the adult CNS. *Experimental Neurology* **154**: 57-65.
- Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., Alitalo, K.** (1996) VEGF-C receptor binding and pattern of expression with

- VEGF-R3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* **122**: 3829-3837.
- Kumar, C.C.** (1998) Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**: 1365-1373.
- Kuzumaki, T., Matsuda, A., Ito, K., Ishikawa, K.** (1996) Cell adhesion to substratum and activation of tyrosine kinases are essentially required for G1/S phase transition in BALB/c 3T3 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1310**: 185-192.
- Kyprianou, N., Isaacs, J.T.** (1988) Identification of a cellular receptor for transforming growth factor- β in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* **123**: 2124-2131.
- Kyprianou, N., Isaacs, J.T.** (1989) Expression of transforming growth factor- β in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Molecular Endocrinology* **3**: 1515-1522.
- LaCasse, E., Baird, S., Korneluk, R.G., MacKenzie, A.E.** (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**: 3247-3259.
- Lachgar, S., Moukadiri, H., Jonca, F., Charveron, M., Bouhaddioui, N., Gall, Y., Bonafe, J.L., Plouët, J.** (1996) Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for hair dermal papilla cells. *Journal of Investigative Dermatology* **106**: 17-23.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lalani, E.N., Laniado, M.E., Abel, P.D.** (1997) Molecular and cellular biology of prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **16**: 29-66.
- Lamm, M.L.G., Sintich, S.M., Lee, C.** (1998) A proliferative effect of transforming growth factor- β 1 on a human prostate cancer cell line, TSU-Pr1. *Endocrinology* **139**: 787-790.
- Landers, J.P., Spelsberg, T.C.** (1992) New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **2**: 19-63.

- Landry, F., Chapdelaine, A., Bégin, L.R., Chevalier, S.** (1996) Phosphotyrosine antibodies preferentially react with basal epithelial cells in the dog prostate. *Journal of Urology* **155**: 386-390.
- Lang, S.H., Miller, W.R., Duncan, W., Habib, F.K.** (1994) Production and response of human prostate cancer cell lines to granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *International Journal of Cancer* **59**: 235-241.
- Lange, P.H., Vessella, R.L.** (1999) Mechanisms, hypothesis and questions regarding prostate cancer micrometastases to bone. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 331-336.
- Latil, A., Bieche, I., Pesche, S., Valeri, A., Fournier, G., Cussenot, O., Lidereau, R.** (2000) VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *International Journal of Cancer* **89**: 167-171.
- Le Bouffant, F., Capdevielle, J., Guillemot, C., Sladeczek, F.** (1998) Characterization of brain PCTAIRE-1 kinase immunoreactivity and its interaction with p11 and 14-3-3 protein. *European Journal of Biochemistry* **257**: 112-120.
- Le Gall, M., Grall, D., Chambard, J.C., Pouysségur, J., van Obberghen-Schilling, E.** (1998) An anchorage-dependent signal distinct from p42/44 MAP kinase activation is required for cell cycle progression. *Oncogene* **17**: 1271-1277.
- Lebrun, P., Mothe-Satney, I., Delahaye, L., van Obberghen, E., Baron, V.** (1998) Insulin receptor substrate-1 as a signaling molecule for focal adhesion kinase pp125^{FAK} and pp60^{src}. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 32244-32253.
- Lee, J., Wang, Z., Luoh, S.M., Wood, W.I., Scadden, D.T.** (1994) Cloning of *FRK*, a novel human intracellular *src*-like tyrosine kinase encoding gene. *Gene* **138**: 247-251.
- Leevers, S.J., Patersons, H.F., Marshall, C.J.** (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targetting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**: 411-414.

- Lehr, J.E., Pilat, M.J., Pienta, K.J.** (1998) The isolation and characterization of epithelial cells from canine prostate. *Anticancer Research* **18**: 4483-4488.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B., Schlessinger, J.** (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca^{2+} -induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* **376**: 737-745.
- Leventhal, P.S., Shelden, E.A., Kim, B., Feldman, E.L.** (1997) Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth-factor-I-stimulated lamellipodial advance. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 5214-5218.
- Levkau, B., Herren, B., Koyama, H., Ross, R., Raines, E.W.** (1998) Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125^{FAK} and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **187**: 579-586.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R.** (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**: 1943-1947.
- Lilja, H.** (1993) Significance of different molecular forms of serum PSA: The free, noncomplexed form of PSA versus that complexed to α_1 -antichymotrypsin. *Urologic Clinics of North America* **20**: 681-686.
- Lin, M.F., Clinton, G.M.** (1987) Human prostatic acid phosphatase and its phosphotyrosyl-protein phosphatase activity. *Advances in Protein Phosphatases* **4**: 199-228.
- Lin, M.F., Garcia-Arenas, R., Xia, X.Z., Biela, B., Lin, F.F.** (1994) The cellular level of prostatic acid phosphatase and the growth of human prostate carcinoma cells. *Differentiation* **57**: 143-149.
- Liu, Z.Y., Ganju, R.K., Wang, J.F., Schweitzer, K., Weksler, B., Avraham, S., Groopman, J.E.** (1997) Characterization of signal transduction pathways in human bone marrow endothelial cells. *Blood* **90**: 2253-2259.

- Lo, S.H., Weisberg, E., Chen, L.B.** (1994) Tensin: a potential link between the cytoskeleton and signal transduction. *BioEssays* **16**: 817-823.
- Lu, W., Luo, Y., Kan, M., McKeehan, W.L.** (1999) Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 12827-12834.
- Lucia, M.S., Bostwick, D.G., Bosland, M., Cockett, A.T.K., Knapp, D.W., Leav, I., Pollard, M., Rinker-Schaeffer, C., Shirai, T., Watkins, B.A.** (1998) Workgroup 1: Rodent models for prostate cancer. *Prostate* **36**:49-55.
- Lyons, R.M., Gentry, L.E., Purchio, A.F., Moses, H.L.** (1990) Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *Journal of Cell Biology* **110**: 1361-1367.
- Majumdar, A.P.N., Goldenring, J.R.** (1998) Localization and significance of p55, a gastric mucosal membrane protein with tyrosine kinase activity. *American Journal of Physiology* **274**: G863-G870.
- Malarkey, K., Belham, C.M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P.H., Plevin, R.** (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochemical Journal* **309**: 361-375.
- Manes, S., Llorente, M., Lacalle, R.A., Gomez-Mouton, C., Kremer, L., Mira, E., Martinez-A., C.** (1999) The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 6935-6945.
- Markwalder, R., Reubi, J.C.** (1999) Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: Relation to neoplastic transformation. *Cancer Research* **59**: 1152-1159.
- Marshall, C.J.** (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185.
- Martikainen, P., Kyprianou, N., Isaacs, J.T.** (1990) Effect of transforming growth factor- β 1 on proliferation and death of rat prostatic cells. *Endocrinology* **127**: 2963-2968.

- Masai, M., Sumiya, H., Akimoto, S., Yatani, R., Chang, C.S., Liao, S.S., Shimazaki, J.** (1990) Immunohistochemical study of androgen receptor in benign hyperplastic and cancerous human prostates. *Prostate* **17**: 293-300.
- Matsuda, M., Mayer, B.J., Fukui, Y., Hanafusa, H.** (1990) Binding of the transforming protein, p47gag-crk, to a broad range of tyrosine-containing proteins. *Science* **248**: 1537-1539.
- Matuo, Y., Nishi, N., Takasuka, H., Masuda, Y., Nishikawa, K., Isaacs, J.T., Adams, P.S., McKeehan, W.L., Sato, G.H.** (1990) Production and significance of TGF- β in AT-3 metastatic cell line established from the Dunning rat prostatic adenocarcinoma. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **166**: 840-847.
- Matusoka, L.Y., Wortsman, J., Haddad, J.G., Kolm, P., Hollis, B.W.** (1991) Racial pigmentation and the cutaneous synthesis of vitamin D. *Archives of Dermatology* **127**: 536-538.
- McCawley, L.J., Li, S., Wattenberg, E.V., Hudson, L.G.** (1999) Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 4347-4353.
- McDonnell, T.J., Troncoso, P., Brisbay, S.M., Logothetis, C., Chung, L.W.K., Hsieh, J.T., Tu, S.M., Campbell, M.L.** (1992) Expression of the protooncogene *bcl-2* in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research* **52**: 6940-6944.
- McKeehan, W.** (1991) Growth factor receptors and prostate cell growth. *Cancer Surveys* **11**: 165-175.
- McKeehan, W.L., Adams, P.S.** (1988) Heparin-binding growth factor/prostatropin attenuates inhibition of rat prostate tumor epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *In Vitro Cell Developmental Biology* **24**: 243-246.
- Merk, F.B., Warhol, M.J., Kwan, P.W.L., Leav, I., Alroy, J., Ofner, P., Pinkus, G.S.** (1986) Multiple phenotypes of prostatic glandular cells in castrated dogs after individual or combined treatment with androgen and

- estrogen. *Laboratory Investigation* **54**: 442-456.
- Meyer, F., Moore, L., Bairati, I., Fradet, Y.** (1999a) Downward trend in prostate cancer mortality in Quebec and Canada. *Journal of Urology* **161**: 1189-1191.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H.J., Dehio, C.** (1999b) A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO Journal* **18**: 363-374.
- Miller, G.J.** (1999) Vitamin D and prostate cancer: Biologic interactions and clinical potentials. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 353-360.
- Miller, G.J., Stapleton, G.E., Hedlund, T.E., Moffatt, K.A.** (1995) Vitamin D receptor expression, 24-hydroxylase activity, and inhibition of growth by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ in seven human prostatic carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research* **1**: 997-1003.
- Minden, M.D., Pawson, A.J.** (1992) Oncogenes. In: *The Basic Science of Oncology*, I.F. Tannock, R.P. Hill, éditeurs, 61-87.
- Mitchell, P.J., Barker, K.T., Martindale, J.E., Kamalati, T., Lowe, P.N., Page, M.J., Gusterson, B.A., Crompton, M.R.** (1994) Cloning and characterization of cDNAs encoding a novel non-receptor tyrosine kinase, *brk*, expressed in human breast tumours. *Oncogene* **9**: 2383-2390.
- Mitchen, J., Rago, R., Wilding, G.** (1993) Effects of suramin on the proliferation of primary epithelial cell cultures derived from normal, benign hyperplastic and cancerous human prostates. *Prostate* **22**: 75-89.
- Mlinaric-Rascan, I., Yamamoto, T.** (2001) B cell receptor signaling involves physical and functional association of FAK with Lyn and IgM. *FEBS Letters* **498**: 26-31.
- Mori, T., Wanaka, A., Taguchi, A., Matsumoto, K., Tohyama, M.** (1995) Differential expression of the Eph family of receptor tyrosine kinase genes (*sek*, *elk*, *eck*) in the developing nervous system of the mouse. *Brain Research. Molecular Brain Research* **29**: 325-335.

- Morin, G.B.** (1989) The human telomere transferase is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**: 521-529.
- Morrissey, J.H.** (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* **117**: 307-310.
- Moscatelli, D., Quarto, N.** (1989) Transformation of NIH 3T3 cells with basic fibroblast growth factor or the hst/k-fgf oncogene causes downregulation of fibroblast growth factor receptor: Reversal of morphological transformation and restoration of receptor numbers by suramin. *Journal of Cell Biology* **109**: 2519-2527.
- Mossie, K., Jallal, B., Alves, F., Sures, I., Plowman, G.D., Ullrich, A.** (1995) Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* **11**: 2179-2184.
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J.D., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., Rifkin, D.B., Sheppard, D.** (1999) The integrin $\alpha_v\beta_6$ binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**: 319-328.
- Murant, S.J., Handley, J., Stower, M., Reid, N., Cussenot, O., Maitland, N.J.** (1997) Co-ordinated changes in expression of cell adhesion molecules in prostate cancer. *European Journal of Cancer* **33**: 263-271.
- Murphy, G.P., Kenny, G.M., Ragde, H., Wolfert, K.L., Boyton, A.L., Holmes, E.H., Misrock, S.L., Bartsch, G., Klocker, H., Pointner, J., Reissig, I.A., McLead, D.G., Douglas, T., Morgan, T., Gilbaugh, J.Jr.** (1998) Measurement of serum prostate-specific membrane antigen, a new prognostic marker for prostate cancer. *Urology* **51**: 89-97.
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A., Nakagawa, H.** (1990) Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-Src. *Nature* **351**: 69-72.
- Nagakawa, O., Ogasawara, M., Fujii, H., Murakami, K., Murata, J., Fuse, H., Saiki, I.** (1998) Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of

- PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Letters* **133**: 27-33.
- Nagase, H.** (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry* **378**: 151-160.
- Nagata, S.** (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365.
- Nagle, R.B., Knox, J.D., Wolf, C., Bowden, G.T., Cress, A.E.** (1994) Adhesion molecules, extracellular matrix, and proteases in prostate carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* **19**: 232-237.
- Nasu, Y., Timme, T.L., Yang, G., Bangma, C.H., Li, L., Ren, C., Park, S.H., DeLeon, M., Wang, J., Thompson, T.C.** (1998) Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nature Medicine* **4**: 1062-1064.
- Navone, N.M., Logothetis, C.J., von Eschenbach, A.C., Troncoso, P.** (1999) Model systems of prostate cancer: Uses and limitations. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 361-371.
- Neet, K., Hunter, T.** (1995) The nonreceptor protein-tyrosine kinase Csk complexes directly with the GTPase-activating protein-associated p62 protein in cells expressing v-Src or activated c-Src. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 4908-4920.
- Nelson, J.B., Hedican, S.P., George, D.J., Reddi, A.H., Piantadosi, S., Eisenberger, M.A., Simons, J.W.** (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nature Medicine* **1**: 944-949.
- Neter, J., Wasserman, W., Kutner, M.H.** (1990) Applied linear statistical models. In: *Regression, Analysis of variance, and experimental designs*. 3^e édition. Irwin, Boston.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z.** (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal* **13**: 9-22.
- Nguyen, L.T., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1990) Prostatic acid phosphatase in serum of patients with prostatic cancer is a specific phosphotyrosine acid phosphatase. *Clinical Chemistry* **36**: 1450-1455.

- Nguyen, L.T., Durocher, Y., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1992) The major form of protein tyrosine kinase in the dog prostate is expressed by a 50 kDa polypeptide. *FEBS Letters* **296**: 215-218.
- Nguyen, L.T.** (1994) Étude des protéines tyrosine kinases et phosphotyrosine phosphatases dans le contrôle de la croissance des cellules épithéliales prostatiques. *Thèse de doctorat*.
- Nguyen, L.T., Beauregard, G., Tessier, S., Allard, P., Atfi, A., Durocher, Y., Chapdelaine, A., Potier, M., Chevalier, S.** (1996) Radiation inactivation and in situ renaturation of protein tyrosine kinases reveal a major 50-kDa enzyme part of a membrane complex present in dividing but not in resting prostatic epithelial cells. *Biochemistry and Cell Biology* **74**: 75-85.
- Nilsson, S., Reubi, J.C., Kalkner, K.M., Laissue, J.A., Horisberger, U., Olerud, C., Westlin, J.E.** (1995) Metastatic hormone-refractory prostatic adenocarcinoma expresses somatostatin receptors and is visualized *in vivo* by [¹¹¹In]-labeled DTPA-D-[Phe¹]-octreotide scintigraphy. *Cancer Research* **55**: 5805s-5810s.
- Nobes, C.D., Hall, A.** (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62.
- Noordzij, M.A., van Steenbrugge, G.J., van der Kwast, T.H., Schröder, F.H.** (1995) Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urological Research* **22**: 333-341.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N.** (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**: 3237-3245.
- O'Farrell, P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**: 4007-4021.
- Oesterling, J., Fuks, Z., Lee, C.T., Scher, H.I.** (1997) Cancers of the genitourinary system: Cancer of the prostate. In: *Da Vita's Cancer: Principles & Practice of Oncology* 5th edition, Philadelphia: PA, Lippincott-Raven Publishers.

- Okada, M., Nakagawa, H.** (1988) Identification of a novel protein tyrosine kinase that phosphorylates pp60c-src and regulates its activity in neonatal rat brain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **154**: 796-802.
- Okuda, T., Cleveland, J.L., Downing, J.R.** (1992) PCTAIRE-1 and PCTAIRE-3, two members of a novel cdc2/cdc28-related protein kinase gene family. *Oncogene* **7**: 2249-2258.
- Oliver, M.H., Harrison, N.K., Bishop, J.E., Cole, P.J., Laurent, G.J.** (1989) A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *Journal of Cell Science* **92**: 513-518.
- Olivero, S., Bléry, M., Vivier, E.** (1998) Régulation de l'activation cellulaire par les phosphatases. *Médecine/Sciences* **14**: 262-268.
- Otey, C.A.** (1996) pp125^{FAK} in the focal adhesion. *International Review of Cytology* **167**: 161-183.
- Owens, L.V., Xu, L., Craven, R.J., Dent, G.A., Weiner, T.M., Kornberg, L., Liu, E.T., Cance, W.G.** (1995) Overexpression of the focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in invasive human tumors. *Cancer Research* **55**: 2752-2755.
- Ozen, M., Giri, D., Ropiquet, F., Mansukhani, A., Ittmann, M.** (2001) Role of Fibroblast Growth Factor Receptor signaling in prostate cancer cell survival. *Journal of the National Cancer Institute* **93**: 1783-1790.
- Panayotou, G., Waterfield, M.D.** (1993) The assembly of signalling complexes by receptor tyrosine kinase. *BioEssays* **15**: 171-177.
- Papandreou, C.N., Usmani, B., Geng, Y., Bogenrieder, T., Freeman, R., Wilk, S., Finstad, C.L., Reuter, V.E., Powell, C.T., Scheinberg, D., Magill, C., Scher, H.I., Albino, A.P., Nanus, D.M.** (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Medicine* **4**: 50-57.
- Papsidero, L., Wang, M., Valenzuela, L., Murphy, G.P., Chu, T.M.** (1980) A prostate antigen in sera of prostate cancer patients. *Cancer Research* **40**: 2428-2432.

- Park, S.K., Lee, H.S., Lee, S.T.** (1996) Characterization of the human full-length *PTK7* cDNA encoding a receptor tyrosine kinase-like molecule closely related to chick KLG. *Journal of Biochemistry* **119**: 235-239.
- Passantini, A., Isaacs, J.T., Haney, J.A., Adler, S.W., Cujdik, T.J., Long, P.V., Kleinman, H.K.** (1992) Stimulation of human prostatic carcinoma tumor growth in athymic mice and control of migration in culture by extracellular matrix. *International Journal of Cancer* **51**: 318-324.
- Pawson, T.** (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**: 573-580.
- Pedram, A., Razandi, M., Levin, E.R.** (1998) Extracellular signal-regulated protein kinase/jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 26722-26728.
- Peehl, D.M.** (1992) Culture of human prostatic epithelial cells. In: *Culture of Epithelial Cells*. R.I. Freshney éditeur. New York: Wiley-Liss, Inc. 159-180.
- Peehl, D.M., Edgar, M.G., Cramer, S.D., Deftos, L.J.** (1997) Parathyroid hormone-related protein is not an autocrine growth factor for normal prostatic epithelial cells. *Prostate* **31**: 47-52.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Ogg, S., Thoma, R.S., Byrnes, M.J. III, Wu, Z., Stephenson, M.T., Piwnica-Worms, H.** (1998) C-TAK1 protein kinase phosphorylates human *cdc25C* on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth & Differentiation* **9**: 197-208.
- Peng, Z.Y., Cartwright, C.A.** (1995) Regulation of the Src tyrosine kinase and Syp tyrosine phosphatase by their cellular association. *Oncogene* **11**: 1955-1962.
- Perdew, G.H., Wiegand, H., Vanden Heuvel, J.P., Mitchell, C., Singh, S.S.** (1997) A 50 kilodalton protein associated with Raf and pp60^{c-src} protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein *cdc37*. *Biochemistry* **36**: 3600-3607.
- Perks, C.M., Newcomb, P.V., Norman, M.R., Holly, J.M.** (1999) Effect of insulin-like growth factor binding protein-1 on the integrin signalling and the

- induction of apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **22**: 141-150.
- Pettaway, C.A., Pathak, S., Greene, G., Tamirez, E., Wilson, M.R., Killion, J.J., Fidler, IJ.** (1996) Selection of highly metastatic variants of different human prostate carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clinical Cancer Research* **2**: 1627-1636.
- Pircher, R., Julien, P., Lawrence, D.A.** (1986) β -transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **136**: 30-37.
- Pisters, L.L., Troncoso, P., Zhau, H.Y.E., Li, W., von Eschenbach, A.C., Chung, L.W.K.** (1995) C-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *Journal of Urology* **154**: 293-298.
- Plouët, J., Moro, F., Bertagnoli, S., Coldeboeuf, N., Mazarguil, H., Clamens, S., Bayard, F.** (1997) Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 13390-13396.
- Pluda, J.M.** (1997) Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Seminars in Oncology* **24**: 203-218.
- Podor, T.J., Joshua, P., Butcher, M., Seiffert, D., Loskutoff, D., Gauldie, J.** (1992) Accumulation of type 1 plasminogen activator inhibitor and vitronectin at sites of cellular necrosis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **662**: 173-177.
- Pollak, M., Beamer, W., Zhang, J.C.** (1999) Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 383-390.
- Pötter, E., Bergwitz, C., Brabant, G.** (1999) The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocrine Reviews* **20**: 207-239.
- Pouysségur, J., Seuwen, K.** (1992) Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annual Review of Physiology* **54**: 195-210.

- Prochiantz, A., Théodore, L.** (1995) Nuclear/growth factors. *BioEssays* **17**: 39-44.
- Rabbani, S.A., Mazar, A.P., Bernier, S.M., Haq, M., Bolivar, I., Henkin, J., Goltzman, D.** (1992) Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 14151-14156.
- Rago, R., Mitchen, J., Wilding, G.** (1990) DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Analytical Biochemistry* **191**: 31-34.
- Rameh, L.E., Chen, C.S., Cantley, L.C.** (1995) Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* **83**: 821-830.
- Reed, J.C.** (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**: 3225-3236.
- Reiske, H.R., Kao, S.C., Cary, L.A., Guan, J.L., Lai, J.F., Chen, H.C.** (1999) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 12361-12366.
- Reiter, R.E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M.M., Loda, M., White, O.N.** (1998) Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1735-1740.
- Reubi, J.C., Waser, B., Schaer, J.C., Markwalder, R.** (1995) Somatostatin receptors in human prostate and prostate cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **80**: 2806-2814.
- Reubi, J.C., Laderach, U., Waser, B., Gebbers, J.O., Robberecht, P., Laissue, J.A.** (2000) Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Research* **60**: 3105-3112.
- Reyes-Moreno, C., Koutsilieris, M.** (1997) Glucocorticoid receptor function possibly modulates cell-cell interactions in osteoblastic metastases on rat skeleton. *Clinical & Experimental Metastases* **15**: 205-217.

- Rhee, K., Wolgemuth, D.J.** (1995) CDK family genes are expressed not only in dividing but also in terminally differentiated mouse germ cells, suggesting their possible function during both cell division and differentiation. *Developmental Dynamics* **204**: 406-420.
- Richard, C., Liuzzo, J.P., Moscatelli, D.** (1995) Fibroblast growth factor-2 can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighboring cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 24188-24196.
- Richardson, A., Parsons, J.T.** (1996) A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125^{FAK}. *Nature* **380**: 538-540. [published erratum appears in (1996), *Nature* **381**: 810]
- Richardson, A., Malik, R.K., Hildebrand, J.D., Parsons, J.T.** (1997) Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 6906-6914.
- Riegman, P.H., Vliestra, R.J., van der Korput, J., Romijn, J.C., Trapman, J.** (1989) Characterization of the prostate-specific antigen gene: A novel human kallikrein-like gene. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **159**: 95-102.
- Robinson, D., He, F., Pretlow, T., Kung, H.J.** (1996) A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5958-5962.
- Roche, S., Alonso, G., Kazlauskas, A., Dixit, V.M., Courtneidge, S.A., Pandey, A.** (1998) Src-like adaptor protein (Slap) is a negative regulator of mitogenesis. *Current Biology* **8**: 975-978.
- Rodriguez-Fernandez, J.L., Rozengurt, E.** (1996) Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 27895-27901.
- Rodriguez-Fernandez, J.L., Rozengurt, E.** (1998) Bombesin, vasopressin, lysophosphatidic acid, and sphingosylphosphorylcholine induce focal adhesion

- kinase activation in intact Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 19321-19328.
- Roeckl, W., Hecht, D., Sztajer, H., Waltenberger, J., Yayon, A., Weich, H.A.** (1998) Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Experimental Cell Research* **241**: 161-170.
- Rokhlin, O.W., Cohen, M.B.** (1995) Expression of cellular adhesion molecules on human prostate tumor cell lines. *Prostate* **26**: 205-212.
- Romijn, J.C., Verkoelen, C.F., Shroeder, F.H.** (1988) Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. *Prostate* **12**: 99-110.
- Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L., Juliano, R.** (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1242**: 77-98.
- Ross, R.K., Bernstein, L., Judd, H., Hanisch, R., Pike, M., Henderson, B.E.** (1986) Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *Journal of the National Cancer Institute* **76**: 45-48.
- Ross, R.K., Bernstein, L., Lobo, R.A., Shimizu, F.Z., Stanczyk, F.Z., Pike, M.C., Henderson, B.E.** (1992) 5 α -Reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* **339**: 887-889.
- Ross, R.K., Pike, M.C., Coetzee, G.A., Reichardt, J.K., Yu, M.C., Feigelson, H., Stanczyk, F.Z., Kolonel, L.N., Henderson, B.E.** (1998) Androgen metabolism and prostate cancer. *Cancer Research* **58**: 4497-4504.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Huot, J.** (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **15**: 2169-2177.
- Rozengurt, E.** (1995) Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surveys* **24**: 81-96.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., Polakis, P.** (1993) Association of the APC gene product with β -catenin. *Science* **262**: 1731-1734.

- Ruijter, E., van de Kaa, C., Miller, G., Ruiter, D., Debruyne, F., Schalken, J.** (1999) Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocrine Reviews* **20**: 22-45.
- Ruoslahti, E.** (1996) RGD and other sequences for integrins. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* **12**: 697-715.
- Salcini, A.E., Confalonieri, S., Doria, M., Santolini, E., Tassi, E., Minenkova, O., Cesareni, G., Pelicci, P.G., Di Fiore, P.P.** (1997) Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. *Genes & Development* **11**: 2239-2249.
- Sagalowsky, A.I., Wilson, J.D.** (1998) Hyperplasia and carcinoma of the prostate. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th edition, Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, N.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.E., eds. New York, NY: McGraw-Hill.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.
- Sasaki, H., Nagura, K., Ishino, M., Tobioka, H., Kotani, K., Sasaki, T.** (1995) Cloning and characterization of cell adhesion kinase β , a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 21206-21219.
- Saurin, J.C., Némoz-Gaillard, E., Sordat, B., Cuber, J.C., Coy, D.H., Abello, J., Chayvialle, J.A.** (1999) Bombesin stimulates adhesion, spreading, lamellipodia formation, and proliferation in the human colon carcinoma Isrecol cell line. *Cancer Research* **59**: 962-967.
- Saxton, T.M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D.J., Shalaby, F., Feng, G.S., Pawson, T.** (1997) Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase SHP-2. *EMBO Journal* **16**: 2352-2364.
- Scates, D.K., Muir, G.H., Venitt, S., Carmichael, P.L.** (1997) Detection of telomerase activity in human prostate: a diagnostic marker for prostatic cancer? *British Journal of Urology* **80**: 263-268.

- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., Parsons, J.T.** (1992) pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5192-5196.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Parsons, J.T.** (1993) Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125^{FAK}. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 785-791.
- Schaller, M.D., Parsons, J.T.** (1994) Focal adhesion kinase and associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 705-710.
- Schlaepfer, D.D., Hunter, T.** (1996) Signal transduction from the extracellular matrix – A role for the focal adhesion protein –tyrosine kinase FAK. *Cell Structure and Function* **21**: 445-450.
- Schlaepfer, D.D., Broome, M.A., Hunter, T.** (1997) Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 1702-1713.
- Schuermans, A.L.G., Bolt, J., Mulder, E.** (1988) Androgens and transforming growth factor β modulate the growth response to epidermal growth factor in human prostate tumor cells (LNCaP). *Molecular and Cellular Endocrinology* **60**: 101-104.
- Schwartz, G.G., Hulka, B.S.** (1990) Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis) *Anticancer Research* **10**: 1307-1312.
- Seko, Y., Takahashi, N., Tobe, K., Ueki, K., Kadowaki, T., Yazaki, Y.** (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) activates Raf-1, Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase, and S6 kinase (p90^{rsk}) in cultured rat cardiac myocytes. *Journal of Cellular Physiology* **175**: 239-246.
- Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Claffey, K.P., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C.A., Detmar, M.** (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha_v\beta_3$ integrin, osteopontin, and thrombin. *American Journal of Pathology* **149**: 293-305.

- Senger, D.R., Claffey, K.P., Benes, J.E., Perruzzi, C.A., Sergiou, A.P., Detmar, M.** (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: Regulation through $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13612-13617.
- Serfas, M.S., Tyner, A.L.** (1998) Ryk is expressed in a differentiation-specific manner in epithelial tissues and is strongly induced in decidualizing uterine stroma. *Oncogene* **17**: 3435-3444.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C.** (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in *Flk-1*-deficient mice. *Nature* **376**: 62-66.
- Sherwood, E.R., Theyer, G., Steiner, G., Berg, L.A., Kozlowski, J.M., Lee, C.** (1991) Differential expression of specific cytokeratin polypeptides in the basal and luminal epithelia of the human prostate. *Prostate* **18**: 303-314.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G., Yancopoulos, G.D.** (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Molecular Cell* **1**: 25-34.
- Sieg, D.J., Illic, D., Jones, K.C., Damsky, C.H., Hunter, T., Schlaepfer, D.D.** (1998) Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK⁻ cell migration. *EMBO Journal* **17**: 5933-5947.
- Siemeister, G., Martiny-Baron, G., Marmé, D.** (1998) The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: Molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 241-248.
- Silver, D.A., Pellicer, I., Fair, W.R., Heston, W.D., Cordon-Cardo, C.** (1997) Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical Cancer Research* **3**: 81-85.
- Singh, P., Narayan, S., Adiga, R.B.** (1994) Phosphorylation of pp62 and pp54 src-like proteins in a rat intestinal cell line in response to gastrin. *American Journal of Physiology* **267**: G235-G244.

- Sinnett-Smith, J., Zachary, I., Valverde, A.M., Rozengurt, E.** (1993) Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca^{2+} mobilization, and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 14261-14268.
- Siyanova, E.Y., Serfas, M.S., Mazo, I.A., Tyner, A.L.** (1994) Tyrosine kinase gene expression in the mouse small intestine. *Oncogene* **9**: 2053-2057.
- Slack, J.K., Adams, R.B., Rovin, J.D., Bissonette, E.A., Stoker, C.E., Parsons, J.T.** (2001) Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene* **20**: 1152-1163.
- Smart, J.E., Opperman, H., Czernilofsky, A.P., Purchio, A.F., Erikson, R.L., Bioshop, J.M.** (1981) Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming-protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 6013-6017.
- Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D., Grönberg, H., Xu, J., Isaacs, S.D., Brownstein, M.J., Bova, G.S., Guo, H., Bujnovsky, P., Nusskern, D.R., Damber, J.E., Bergh, A., Emanuelsson, M., Kallioniemi, O.P., Walker-Daniels, J., Bailey-Wilson, J.E., Beaty T.H., Meyers, D.A., Walsh, P.C., Collins, F.S., Trent, J.M., Isaacs, W.B.** (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**: 1371-1374.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson B.J., Klenk, D.C.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85.
- Snyder, M.A., Bishop, J.M., Colby, W.W., Levinson, A.D.** (1983) Phosphorylation of tyrosine-416 is not required for the transforming properties and kinase activity of pp60v-Src. *Cell* **32**: 891-901.
- Soker, S., Fidler, H., Neufeld, G., Klagsbrun, M.** (1996) Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that

- bind VEGF₁₆₅ via its exon 7-encoded domain. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 5761-5767.
- Soker, S., Takashimam S., Miaom H.Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M.** (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**: 735-745.
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., Bussolino, F.** (1999) Role of $\alpha_v\beta_3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO Journal* **18**: 882-892.
- Somani, A.K., Bignon, J.S., Mills, G.B., Siminovitch, K.A., Branch, D.R.** (1997) Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 21113-21119.
- Sommerfeld, H.J., Meeker, A.K., Piatysek, M.A., Bova, G.S., Shay, J.W., Coffey, D.S.** (1996) Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Research* **56**: 218-222.
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., Bradley, A.** (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* **64**: 693-702.
- Speirs, V., Atkin, S.L.** (1999) Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumors. *British Journal of Cancer* **80**: 898-903.
- Spencer, D.M., Graef, I., Austin, D.J., Schreiber, S.L., Crabtree, G.R.** (1995) A general strategy for producing conditional alleles of Src-like tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 9805-9809.
- Spiotto, M.T., Chung, T.D.** (2000) STAT3 mediates IL-6-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *Prostate* **42**: 186-195.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., de Crombrughe, B.** (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *Journal of Cell Biology* **105**: 1039-1045.
- Sprenger, C.C., Damon, S.E., Hwa, V., Rosenfeld, R.G., Plymate, S.R.** (1999) Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) is a

- potential tumor suppressor gene for prostate cancer. *Cancer Research* **59**: 2370-2375.
- SPSS** (1997) SPSS 8.0 for Windows. SPSS, Inc. Chicago, Illinois, USA.
- Squire, J., Phillips, R.A.** (1992) Genetic basis of cancer. In: *The Basic Science of Oncology*, I.F. Tannock, R.P. Hill, éditeurs, 41-60.
- Stacker, S.A., Hovens, C.M., Vitali, A., Pritchard, M.A., Baker, E., Sutherland, G.R., Wilks, A.F.** (1993) Molecular cloning and chromosomal localisation of the human homologue of a receptor related to tyrosine kinase (RYK). *Oncogene* **8**: 1347-1356.
- Stanzione, R., Picascia, A., Chieffi, P., Imbimbo, C., Palmieri, A., Mirone, V., Staibano, S., Franco, R., De Rosa, G., Schlessinger, J., Tramontano, D.** (2001) Variations of proline-rich kinase Pyk2 expression correlate with prostate cancer progression. *Laboratory Investigation* **81**: 51-59.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K.** (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**: 170-173.
- Steiner, M.S.** (1995) Review of peptide growth factors in benign prostatic hyperplasia and urological malignancy. *Journal of Urology* **153**: 1085-1096.
- Steiner, M.S., Barrack, E.R.** (1992) Transforming growth factor- β 1 overproduction in prostate cancer: Effects on growth in vivo and in vitro. *Molecular Endocrinology* **6**: 15-25.
- Steiner, M.S., Barrack, E.R.** (1994) Expression of transforming growth factor- β 1 in prostate cancer. *Endocrinology* **135**: 2240-2247.
- Stepanova, L., Yang, G., DeMayo, F., Wheeler, T.M., Finegold, M., Thompson, T.C., Harper, J.W.** (2000) Induction of human Cdc37 in prostate cancer correlates with the ability of targeted Cdc37 expression to promote prostatic hyperplasia. *Oncogene* **19**: 2186-2193.
- Stephenson, R.A., Dinney, C.P., Gohji, K., Ordonez, N.G., Killion, J.J., Fidler, I.J.** (1992) Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* **84**: 951-957.

- Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., Hancock, J.F.** (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* **264**: 1463-1467. [Erratum published in 1994 in *Science* **266**: 1792-1793]
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F.** (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). *International Journal of Cancer* **21**: 274-281.
- Story, M.T.** (1994) Positive and negative modulators of prostate cell proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **48**: 35s-41s.
- Stover, D.R., Liebetanz, J., Lydon, N.B.** (1994) Cdc2-mediated modulation of pp60c-src activity. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 26885-26889.
- Stubbs, A.P., Abel, P.D., Golding, M., Bhangal, G., Wang, Q., Waxman, J., Stamp, G.W., Lalani, E.N.** (1999) Differentially expressed genes in hormone refractory prostate cancer: association with chromosomal regions involved in genetic aberrations. *American Journal of Pathology* **154**: 1335-1343.
- Sudol, M.** (1998) From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the "protein recognition code". *Oncogene* **17**: 1469-1474.
- Sutherland, D.J., Mobbs, B.G.** (1992) Hormones and cancer. In: *The Basic Science of Oncology*. I.F. Tannock, R.P. Hill éditeurs, 207-231.
- Sutkowski, D.M., Kaslanski, R.Z., Sensibar, J.A., Ney, K.G., Lim, D.J., Kozlowski, J.M., Lee, C., Grayhack, J.T.** (1993) Effect of spermatocele fluid on growth of human prostatic cells in culture. *Journal of Andrology* **14**: 233-239.
- Schwartzberg, P.L.** (1998) The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* **17**: 1463-1468.
- Takahashi, H., Furusato, M., Allsbrook, W.C., Nishii, H., Wakmi, S., Barrett, J.C., Boyd, J.** (1995) Prevalence of androgen receptor gene mutations in latent prostatic carcinomas from Japanese men. *Cancer Research* **55**: 1621-1624.
- Tamagnone, L., Partanen, J., Armstrong, E., Lasota, J., Ohgami, K., Tazunoki, T., LaForgia, S., Huebner, K., Alitalo, K.** (1993) The human ryk

- cDNA sequence predicts a protein containing two putative transmembrane segments and a tyrosine kinase catalytic domain. *Oncogene* **8**: 2009-2014.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., Yamada, K.M.** (1998) Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**: 1614-1617.
- Tang, H., Kerins, D.M., Hao, Q., Inagami, T., Vaughan, D.E.** (1998) The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 18268-18272.
- Tapia, J.A., Camello, C., Jensen, R.T., Garcia, L.J.** (1999) EGF stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125^{FAK}) and paxillin in rat pancreatic acini by a phospholipase C-independent process that depends on phosphatidylinositol 3-kinase, the small GTP-binding protein, p21^{rho}, and the integrity of the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta* **1448**: 486-499.
- Tarle, M.** (1999) Serum chromogranin A in monitoring metastatic prostate cancer patients. *Anticancer Research* **19**: 5663-5666.
- Taylor, S.J., Shalloway, D.** (1996) Src and the control of cell division. *BioEssays* **18**: 9-11.
- Tessier, S., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1989a) Effects of vanadate on protein phosphorylation and on acid phosphatase activity in the canine prostate. *Molecular and Cellular Endocrinology* **64**: 87-94.
- Tessier, S., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1989b) Alkali-resistant protein phosphorylation and tyrosine kinase activity of epithelial cell types from normal and metaplastic canine prostates. *Molecular and Cellular Endocrinology* **66**: 59-70.
- Tetu, B., Ro, J.Y., Ayala, A.G., Johnson, D.E., Logothetis, C.J., Ordonez, N.G.** (1987) Small cell carcinoma of the prostate. Part I. A clinicopathologic study of 20 cases. *Cancer* **59**: 1803-1809.

- Theodorescu, D., Broder, S.R., Boyd, J.C., Mills, S.E., Frierson, H.F.Jr.,** (1997) Cathepsin D and chromogranin A as predictors of long term disease specific survival after radical prostatectomy for localized carcinoma of the prostate. *Cancer* **80**: 2109-2119.
- Thomas, J.W., Ellis, B., Boerner, R.J., Knight, W.B., White II, G.C., Schaller, M.D.** (1998) SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 577-583.
- Thompson, T.C.** (1999) Metastasis-related genes in prostate cancer: The role of Caveolin-1. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 439-442.
- Thompson, T.C., Kadmon, D., Timme, T.L., Merz, V.W., Egawa, S., Krebs, T., Scardino, P.T., Park, S.H.** (1991) Experimental oncogene induced prostate cancer. *Cancer Surveys* **11**: 55-71.
- Thompson, T.C., Truong, L.D., Timme, T.L., Kadmon, D., McCune, B.K., Flanders, K.C., Scardino, P.T., Park, S.H.** (1993) Transgenic models for the study of prostate cancer. *Cancer* **71**: 1165-1171.
- Thompson, T.C., Park, S.H., Timme, T.L., Ren, C., Eastham, J.A., Donehower, L.A., Bradley, A., Kadmon, D., Yang, G.** (1995) Loss of p53 function leads to metastasis in ras + myc initiated mouse prostate cancer. *Oncogene* **10**: 869-879.
- Thompson, T.C., Timme, T.L., Li, L., Goltsov, A.** (1999) Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis* **4**: 233-237.
- Tilley, W.D., Buchanan, G., Hickey, T.E., Bentel, J.M.** (1996) Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clinical Cancer Research* **2**: 277-285.
- Toney, T.W., Danzo, B.J.** (1988) Developmental changes in and hormonal regulation of estrogen and androgen receptors present in the rabbit epididymis. *Biology of Reproduction* **39**: 818-828.
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J.A., Shaw, G., Lefkowitz, R.J.** (1994) Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 10217-10220.

- Tremblay, L., Hauck, W., Nguyen, L.T., Allard, P., Landry, F., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1996a) Regulation and activation of focal adhesion kinase and paxillin during the adhesion, proliferation, and differentiation of prostatic epithelial cells in vitro and in vivo. *Molecular Endocrinology* **10**: 1010-1020.
- Tremblay, L., Hauck, W., Aprikian, A.G., Bégin, L.R., Chapdelaine, A., Chevalier, S.** (1996b) Focal adhesion kinase (pp125^{FAK}) expression, activation and association with paxillin and p50^{CSK} in human metastatic prostate carcinoma. *International Journal of Cancer* **68**: 164-171.
- Tsuda, T., Kusui, T., Jensen, R.T.** (1997) Neuromedin B receptor activation causes tyrosine phosphorylation of p125^{FAK} by a phospholipase C independent mechanism which requires p21^{rho} and integrity of the cytoskeleton. *Biochemistry* **36**: 16328-16337.
- Tsurusaki, T., Kanda, S., Sakai, H., Saito, Y., Alitalo, K., Koji, T.** (1999) Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *British Journal of Cancer* **80**: 309-313.
- Turcotte, G., Chapdelaine, A., Roberts, K.D., Chevalier, S.** (1988) Androgen binding as evidenced by a whole cell assay system using cultured canine prostatic epithelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry* **29**: 69-76.
- Udayakumar, T.S., Jeyaraj, D.A., Rajalakshmi, M., Sharma, R.S.** (1999) Culture of prostate epithelial cells from rhesus monkey on extracellular matrix substrate: influence of steroids and insulin-like growth factors. *Journal of Endocrinology* **162**: 443-450.
- Valtola, R., Salven, P., Heikkilä, P., Taipale, J., Joensuu, K., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., deWaal, R., Alitalo, K.** (1999) VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *American Journal of Pathology* **154**: 1381-1390.
- Van Kreiken, J.H.J.** (1993) Prostate marker immunoreactivity in salivary gland neoplasms: A rare pitfall in immunohistochemistry. *American Journal of Surgical Pathology* **17**: 410-414.
- Vasioukhin, V., Serfas, M.S., Siyanova, E.Y., Polonskaia, M., Costigan, V.J.,**

- Thomason, A., Tyner, A.L.** (1995) A novel intracellular epithelial cell tyrosine kinase is expressed in the skin and gastrointestinal tract. *Oncogene* **10**: 349-357.
- Veldsholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.** (1990) A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **173**: 534-540.
- Vigna, E., Naldini, L., Tamagone, L., Longati, P., Bardelli, A., Maina, F., Pnzetto, C., Comoglio, P.M.** (1994) Hepatocyte growth factor and its receptor, the tyrosine kinase encoded by the c-met proto-oncogene. *Cellular and Molecular Biology* **40**: 597-604.
- Vlodavsky, I., Lui, G.M., Gospodarowicz, D.** (1980) Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic. *Cell* **19**: 607-616.
- Vukanovic, J., Hartley-Asp, B., Isaacs, J.T.** (1995) Inhibition of tumor angiogenesis and the therapeutic ability of Linomide against rat prostatic cancers. *Prostate* **26**: 235-246.
- Vuori, K.** (1998) Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *Journal of Membrane Biology* **165**: 191-199.
- Vuori, K., Ruoslahti, E.** (1994) Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science* **266**: 1576-1578.
- Walden, P.D., Lefkowitz, G.K., Ittmann, M., Lepor, H., Monaco, M.E.** (1999) Mitogenic activation of human prostate-derived fibromuscular stromal cells by bradykinin. *British Journal of Pharmacology* **127**: 220-226.
- Wang, G., Thomas, K.A.** (1994) Purification and characterization of a functional soluble fibroblast growth factor receptor 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **203**: 1781-1788.
- Wang, H., Keiser, J.A.** (1998) Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* **83**: 832-840.
- Wang, H.C., Takayama, S., Rapp, U.R., Reed, J.C.** (1996) Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 7063-7068.
- Wang, J.F., Ganju, R.K., Liu, Z.Y., Avraham, H., Avraham, S., Groopman, J.E.** (1997) Signal transduction in human hematopoietic cells by vascular endothelial growth factor related protein, a novel ligand for the Flt-4 receptor. *Blood* **90**: 3507-3515.
- Wang, J.F., Milosveski, V., Schramek, C., Fong, G.H., Becks, G.P., Hill, D.J.** (1998) Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *Journal of Endocrinology* **157**: 5-12.
- Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M.** (1979) Purification of human prostate specific antigen. *Investigative Urology* **17**: 159-163.
- Wang, Y., Heston, W., Corr, J., Fair, W.** (1995) Decreased growth of established human prostate LNCaP tumors in nude mice fed a low-fat diet. *Journal of the National Cancer Institute* **87**: 1427-1431.
- Ware, J.L.** (1993) Growth factors and their receptors as determinants in the proliferation and metastasis of human prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **12**: 287-301.
- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., Giancotti, F.G.** (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**: 625-634.
- Wasilenko, W.J., Cooper, J., Palad, A.J., Somers, K.D., Blackmore, P.F., Rhim, J.S., Wright Jr, G.L., Schellhammer, P.F.** (1997) Calcium signaling in prostate cancer cells: Evidence for multiple receptors and enhanced sensitivity to bombesin/GRP. *Prostate* **30**: 167-173.
- Waters, D.J., Patronek, G.J., Bostwick, D.G., Glickman, L.T.** (1996) Comparing the age at prostate cancer diagnosis in human and dogs. *Journal of the National Cancer Institute* **88**: 1686-1687.
- Waters, D.J., Bostwick, D.G.** (1997a) Prostatic intraepithelial neoplasia occurs spontaneously in the canine prostate. *Journal of Urology* **157**: 713-716.
- Waters, D.J., Bostwick, D.G.** (1997b) The canine prostate is a spontaneous model of intraepithelial neoplasia and prostate cancer progression. *Anticancer Research* **17**: 1467-1470.

- Waters, D.J., Sakr, W.A., Hayden, D.W., Lang, C.M., McKinney, L., Murphy, G.P., Radinsky, R., Ramoner, R., Richardson, R.C., Tindall, D.J.** (1998) Workgroup 4: Spontaneous prostate carcinoma in dogs and nonhuman primates. *Prostate* **36**: 64-67.
- Watts, R.G., Ware, J.L.** (1992) Isolation and characterization of transforming growth factor β response variants from human prostatic tumor cell lines. *Prostate* **21**: 223-237.
- Webber, M.M., Bello, D., Quader, S.** (1997) Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate* **30**: 58-64.
- Wei, Y., Waltz, D.A., Rao, N., Drummond, R.J., Rosenberg, S., Chapman, H.A.** (1994) Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 32380-32388.
- Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D.I., Bodary, S.C., Rosenberg, S., Doyle, M.V., Chapman, H.A.** (1996) Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* **273**:1551-1555.
- Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J.A., Chapman, H.A.** (1999) A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *Journal of Cell Biology* **144**: 1285-1294.
- Weiner, T.M., Liu, E.T., Craven, R.J., Cance, W.G.** (1993) Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* **342**: 1024-1025.
- Weinstein, M.H., Partin, A.W., Veltri, R.W., Epstein, J.I.** (1996) Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer: enhanced prediction of progression after radical prostatectomy. *Human Pathology* **27**: 683-687.
- Weiss, A., Littman, D.R.** (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-274.
- Wernert, N., Seitz, G., Achtsatter, T.** (1987) Immunohistochemical investigation of different cytokeratins and vimentin in the prostate from the fetal period to adulthood and in prostate carcinoma. *Pathology Research and Practice* **182**: 617-626.

- Wiesmüller, L., Wittinhofer, F.** (1994) Signal transduction pathways involving Ras. *Cellular Signalling* **6**: 247-267.
- Wilding, G.** (1991) Response of prostate cancer cells to peptide growth factors: transforming growth factor- β . *Cancer Surveys* **11**: 147-163.
- Wilding, G., Zugmeier, G., Knabbe, C., Flanders, K., Gelmann, E.** (1989) Differential effect of transforming growth factor β on human prostate cancer cells *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology* **62**: 79-87.
- Wilkinson, D.G.** (2000) Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *International Review of Cytology* **196**: 177-244.
- Wilks, A.F.** (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 1603-1607.
- Wilks, A.F.** (1993) Protein tyrosine kinase growth factor receptors and their ligands in development, differentiation, and cancer. *Advances in Cancer Research* **60**: 43-73.
- Witkowski, C.M., Rabinovitch, I., Nagle, R.B., Affinito, K.S.D., Cress, A.E.** (1993) Characterization of integrin subunits, cellular adhesion and tumorigenicity of four human prostate cell lines. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* **119**: 637-644.
- Witte, L., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Pytowski, B., Kotanides, H., Rockwell, P., Böhlen, P.** (1998) Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk-1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**: 155-161.
- Woessner, R.D., Wright, P.S., Loudy, D.E., Wallace, C.D., Montgomery, L.R., Nestok, B.R.** (1998) Microautoradiographic quantitation of vascular endothelial growth factor mRNA levels in human prostate specimens containing normal and neoplastic epithelium. *Experimental and Molecular Pathology* **65**: 37-52.
- Wolf, H.K., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K.** (1991) Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immunohistochemical study. *Hepatology* **14**: 488-494.

- Wood, M., Fudge, K., Mohler, J.L., Frost, A.R., Garcia, F., Wang, M., Stearns, M.E.** (1997) *In situ* hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clinical and Experimental Metastasis* **15**: 246-258.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., Massagué, J.** (1992) TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**: 1003-1014.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Weiser, R., Ventura, F., Massagué, J.** (1994) Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* **370**: 341-347.
- Wu, A.H., Whittemore, A.S., Kolonel, L.N., John, E.M., Gallagher, R.P., West, D.W., Hankin, J., Teh, C.Z., Dreon, D.M., Paffenbarger Jr, R.S.** (1995) Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **4**: 735-741.
- Wu, H.C., Hsieh, J.T., Cleave, M.E., Brown, N.M., Pathak, S., Chung, L.W.K.** (1994) Derivation of androgen independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *International Journal of Cancer* **57**: 406-412.
- Wu, J.T., Erickson, A.J., Tsao, K.C., Wu, T.L., Sun, C.F.** (2000) Elevated serum chromogranin A is detectable in patients with carcinomas at advanced disease stages. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **30**: 175-178.
- Wu, L.Y., Semanya, K.A., Hardy, R.E., Hargreaves, M.K., Robinson, S.B., Pederson, L., Sung, J.F., Haynes, M.A.** (1998) Cancer rate differentials between blacks and whites in three metropolitan areas: A 10-year comparison. *Journal of the Medical Association* **90**: 410-416.
- Xia, K., Mukhopadhyay, N.K., Inhorn, R.C., Brber, D.L., Rose, P.E., Lee, R.S., Narsimhan, R.P., D'Andrea, A.D., Griffin, J.D., Roberts, T.M.** (1996) The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21^{ras}-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 11681-11686.

- Xie, H., Turner, T., Wang, M.H., Singh, R.K., Siegal, G.P., Wells, A.** (1995) *In vitro* invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells is modulated by EGF receptor-mediated signals. *Clinical & Experimental Metastasis* **3**: 407-419.
- Xing, J., Ginty, D.D., Greenberg, M.E.** (1996) Coupling of the Ras-MAPK pathway to gene activation by rsk2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**: 959-963.
- Xiong, W., Parsons, J.T.** (1997) Induction of apoptosis after expression of Pyk2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase. *Journal of Cell Biology* **139**: 529-539.
- Xiong, W., Macklem, M., Parsons, J.T.** (1998) Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein. *Journal of Cell Science* **111**: 1981-1991.
- Xu, L.H., Owens, L.V., Sturge, G.C., Yang, X., Liu, E.T., Craven, R.J., Cance, W.G.** (1996) Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth & Differentiation* **7**: 413-418.
- Xu, L.H., Yang, X., Craven, R.J., Cance, W.G.** (1998a) The COOH-terminal domain of the focal adhesion kinase induces loss of adhesion and cell death in human tumor cells. *Cell Growth & Differentiation* **9**: 999-1005.
- Xu, J., Meyers, D., Freije, D., Isaacs, S., Wiley, K., Musskern, D., Ewing, C., Wilkens, E., Bujnovszky, P., Bova, G.S., Walsh, P., Isaacs, W., et al.** (1998b) Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nature Genetics* **20**: 175-179.
- Xu, Y., Singer, M.A., Lindquist, S.** (1999) Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 109-114.
- Xue, Y., Smedts, F., Verhofstad, A., Debruyne, F., de la Rosette, J., Schalken, J.** (1998) Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate Supplement* **8**: 62-73.

- Xue, Y., van der Laak, J., Smedts, F., Schoots, C., Verhafstad, A., de la Rosette, J., Schalken, J.** (2000) Neuroendocrine cells during human prostate development: does neuroendocrines cell density remain constant during fetal as well as postnatal life? *Prostate* **42**: 116-123.
- Yamada, K.M., Miyamoto, S.** (1995) Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Current Opinion in Cell Biology* **7**: 681-689.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H, Irie, K., Oishi, I., Veno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., Matsumoto, K.** (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**: 2008-2011.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M.P., Myers Jr, M.G., Ishikawa, Y.** (1998) Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 26962-26968.
- Yamanashi, Y., Fukushige, S., Semba, K., Sukegawa, J., Miyajima, N., Matsubara, K., Yamamoto, T., Toyoshima, K.** (1987) The yes-related cellular gene lyn encodes a possible tyrosine kinase similar to p56lck. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 237-243.
- Yamanashi, Y., Mori, S., Yoshida, M.** (1989) Selective expression of a protein-tyrosine kinase, p56lyn, in hematopoietic cells and association with production of human T-cell lymphotropic virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 6538-6542.
- Yan, Z., Winawer, S., Friedman, E.** (1994) Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor β 1 in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 13231-13237.
- Yoshizawa, K., Wilett, W.C., Morris, J.S., Stampfer, N.J., Spiegelman, D., Rimm, E.B., Giovannucci, E.** (1998) Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **90**: 1219-1224.
- Yu, H., Diamandis, E.P., Sutherland, D.J.** (1994a) Immunoreactive prostate specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clinical Biochemistry* **27**: 75-79.

- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W., Schreiber, S.L.** (1994b) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**: 933-945.
- Yu, H., Li, X., Marchetto, G.S., Dy, R., Hunter, D., Calvo, B., Dawson, T.L., Wilm, M., Anderegg, R.J., Graves, L.M., Earp, H.S.** (1996) Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 29993-29998.
- Yule, K.A., White, S.R.** (1999) Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin. *Experimental Lung Research* **25**: 261-273.
- Zachary, I.** (1997) Focal adhesion kinase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **29**: 929-934.
- Zachary, I.** (1998) Vascular endothelial growth factor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **30**: 1169-1174.
- Zachary, I., Sinnott-Smith, J., Turner, C.E., Rozengurt, E.** (1993) Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of focal adhesion-associated protein paxillin in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 22060-22065.
- Zakian, V.A.** (1989) Structure and function of telomeres. *Annual Review of Genetics* **23**: 579-604.
- Zelivianski, S., Verni, M., Moore, C., Kondrikov, D., Taylor, R., Lin, M.** (2001) Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrines-like phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta* **1539**: 28-43.
- Zhao, J.H., Reiske, H., Guan, J.L.** (1998) Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *Journal of Cell Biology* **143**: 1997-2008.
- Zhou, H.Y.E., Pisters, L.L., Hall, M.C., Zhao, L.S., Troncoso, P., Pollack, A., Chung, L.W.K.** (1994) Biomarkers associated with prostate cancer progression. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* **19**: 208-216.
- Zhou, H.Y.E., Chang, S.M., Chen, B.Q., Wang, Y., Zhang, H., Kao, C., Sang,**

- Q.A., Pathak, S.J., Chung, L.W.K.** (1996) Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 15152-15157.
- Zheng, C., Xing, Z., Bian, C., Guo, C., Akbay, A., Warner, L., Guan, J.L.** (1998) Differential regulation of Pyk2 and focal adhesion kinase (FAK). *Journal of Biological Chemistry* **273**: 2384-2389.
- Zheng, D.Q., Woodard, A.S., Fornaro, M., Tallini, G., Languino, L.R.** (1999) Prostatic carcinoma cell migration via $\alpha_v\beta_3$ integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Research* **59**: 1655-1664.
- Zohn, I.M., Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Der, C.J.** (1998) Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* **17**: 1415-1438.