

Université de Montréal

**Rôle de la protéine tyrosine kinase Fer dans  
le cancer de la prostate**

Par  
Amina Zoubeidi

Département de Biochimie  
Faculté de médecine

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

Août, 2003

© Amina Zoubeidi, 2003



w

4

U58

2004

v.037

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

## PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

### **Rôle de la protéine tyrosine kinase Fer dans le cancer de la prostate**

Présentée par :

Amina Zoubeidi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Gerardo Ferbeyre  
Président-rapporteur

Dr Simone Chevalier  
Directrice de recherche

Dr Claude Lazure  
Membre du Jury

Dr Martin Olivier  
Examineur externe

Dr Anne-Marie Masmasson  
Représentant du doyen de la FES

Acceptée, le 12 janvier 2004



## SOMMAIRE

Le cancer de la prostate (CaP) est le cancer le plus fréquent et le second plus meurtrier cancer chez l'homme. Les androgènes sont souvent considérés comme facteurs de risque du CaP. Cependant, leur rôle demeure énigmatique étant donné la récurrence malgré les traitements endocriniens. Ceci suggère l'existence des mécanismes androgéno-indépendants régulant la survie et la croissance des cellules du CaP. Ainsi, plusieurs facteurs de croissance, cytokines, et produits de sécrétion des cellules neuroendocrines jouent un rôle majeur dans le CaP en activant des molécules de signalisation qui induisent la croissance anarchique des cellules du CaP, indépendamment des androgènes.

Notre laboratoire a cloné le gène *fer* codant cette protéine tyrosine kinase dans les cellules prostatiques. Utilisant des outils que nous avons développés, nous démontrons la surexpression de Fer dans le CaP et, notamment, son implication dans la croissance des cellules du CaP. Ainsi, la surexpression d'une construction antisense de *fer* dans les cellules PC3 ne permet pas d'isoler des clones qui n'expriment pas Fer, suggérant un rôle dans la survie. Par ailleurs, le temps de dédoublement de cellules est grandement retardé, passant de 29 à 42 heures, chez les clones exprimant des niveaux fortement abaissés de Fer. De plus, ces clones perdent leur tumorigénicité, car ils sont incapables de former des colonies en agar mou. Aucune perturbation notable des interactions et adhésions cellulaires n'est observée alors que les changements de forme des cellules sont à peine perceptibles. Ces données sont en faveur d'un rôle de Fer dans la survie et la croissance des cellules du CaP.

Par ailleurs, nos études des partenaires de Fer ont révélé que contrairement aux données rapportées dans les fibroblastes, Fer ne s'associe pas à la  $\beta$ -caténine, la cortactine, et p120Cas dans les cellules prostatiques. Conséquemment, Fer requiert d'autres partenaires pour y exercer ses fonctions. Nous démontrons que les protéines gp130, STAT3, le récepteur des androgènes (RA), et Lyn, s'associent constitutivement à Fer dans les cellules de CaP et que les niveaux de complexes sont modulés par l'IL-6, parallèlement à l'activation de Fer. En outre, le RA est phosphorylé sur tyrosine. Nos travaux indiquent que Fer est essentielle à l'activation de STAT3 et pourrait ainsi

agir comme une kinase majeure en amont de ce facteur de transcription. En se basant sur la localisation nucléaire de Fer/STAT3, Fer/RA, et STAT3/RA, et particulièrement la présence de Fer/STAT3 dans la chromatine de même que Fer et STAT3 au niveau de l'ADN, nous proposons que Fer active les facteurs de transcription pour la régulation des gènes dans le noyau. Ces observations ont été validées chez les patients, où nous détectons des niveaux élevés de Fer et STAT3 dans le CaP, et souvent dans le noyau des mêmes cellules. Ceci appuie les données récentes chez les patients montrant que les niveaux sériques d'interleukine-6 sont associés à la progression androgéno-indépendante du CaP, la composante létale de la maladie.

À la recherche d'autres partenaires, nous avons montré que Fer s'associe à l'actine et que sa phosphorylation sur tyrosine dépend de l'activité de Fer. Cette interaction est médiée par le domaine SH2 de Fer et est indépendante de l'activité de Fer et de l'intégrité du cytosquelette. La distribution des complexes est particulièrement intéressante. Alors que le réseau d'actine filamenteuse se retrouve dans le cytoplasme et que Fer est aussi bien observée dans le cytoplasme que le noyau que des cellules du CaP, les complexes Fer/actine sont surtout nucléaires. De plus, la désorganisation du cytosquelette entraîne une translocation accrue des complexes dans le noyau. En outre, Fer et l'actine se trouvent au niveau de la chromatine et de l'ADN. Ces données suggèrent que par son interaction avec l'actine et la translocation des complexes dans le noyau, Fer pourrait être impliquée dans la réponse des cellules aux stress et jouer un rôle dans le remodelage de la chromatine. Nos études montrent que Fer s'associe à Cdc42, une autre protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette.

L'ensemble de ces données, couplées à des études complémentaires récentes du laboratoire, montrent un rôle critique de Fer dans la survie et la croissance des cellules du CaP. En plus de dévoiler un mécanisme putatif permettant de mieux comprendre la progression du CaP, de l'androgéno-dépendance à l'androgéno-indépendance, nos données suggèrent fortement que Fer représente un marqueur du CaP et, potentiellement, une nouvelle cible thérapeutique.

**Mots clés:** Fer, cancer, prostate, androgènes, phosphorylation sur tyrosine, signalisation, cytokines, cytosquelette.

## SUMMARY

Prostate cancer (PCa) ranks first in incidence among cancers and second as a cause of death by cancer in men. Androgens are often considered as risk factors for the development of PCa. However, their role remains enigmatic given the recurrence of the disease despite endocrine therapies. This suggests the existence of androgen-independent mechanisms regulating the survival and growth of prostate cancer cells. Hence, several growth factors, cytokines, and neuroendocrine products play a major role in PCa by activating signaling molecules leading to anarchical growth, independently of androgens.

Our laboratory has cloned the *fer* gene encoding this protein tyrosine kinase in prostatic cells. Using tools that we developed, we demonstrate Fer overexpression in prostate cancer tissues and, notably, the implication of Fer in Pca cell growth. Indeed, the overexpression of an anti-sense *fer* construct in PC3 cells does not allow the recovery of knock out clones, thereby suggesting an important role of Fer in survival. In addition, the doubling time of cells is greatly delayed; increasing from 29 to 42 hours, in clones expressing highly reduced Fer levels. Moreover, these transfectants lose their tumorigenicity since they are unable to form colonies in soft agar. No noticeable modification in cellular interactions and adhesions is observed and changes in cell shape are barely perceptible. These findings support a role for Fer in Pca cell survival and growth.

Meanwhile, our studies on Fer partners revealed that in contrast to findings in fibroblasts, Fer does not associate with  $\beta$ -catenin, cortactin, and p120Cas in prostate cells. Consequently, Fer requires other partners to exert its functions in prostate cells. We demonstrate that the proteins gp130, STAT3, the androgen receptor (AR), and Lyn, constitutively interact with Fer in Pca cells and that levels of complexes are modulated by interleukin-6, in parallel with Fer activation. Furthermore, the AR is phosphorylated on tyrosine. Our data indicate that Fer is essential for STAT3 activation and may therefore act as a major kinase upstream of this transcription factor. Based on the nuclear distribution of Fer/STAT3, Fer/AR, and STAT3/AR, and particularly the presence of Fer/STAT3 in the chromatin together with Fer and STAT3 in the DNA

matrix, we propose that Fer activates transcription factors for the regulation of genes in the nucleus. Our observations are validated in patients, where we detect high Fer and STAT3 levels in tumours, and often in the nucleus of the same subsets of PCa cells. This is in agreement with recent data on circulating interleukin-6 in patients showing that levels correlate with progression of the androgen-independent disease, the lethal component of PCa.

In the search for other Fer partners, we showed that Fer binds actin and that actin phosphorylation on tyrosine depends on Fer activity. The Fer/actin interaction is mediated by the SH2 domain of Fer and is independent of Fer activity and the integrity of the cytoskeleton. The distribution of these complexes in PCa cells is of particular interest. Indeed, while the network of filamentous actin is observed in the cytoplasm and that Fer is distributed in the cytoplasm as well as in the nucleus, Fer/actin complexes are mainly nuclear. Furthermore, perturbations of the actin cytoskeleton lead to an accentuated translocation of complexes in the nucleus. Moreover, Fer and actin reach the chromatin level and are found in the DNA matrix. These data suggest that by its interaction with actin and translocation of complexes in the nucleus, Fer may be implicated in the cell response to stress and participate in the remodeling of the chromatin. Our studies show that Fer forms a complex with Cdc42, another protein implicated in the regulation of the actin cytoskeleton.

Taken together, all of these results, coupled to recent complementary studies of the laboratory, demonstrate a critical role of Fer in survival and growth of PCa cells. Collectively, our findings not only unveil putative mechanisms to better understand progression from the androgen dependence to androgen independence but highly suggest that Fer represents a marker in PCa and, potentially, a novel therapeutic target.

**Key words:** Fer, cancer, prostate, androgens, tyrosine phosphorylation, signaling, cytokines, cytoskeleton.

## TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE .....	iii
SUMMARY .....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	x
I INTRODUCTION .....	1
1 La prostate normale .....	1
1.1 Anatomie, localisation et fonction .....	1
1.2 Histologie.....	3
1.2.1 Zones prostatiques .....	3
1.2.2 Types cellulaires.....	3
2 L'hyperplasie bénigne prostatique.....	7
3 Le cancer de la prostate.....	7
3.1 Facteurs de risque et symptômes.....	8
3.2 Détection précoce et diagnostic.....	9
3.3 Évolution du cancer de la prostate.....	10
3.4 Différents stades et grades du cancer de la prostate.....	10
3.5 Traitement.....	13
4 Les mécanismes moléculaires du cancer de la prostate.....	14
4.1 Rôle des androgènes .....	14
4.2 Gènes supprimeurs de tumeurs.....	15
4.3 Oncogènes.....	17
4.3.1 Facteurs de croissance et récepteurs .....	18
4.3.1.1 Famille du récepteur de l'insuline .....	23
4.3.1.2 Famille du récepteur de l'EGF .....	24
4.3.1.3 Famille du récepteur de l'FGF .....	25
4.3.1.4 Famille du récepteur du VEGF.....	26
4.3.2 Tyrosine kinases cytoplasmiques.....	29
4.3.2.1 Famille Src.....	29
4.3.2.2 Famille Jak.....	32

4.3.2.3	Famille c-abl.....	34
4.3.2.4	Tyrosine kinase Fer.....	35
4.3.2.4.1	Structure de Fer.....	36
4.3.2.4.2	Formes tronquées de Fer.....	38
4.3.2.4.3	Fer dans la signalisation et les fonctions cellulaires .....	39
4.3.2.4.3.1	Régulation du cytosquelette.....	39
4.3.2.4.3.2	Interaction cellule-cellule.....	42
4.3.2.4.3.3	Adhésions focales.....	44
4.3.2.4.3.4	Différenciation.....	44
4.3.2.4.3.5	Prolifération .....	45
4.3.2.4.3.6	Survie .....	46
4.3.2.4.3.7	Inflammation.....	46
4.3.2.4.4	Fer dans la prostate .....	46
5	Hypothèses et objectif.....	47
II	RESULTATS.....	49
1	Manuscrit I : Links Between Fer Tyrosine Kinase Expression Levels and Prostate Cell Proliferation.....	51
2	Manuscrit II : Fer: A Novel Tyrosine Kinase in Interleukin-6 signaling in Advanced Prostate Cancer.....	68
3	Annexe I.....	109
3.1	Récepteur des androgènes: un partenaire de Fer.....	109
3.2	Tyrosine kinase Lyn: un partenaire de Fer.....	115
4	Manuscrit III: F-actin as a Partner and a Substrate of the Fer Tyrosine Kinase in Human Prostate Cancer Cells.....	121
5	Annexe II.....	159
5.1	Cdc42 : un partenaire de Fer.....	159
IV	CONCLUSION.....	181
V	PERSPECTIVES .....	182
VI	REMERCIEMENTS .....	186
VII	REFERENCES .....	187

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Anatomie du système urogénital mâle : Localisation de la prostate humaine
- Figure 2 : Zones de la prostate humaine
- Figure 3 : Schéma de la coupe histologique de la prostate
- Figure 4: Système TNM
- Figure 5 : Classification de Gleason
- Figure 6: Schéma montrant la structure des différentes familles de récepteurs des facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase
- Figure 7 : Schéma résumant l'action de divers facteurs de croissance dans le cancer de la prostate
- Figure 8 : Familles des tyrosine kinases cytoplasmiques
- Figure 9: Modèle d'activation de c-Src
- Figure 10 : Voie de signalisation de Jak/STAT3 régulée par l'IL-6
- Figure 11 : Structure schématique de Fer et de ses formes tronquées
- Figure 12 : Schéma de la position de Fer dans le cytosquelette d'actine
- Figure 13 : Schéma de la position de Fer dans les interactions cellulaires
- Figure 14 : Expression de Fer, STAT3 et RA dans les lignées de cellules prostatiques cancéreuses
- Figure 15: STAT3 est un partenaire du RA
- Figure 16: Le RA est un partenaire de Fer
- Figure 17: Phosphorylation du RA sur tyrosine dans les cellules LNCaP et PC3-RA
- Figure 18: Interaction du domaine SH2 de Src avec Fer dans les cellules PC3
- Figure 19: Fer forme un complexe avec Lyn dans les cellules PC3
- Figure 20: Modulation du complexe Fer/Lyn par l'IL-6
- Figure 21 : Fer interagit avec cdc42 dans les cellules PC3
- Figure 22 : Modèle illustrant les différents partenaires de Fer identifiés dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines
- Figure 23 : Modèle proposé de signalisation de Fer avec STAT3 et RA dans les cellules du CaP indépendantes des androgènes.

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1: Facteurs de croissance dans la prostate normale et cancéreuse

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APS :	Antigène prostatique spécifique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine triphosphate
bFGF:	Facteur de croissance fibroblastique basique
CaP :	Cancer de la prostate
CIP :	Protéine liante de Cdc42 « Cdc42 Interacting Protein »
CHO :	Cellules ovariennes de hamster chinois «Chinese Hamster Ovary »
Chr A:	Chromogranine A
DHT :	Dihydrotestostérone
EGF:	Facteur de croissance épidermique
Fak:	Kinase des adhésions focales
FC :	Facteur de croissance
FCH:	«Fps/Fes/Fer et Cdc42-interacting Protein Homology»
FGF:	Facteur de croissance fibroblastique
GRP :	Facteur de relâche de la gastrine
GST :	Glutathione-S-transférase
HBP :	Hyperplasie bénigne de la prostate
IB :	Immunobuvardage
IGF:	Facteur de croissance insulino-mimétique
IGFBP :	Protéine liante du facteur de croissance insulino-mimétique
IgG :	Immunoglobuline de type G
IL-6 :	Interleukine-6
IL-6R :	Récepteur de l'IL-6
INF $\gamma$ :	Gamma interféron
IP :	Immunoprécipitation
Jak :	Janus kinases
kDa :	kiloDalton
KGf :	Facteur de croissance des kératinocytes



LPS :	Lipopolysaccharides
MAPK :	Protéines kinases actives par les mitogènes
ml:	millilitre
NE	Neuroendocrine
ng :	Nanogramme
PDGF:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K:	Phosphatidylinositol (3)-Kinase
PKA :	Protéine kinase A
PIN :	Néoplasie intraépithéliale prostatique
PTH :	Parathormone
PTP-1B	Phosphotyrosine protéine phosphatase 1B
PTHRP :	Facteur de libération peptidique de la parathormone
pY :	Phosphotyrosine
RA :	Récepteur des androgènes
Rb :	Rétinoblastome
SDS-PAGE:	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium
SH:	Homologie à Src
STAT:	« Signal Transducer and Activator of Transcription»
TGF- $\alpha$	Facteur de croissance transformant alpha
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant bêta
TK:	Tyrosine kinase
TSH:	Hormone stimulante de la thyroïde
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial

*À mes parents*

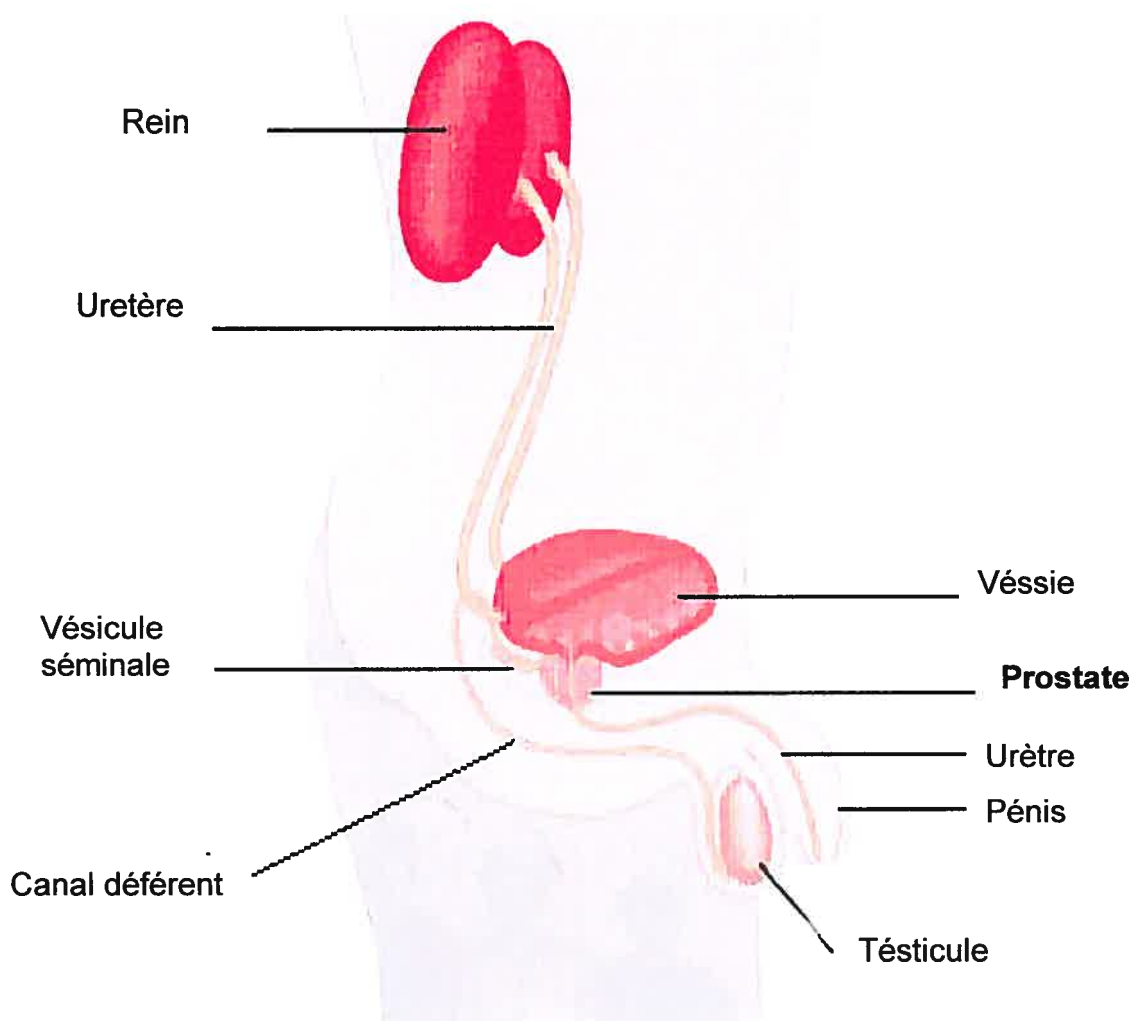
# I INTRODUCTION

## 1 La prostate normale

### 1.1 Anatomie, localisation et fonction

La prostate est une glande exocrine du système urogénital mâle. Elle se trouve dans un carrefour stratégique entre la voie urinaire et la voie génitale, en avant du rectum et sous la vessie (figure 1). Chez l'adulte jeune, la prostate a classiquement la taille et la forme d'une châtaigne, mesurant environ trois à quatre centimètres de long et trois à cinq de large (Tanagho et McAninch, 1992). Les androgènes, en particulier la dihydrotestostérone (DHT), sont essentiels au développement, à la croissance et au fonctionnement de la prostate. La testostérone est convertie en DHT par la 5  $\alpha$ -réductase (Oesterling et *al.*, 1997). Durant l'embryogenèse, la prostate se développe à partir du sinus urogénital mâle sous l'effet des androgènes produits par les testicules fœtaux (Tanagho et McAninch, 1992). Elle continue ensuite son développement pour atteindre le poids de un gramme à la naissance. Ce poids est conservé jusqu'à la puberté, moment où survient une deuxième poussée de la croissance consécutive à la production des androgènes par les testicules. La prostate atteint alors le poids de 20 grammes, qui reste relativement constant jusqu'à la cinquantaine (Berry et *al.*, 1984). Une troisième augmentation du poids peut survenir et cause deux types de pathologies : l'hyperplasie bénigne (HBP) et le cancer de la prostate (CaP).

La prostate participe, avec les vésicules séminales et les testicules, à la production du sperme. Les spermatozoïdes, produits par les testicules, se mélangent avec les sécrétions prostatiques produites par les acini (glandes) et celles des vésicules séminales. À ce niveau, le sperme est mis sous pression entre les deux systèmes musculaires qui ferment l'urètre: un premier localisé au niveau de la sortie de la vessie (sphincter lisse) et le second situé sous la prostate (sphincter strié) (Oesterling et *al.*, 1997). Au moment de l'orgasme, le sphincter strié se relâche et l'éjaculation se produit, propulsant le sperme vers la sortie de l'urètre.



**Figure 1 : Anatomie du système urogénital mâle : Localisation de la prostate humaine.**

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

Tiré de Osterling *et al.* (1997)

## **1.2 Histologie**

### **1.2.1 Zones prostatiques**

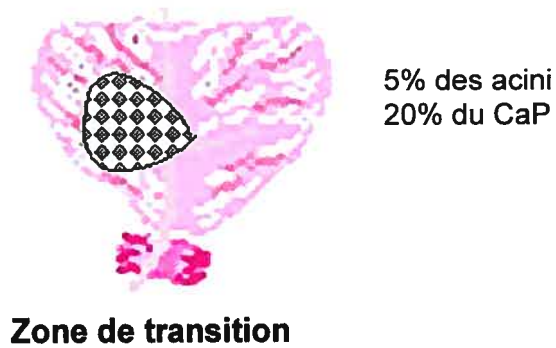
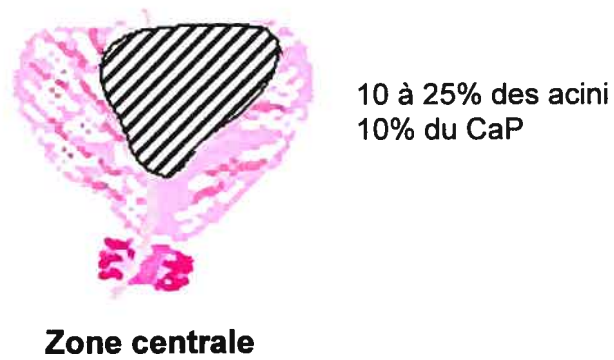
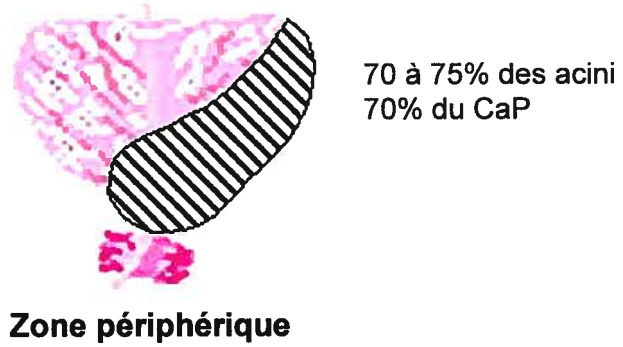
Les études histologiques de la prostate révèlent la présence de trois zones histologiquement et fonctionnellement distinctes (figure 2): la zone périphérique, la zone centrale et la zone de transition et une partie antérieure (Haggman *et al.*, 1997).

- La zone périphérique recouvre la zone centrale par l'arrière, le bas et le côté. Elle est formée de glandes (épithélium) entourées d'un stroma peu dense. C'est dans cette zone, facilement palpable lors du toucher rectal, que se développe le plus souvent le cancer de la prostate (Oesterling *et al.*, 1997).
- La zone centrale entoure les canaux éjaculateurs dans leur trajet à travers les vésicules séminales. Les canaux des glandes de la zone centrale s'ouvrent dans l'urètre de chaque côté des canaux éjaculateurs (Oesterling *et al.*, 1997).
- La zone de transition entoure l'urètre et constitue l'endroit où se développe habituellement l'hyperplasie bénigne. Elle est formée de deux lobes para-urétraux de petite taille, situés à la partie médiane de la prostate. Les tissus de la zone de transition sont identiques à ceux de la zone périphérique, mais ils sont entourés par un stroma plus dense (Oesterling *et al.*, 1997).

Finalement, la partie antérieure, qui occupe environ le tiers de la prostate, est dépourvue d'éléments glandulaires et se compose principalement de muscle lisse.

### **1.2.2 Types cellulaires**

Au niveau morphologique, la prostate est composée principalement d'acini, formant l'épithélium et séparés par le stroma (Ayala *et al.*, 1989). Le stroma est composé de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de tissu conjonctif. On retrouve aussi des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses.

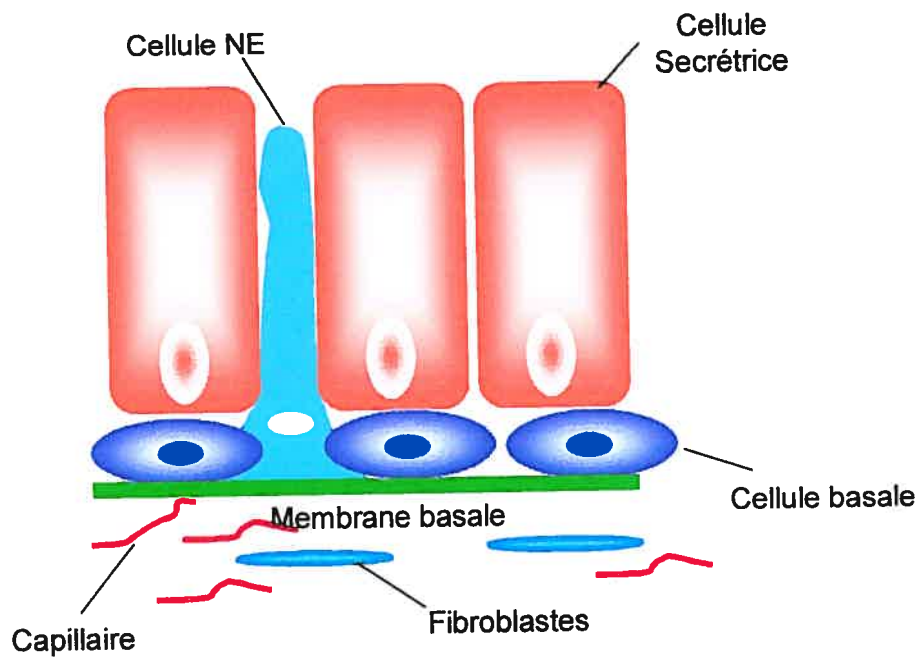


**Figure 2: Zones de la prostate humaine.**

La prostate est divisée en 3 zones distinctes, ainsi qu'un stroma fibromusculaire antérieur (zone antérieure). Tiré de Osterling *et al.* (1997)

L'épithélium est constitué de trois types de cellules: les cellules basales, les cellules sécrétrices et les cellules neuroendocrines (NE) (figure 3).

- Les cellules basales, de forme arrondie, reposent sur la membrane basale. Elles expriment spécifiquement les cytokératines de haut poids moléculaire (Wemert *et al.*, 1987; Sherwood *et al.*, 1991). Ce sont des cellules souches qui se divisent et se différencient en cellules sécrétrices (Chevalier *et al.*, 1981) et NE (Bonkhoff 1996; Xue *et al.*, 1998). Cette fonction est appuyée par la présence de marqueurs spécifiques des cellules sécrétrices et NE dans les cellules souches (Nagle *et al.*, 1994).
- Les cellules sécrétrices, appelées également cellules luminales, ont une forme cylindrique et leurs noyaux sont situés à leur base. Elles expriment des cytokératines de faible poids moléculaire et sécrètent l'antigène prostatique spécifique (APS) dans la lumière des acini. Un rôle des cellules sécrétrices dans le cancer de la prostate (CaP) a été proposé mais celui-ci reste toutefois controversé. En présence de tumeur, les cellules sécrétrices pourraient se dédifférencier en cellules cancéreuses prolifératives (Bonkhoff 1996). Cependant, cette éventualité a été vite rejetée par les mêmes auteurs et une nouvelle hypothèse a été émise selon laquelle, les cellules sécrétrices de la prostate ont un aspect terminal de différenciation ne pouvant mener qu'à la mort cellulaire (Bonkhoff 1998).
- Les cellules neuroendocrines dont le nombre est d'environ une cellule par acinus, sont de forme triangulaire et possèdent des prolongements dendritiques. Elles sont identifiées par l'expression de marqueurs neuroendocriniens tel la chromogranine A (chr A) et leurs produits de sécrétion retrouvés dans des granules situés dans leur région apicale. Les plus fréquents sont l'hormone thyroïdienne (TSH), la sérotonine, le facteur péptidique de libération de la gastrine (GRP), l'énolase spécifiquement neuronale, la calcitonine, la katacalcine, la somatostatine, la parathormone (PTH) et son facteur peptidique (PTHrP) (Aprikian *et al.*, 1993; Noordzij *et al.*, 1995; Noordzij *et al.*, 1995). Les cellules NE sécrètent aussi l'APS (Yao *et al.*, 1994). Elles expriment peu de récepteurs des androgènes (Bonkhoff *et al.*, 1993).



**Figure 3: Schéma de la coupe histologique de la prostate humaine.**  
Représentation des différents types de cellules épithéliales dans les acini de la prostate humaine normale. Adapté de Oesterling *et al.* (1997)



À la naissance, les NE sont présentes dans toutes les régions de la prostate puis elles disparaissent rapidement de la région périphérique pour réapparaître à la puberté (Cohen *et al.*, 1993). Après la puberté, le nombre des NE augmente entre l'âge de 25 à 54 ans (Battaglia *et al.*, 1994). On distingue deux types de cellules NE. Les cellules dites ouvertes (open) qui possèdent des extensions dendritiques s'étendant jusqu'à la lumière des acini (di Sant'Agnese *et al.*, 1985). Les cellules dites fermées (closed) possèdent des extensions dendritiques qui s'intercalent entre les autres cellules, sans atteindre la lumière des acini. Les cellules NE sont présentes dans le tissu prostatique normal et dans les lésions hyperplasiques pré-malignes et malignes (Bonkhoff *et al.*, 1991).

## **2 L'hyperplasie bénigne prostatique**

À partir de 50 ans, la prostate augmente lentement de volume et de masse entraînant ainsi une compression de l'urètre. Ceci peut conduire à une obstruction totale de l'urètre et peut ainsi engendrer des troubles urinaires. Ce phénomène est appelé hyperplasie bénigne de la prostate ou HBP. Ce problème affecte un grand nombre d'hommes à travers le monde. En Amérique du Nord, on estime que 80% des hommes souffrent de cette pathologie au cours de leur vie. L'hyperplasie se développe au niveau de la zone de transition. Le tissu hyperplasique est nodulaire, constitué de proportions variées d'épithélium, de stroma et de muscles lisses (Sagalowsky et Wilson, 1998). L'hyperplasie ne correspond pas à un stade précoce de cancer, bien que dans la majorité des cas, le cancer s'étend aussi dans la partie hyperplasique de la prostate (Kamoi and Babaian 1999).

## **3 Le cancer de la prostate**

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme et représente la deuxième cause de mortalité après les cancers du poumon. Aux États-Unis, durant les cinq dernières années, il y a eu une augmentation de 80% des cas de cancer de la prostate. Ceci s'explique par la détection précoce chez une population vieillissante maintenant plus sensibilisée au CaP. On a également

observé que 30 % des hommes âgés de 60 ans ont des foyers microscopiques cancéreux dans la prostate. Toutefois, ces foyers ne sont pas forcément évolutifs. Le cancer de la prostate est souvent précédé de la néoplasie intraépithéliale (PIN) (Bostwick and Brawer 1987). Le PIN est considéré comme un stade précoce de cancer et se caractérise par un phénotype intermédiaire entre l'épithélium normal et cancéreux. Le PIN est caractérisé par une série de changements cytologiques, tels la perte progressive de la bicouche cellulaire épithéliale avec une disparition d'expression des cytokératines des cellules basales (Foster and Ke 1997).

### **3.1 Facteurs de risque et symptômes**

Il existe plusieurs facteurs de risque responsables du développement du cancer de la prostate :

- L'âge : plus des trois quarts des cancers de la prostate sont diagnostiqués chez des hommes de plus de 65 ans. L'âge est ainsi sans conteste, le principal facteur de risque (Oesterling *et al.*, 1997).
- Les facteurs familiaux: les hommes ayant des parents du premier degré (père ou frères) victimes d'un cancer de la prostate, ont plus de risques d'être eux-mêmes atteints (Ekman *et al.*, 1997). Les études décrivent une augmentation du risque de deux à cinq fois par rapport à un homme sans antécédents familiaux (Ekman *et al.*, 1997). Actuellement, plusieurs équipes travaillent à la recherche des gènes responsables des tumeurs prostatiques héréditaires.
- Les facteurs ethniques: les études effectuées sur la population américaine montrent que l'incidence du cancer de la prostate est plus importante chez les hommes de couleur (Ross *et al.*, 1998). Pourtant, les Africains dans leur pays ont un risque plus faible de cancer. C'est aussi le cas des Asiatiques. Cependant, lorsque ceci émigrent aux Etats-Unis, leur risque de cancer est augmenté (Ross *et al.*, 1992). L'explication pourrait se trouver dans le changement des habitudes alimentaires (nourriture riche en matières grasses), l'exposition à certains polluants environnementaux ou le tabagisme.

- L'alimentation: un régime alimentaire riche en gras pourrait favoriser le développement du cancer de la prostate (Fleshner and Klotz 1998). Les graisses animales seraient les plus délétères.

Les symptômes liés au cancer de la prostate sont les mêmes que ceux observés lors d'une hyperplasie ou une infection bactérienne. Ils se traduisent par : une miction fréquente, difficile ou douloureuse, une incontinence urinaire, une présence de sang ou de pus dans l'urine, une douleur au bas du dos, dans la région du bassin ou dans le haut des cuisses et/ou une éjaculation douloureuse. Il faut cependant souligner que le cancer est généralement asymptomatique dans sa phase initiale.

### **3.2 Détection précoce et diagnostic**

La détection précoce du cancer de la prostate permet maintenant de le traiter lorsqu'il est encore au stade localisé, ce qui augmente les chances de survie. Elle repose sur deux approches combinées qui sont le toucher rectal et le test de l'APS (Kamoi and Babaian 1999). Le toucher rectal permet de palper la prostate afin d'identifier la présence de masses anormales alors que le test de l'APS permet d'évaluer la quantité d'APS sérique.

L'APS est une sérine protéase de la famille des kallikréines produite par les cellules sécrétrices dans la lumière des acini servant à liquéfier le sperme après éjaculation. C'est aussi un marqueur tumoral utilisé pour la détection du cancer de la prostate (Papsidero *et al.*, 1980). En raison de sa présence dans le sang son taux s'exprime généralement en nanogrammes par millilitre (ng/ml). Le résultat de l'APS est habituellement considéré comme normal si le taux est inférieur à 4 ng/ml. Plus le taux d'ASP est élevé, plus le risque de cancer de la prostate est grand (Oesterling *et al.*, 1997). Cependant, un taux élevé d'APS ne signifie pas nécessairement qu'on est en présence d'un CaP. En effet, on peut observer une augmentation de la concentration de l'APS, dans des situations pathologiques bénignes telles que l'HBP et les prostatites, suite à un rapport sexuel, un toucher rectal, une échographie endorectale ou une biopsie de la prostate. Par ailleurs, 25% des hommes souffrant du cancer présentent un taux normal d'APS, ce qui illustre la nécessité de pratiquer le toucher rectal et des biopsies comme tests complémentaires (Kamoi and Babaian 1999). L'APS demeure cependant un élément essentiel au diagnostic.

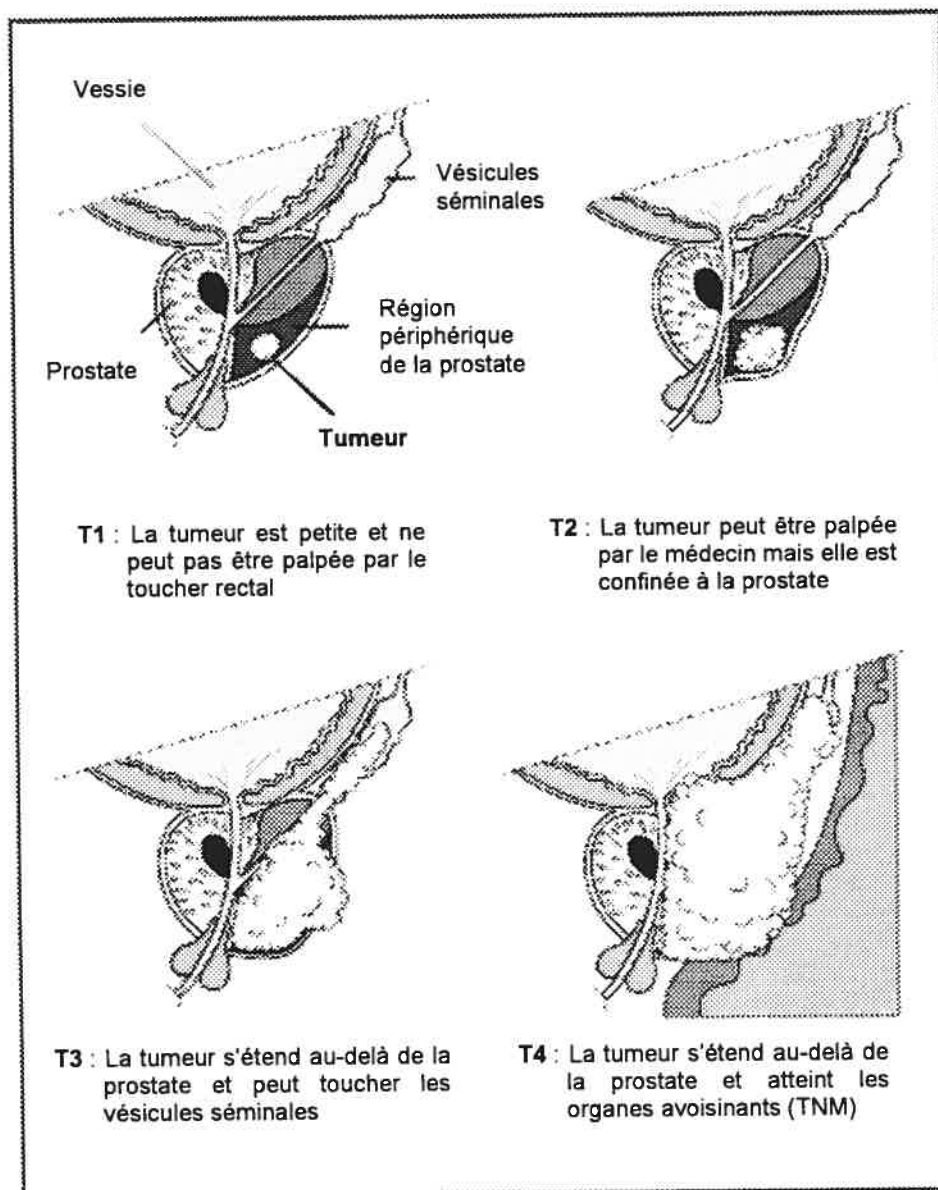
### **3.3 Évolution du cancer de la prostate**

Le cancer de la prostate se développe souvent très lentement et reste localisé au niveau de la capsule qui entoure la prostate. Quand il évolue, il s'étend hors de la capsule prostatique. Les cellules malignes envahissent alors les tissus et les organes avoisinants et peuvent atteindre d'autres organes (os, ganglions...). Dans le cas où les cellules cancéreuses pénètrent dans les vaisseaux lymphatiques, elles sont transportées vers les ganglions où elles continuent à se développer et forment des métastases ganglionnaires (adénopathies). Il est important de noter que les cellules métastatiques demeurent des cellules prostatiques et répondent donc aux traitements conventionnels du CaP. L'évolution du cancer de la prostate passe ensuite chez une majorité des patients par deux différents stades, définis selon la réponse aux traitements (section 3.5) : la phase hormono-dépendante et la phase hormono-indépendante (De Marzo *et al.*, 1998).

### **3.4 Différents stades et grades du cancer de la prostate**

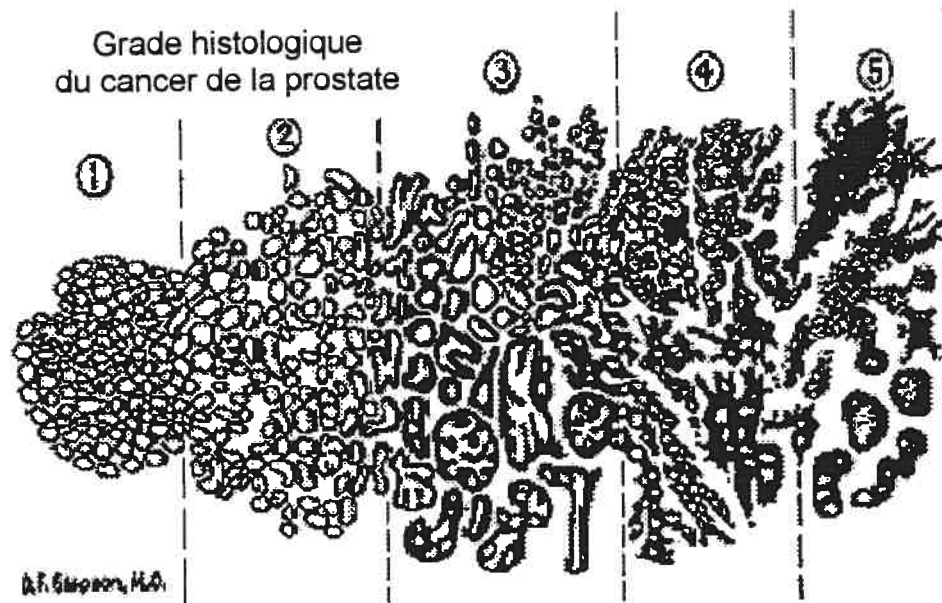
Le "stade" du cancer de la prostate indique le degré d'extension de la tumeur prostatique aux tissus avoisinants et aux autres organes. Le stade de la maladie détermine en grande partie le type de traitement utilisé et permet d'établir le pronostic. Le stade est habituellement défini par le système TNM (figure 4) et le grade par la classification de Gleason (figure 5).

- Le système TNM décrit la tumeur (T) dans la prostate, soit au site primaire, l'absence ou la présence de métastases ganglionnaires (N/nodules lymphatiques) et l'absence ou la présence de métastases (M) à distance.
- La classification Gleason est basée sur l'histologie de la prostate et classifie le CaP en 5 stades. Le premier est un niveau qui ressemble fortement à la prostate normale avec un tissu épithélial bien différencié, alors que le cinquième stade est caractérisé par un tissu indifférencié et l'absence de glande normales (figure 5). Il y a une bonne corrélation entre le grade de la tumeur et la survie des patients. Il a été rapporté que les cancers les moins différenciés sont les plus agressifs et forment souvent des métastases aux ganglions lymphatiques (Walsh *et al.*, 1998).



**Figure 4: Système TNM.**

Tiré de Bostwick et al, (1994)



**Figure 5: Classification de Gleason.**

Tiré de Gleason (1992)

### 3.5 Traitement

À l'heure actuelle, les principaux types de thérapies contre le cancer de la prostate sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Le choix des traitements est conditionné par le stade du cancer et l'état de santé du patient.

Si le cancer est confiné à la glande, le traitement standard est la prostatectomie, c'est à dire l'ablation totale de la prostate. Cependant, suite à cette chirurgie, plus de la moitié des hommes souffrent temporairement d'incontinence et un bon pourcentage d'entre eux manifestent de l'impuissance sexuelle (Sagalowsky 1998). D'autre part, le pourcentage d'échec à ce traitement varie de 15 à 57% sur une période de cinq ans et peut être expliqué par la présence de métastases (Lange and Vessella 1998). La radiothérapie est aussi utilisée pour le cancer localisé. Diverses formes de thérapies sont actuellement à l'étude comme la cryoablation, la chaleur etc. Si le cancer atteint la capsule prostatique, la prostatectomie complétée par la radiothérapie sont préconisées. Dans le cas où le cancer présente des signes d'invasion ou de métastases, le traitement est hormonal et consiste en un blocage complet des androgènes. Cette inhibition peut se faire de différentes façons : l'ablation des testicules, l'inhibition des gonadotropines sécrétées par l'hypophyse qui cause le blocage de la synthèse des androgènes par les testicules, et la neutralisation des effets des androgènes par un antagoniste compétitif de leurs récepteurs (Sagalowsky et Wilson, 1998). De nos jours, l'ablation androgénique ou le blocage des récepteurs correspondants sont utilisés pour retarder la progression du CaP. Généralement, 60% à 80% des patients répondent favorablement à cette thérapie. Cependant, après un certain temps (moins de 3 ans), presque tous les patients rechutent et le CaP hormono-indépendant progresse alors rapidement (Isaacs *et al.*, 1992; Oesterling *et al.*, 1993). Quant à la chimiothérapie, elle est utilisée qu'en dernier lieu et elle est donc considérée comme un traitement palliatif. Son efficacité est faible et l'effet demeure de courte durée. C'est la seule avenue pour les patients (20 à 40%) dont le CaP est déjà hormono-indépendant au diagnostic.

## 4 Les mécanismes moléculaires du cancer de la prostate

Le développement et la progression du cancer de la prostate de l'hormono-dépendance à l'hormono-indépendance suscitent beaucoup d'intérêt et restent mal compris. Plusieurs hypothèses ont été avancées. Parmi les plus étudiées, énumérons celles du rôle des androgènes, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et la surexpression ou la modulation des oncogènes, qu'il s'agisse de facteurs de croissance (FC), de leurs récepteurs et de molécules des voies de signalisation qui contrôlent la croissance cellulaire.

### 4.1 Rôle des androgènes

Les problèmes reliés au CaP sont plus fréquents après l'âge de 50 ans (Oesterling *et al.*, 1997). Bien que ce facteur de risque soit bien identifié, le rôle des androgènes demeure énigmatique. En effet, certaines études démontrent que, l'incidence du CaP en fonction de l'âge coïncide avec une faible diminution du taux d'androgènes et une réduction concomitante de la fonction des cellules sécrétrices (Vermeulen *et al.*, 1989). Cependant, d'autres travaux révèlent que la concentration d'androgènes est associée à un risque plus élevé de développement du CaP (Zhang *et al.*, 2002). Des études cliniques récentes relient les faibles taux des androgènes au stade avancé du CaP et à la diminution de la survie des patients (Hoffman *et al.*, 2000; Thompson 2002), suggérant que la baisse de la concentration des androgènes puisse être déterminante pour le CaP. Ceci est appuyé par des résultats récents sur la prévention du CaP par l'administration d'un inhibiteur de la synthèse de la DHT, le finasteride (Thompson *et al.*, 2003).

Paradoxalement, les thérapies hormonales s'avèrent bénéfiques chez une majorité de patients mais la plupart récidivent et le CaP est alors androgéno-indépendant. Après une ablation des androgènes, les cellules cancéreuses dépendantes des androgènes meurent par apoptose, facilitant de ce fait la sélection des cellules transformées androgéno-indépendantes basales et des NE (Bui and Reiter 1998) et l'adaptation des cellules survivantes encore sensibles aux androgènes (Gleave *et al.*, 1998). D'autres chercheurs suggèrent que ce sont plutôt les cellules sécrétrices différenciées qui sont responsables de la progression hormono-indépendante du CaP (De Marzo *et al.*, 1998). Benkhoff, quant à lui



propose que les cellules cancéreuses sont en fait de type intermédiaire (Bonkhoff 1998). Cette hypothèse est appuyée par d'autres groupes d'investigateurs qui ont montré que les cellules cancéreuses possèdent les caractéristiques propres aux cellules basales et aux cellules sécrétrices, suggérant que ces cellules sont responsables de la progression du CaP au stade hormono-indépendant. (Chevalier *et al.*, 1996; Foster and Ke 1997; Bui and Reiter 1998)

Une autre hypothèse est l'activation du récepteur des androgènes qui est le facteur de transcription majeur de l'action des androgènes dans la prostate (Culig *et al.*, 2002). Des thérapies endocriniennes ont été développées pour inhiber l'activation du RA et ainsi contrer ce cancer (Culig *et al.*, 1999). Cependant, même en l'absence des androgènes, le RA peut être activé par des facteurs autres que les stéroïdes tels que les facteurs de croissance, les cytokines et les activateurs de la protéine kinase A (PKA) (Culig *et al.*, 1994; Nazareth and Weigel 1996; Craft *et al.*, 1999). Ces mécanismes alternatifs pourraient en partie expliquer le développement du cancer de la prostate androgéno-indépendant.

## **4.2 Gènes suppresseurs de tumeurs**

Les gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines qui régulent négativement la croissance cellulaire en agissant au niveau du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la réparation de l'ADN ou de l'adhésion cellulaire. L'inactivation de tels gènes ou la diminution de leur expression mènent à une croissance incontrôlée des cellules, résultant de l'altération de ces mécanismes et fonctions cellulaires.

**Rétinoblastome (Rb):** le gène *Rb* a été initialement identifié chez les enfants atteints d'un rétinoblastome. Il fut le premier gène suppresseur de tumeur identifié. Il est localisé sur le chromosome 13q. La perte de la fonction de la protéine Rb par mutation du gène mène à une croissance incontrôlée due à son incapacité de se lier au facteur de transcription E2F et à le séquestrer pour agir au niveau des cyclines et leurs inhibiteurs qui contrôlent le cycle cellulaire. Les formes inactives de la protéine Rb se retrouvent chez la majorité des cellules épithéliales humaines néoplasiques (Gao and Honn 1995; Gao *et al.*, 1999). Des études ont montré la présence des mutations du gène *Rb* dans une population de cellules cancéreuses prostatiques humaines, supportant l'hypothèse que ces mutations puissent être une étape importante dans la genèse de ce cancer (Singh *et al.*, 1999). Ainsi, la surexpression

de la forme sauvage inhiberait la tumorigénicité dans différentes lignées cellulaires de la prostate humaine exprimant les formes mutées. De plus, la perte d'hétérozygotie du gène est observée chez 60% des cas du cancer de la prostate. On constate que la perte de l'expression de Rb est proportionnelle au stade du cancer (Kwabi-Addo *et al.*, 2001).

**p53:** le gène p53 est le plus fréquemment muté dans les tumeurs humaines (Stackhouse *et al.*, 1999; Sasor *et al.*, 2000; Takayama *et al.*, 2000). En présence de dommages causés à l'ADN, il joue un rôle important dans la régulation de l'entrée et la progression du cycle cellulaire. Aux États Unis, approximativement 16% des nouveaux cas de cancer de la prostate montrent une expression anormale du p53 (Tamboli *et al.*, 1998). La perte de la fonction du p53 est facilement identifiable par immunohistochimie. Malgré une faible corrélation entre le stade de la tumeur, son grade et l'expression du gène muté de p53, il a été suggéré que l'inactivation de p53 soit néanmoins un des événements importants durant la phase d'initiation de la plupart des cancers de la prostate (Stackhouse *et al.*, 1999; Sasor *et al.*, 2000). D'autre part, la mutation du gène p53 a aussi été associée à un pronostic défavorable de la maladie (Shurbaji *et al.*, 1995)

**KAI1:** le gène KAI1, conservé au cours de l'évolution, été le premier gène suppresseur de tumeur associé au CaP héréditaire (Maraj *et al.*, 2000). Ce gène est localisé sur le chromosome 11p11 et s'exprime dans plusieurs tissus humains (Kwabi-Addo *et al.*, 2001). Il code pour une glycoprotéine de surface qui fait partie d'une famille de protéines possédant 4 domaines transmembranaires et un large domaine extracellulaire glycosylé en N-terminal. Leurs fonctions demeurent inconnues mais la localisation membranaire et la glycosylation de ces protéines suggèrent des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice ainsi que dans la formation et l'invasion des métastases (Hu *et al.*, 2000). La glycosylation de ces protéines va de pair avec leur présumé rôle dans la suppression des métastases (Hu *et al.*, 2000). Dans la prostate, le KAI1 est peu ou pas exprimé dans 90% des métastases prostatiques examinées (Dong *et al.*, 1996).

**PTEN:** le gène PTEN est localisé sur le chromosome 10q23, une région souvent délestée dans le cancer de la prostate. Ce gène code pour une phosphatase lipidique, qui diminue la sensibilité des cellules à la mort cellulaire et empêche

l'invasion et la prolifération des cellules tumorales. Les souris dépourvues de PTEN (Knock-out) développent une hypertrophie de la prostate et une dysplasie (Li *et al.*, 2001). Dans les fibroblastes, la surexpression de PTEN inhibe la migration des cellules, alors que son absence générée par des ARN messagers (ARNm) antisens favorise cette migration. Les mutations du PTEN sont fréquentes dans le cancer de la prostate (Hu *et al.*, 2000).

**p27:** le gène p27 est localisé sur le chromosome 12p12 et code pour un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes qui bloque la progression du cycle cellulaire au point de transition de la phase G1-S. La diminution de l'expression du gène p27 est considérée comme une étape importante du phénotype malin. Alors que c'est un facteur indépendant du pronostic des cancers du sein et du colon, sa baisse corrèle avec l'augmentation des métastases du CaP (Fero *et al.*, 1996).

### **4.3 Oncogènes**

Les oncogènes ont été classiquement définis comme étant des gènes à caractère dominant qui, lorsque exprimés de façon dérégulée ou lorsque leur structure est altérée par surexpression, translocation chromosomique, mutation et activation constitutive, contribuent au phénotype transformé d'une cellule. Les oncogènes codent pour des protéines de fonctions diverses. Ils peuvent être des facteurs de transcription, des activateurs ou des répresseurs transcriptionnels, mais aussi des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. D'autres oncogènes jouent un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire comme les récepteurs des facteurs de croissance, les effecteurs intracellulaires de la transmission du signal, telles les protéines de la famille Ras et les tyrosine kinases (TKs).

Parmi les oncogènes découverts à ce jour, nombre d'entre eux interviennent dans l'une des grandes voies de signalisation. Les premiers travaux effectués sur les rétrovirus transformants montrent que ces derniers avaient incorporé des gènes cellulaires. En effet, la découverte des formes mutées de gènes cellulaires chez ces virus a permis d'établir le concept de la conversion du pro-oncogène en oncogène (Martin, 2001). Les cellules cancéreuses présentent donc des mutations de gènes critiques favorisant un état permissif quant à leur croissance. Ainsi, de telles mutations peuvent conduire à des boucles autocrines qui permettent aux cellules

cancéreuses de produire les facteurs de croissance dont elles ont besoin ou à la suppression du domaine extracellulaire régulateur d'un récepteur, qui se comporte comme s'il était stimulé en permanence. Dans les deux cas, la cellule devient indépendante d'une intervention externe. De même, une mutation dans une protéine telle que Ras qui sert de commutateur bipolaire associé à divers récepteurs membranaires, va la bloquer dans sa conformation active et aura pour conséquence une stimulation constitutive de la voie de signalisation efférente (Blanchard 2003). C'est aussi le cas de nombreuses TKs constitutivement activées dans les cellules cancéreuses (Blanchard 2003).

Plus d'une trentaine de TKs codées par des oncogènes sont impliquées dans le cancer et joueraient des rôles complémentaires. Le premier, le plus étudié, est l'activation des différentes voies de signalisation qui permettent aux cellules de fonctionner de manière indépendante. L'activation des produits d'oncogènes permet aux cellules de proliférer en l'absence des facteurs de croissance, les protègent de l'apoptose et permet l'invasion et la formation des métastases. Le deuxième rôle est la résistance des tumeurs à la chimiothérapie et à la radiothérapie, ce qui représente une des causes majeures de l'échec des traitements anti-tumoraux. Notons qu'à ce jour les mécanismes intrinsèques par lesquels les produits d'oncogènes tyrosines kinases protègent les cellules contre les thérapies cytotoxiques demeurent inconnus. Considérant la complexité des cascades de transduction des signaux à l'intérieur d'une cellule, avec les nombreuses connexions entre les différentes voies, il est clair que la dérégulation de l'activation des TKs peut entraîner de graves conséquences sur les réponses biologiques finales.

#### **4.3.1 Facteurs de croissance et récepteurs**

Les FCs et leurs récepteurs représentent des molécules multifonctionnelles jouant un rôle fondamental dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'adhésion et la motilité cellulaire (Thiery and Chopin 1999). Selon le type cellulaire, ils peuvent jouer le rôle d'activateurs ou d'inhibiteurs de la prolifération. Un des exemples les plus frappant est celui du TGF $\beta$  qui se comporte à la fois comme un agent chimiotactique pour les macrophages, activateur de la prolifération des cellules mésenchymateuses et inhibiteur de la prolifération des cellules épithéliales. Il n'est donc pas étonnant de constater que les FCs et leurs récepteurs agissent comme des modulateurs positifs ou négatifs dans la progression tumorale. Citons le

rôle oncogénique joué par le récepteur de l'EGF (EGFR) dans de nombreux cancers (Blume-Jensen and Hunter 2001) et le rôle suppresseur de tumeurs du récepteur du TGF $\beta$  dans les cancers colorectaux avec instabilité des microsatellites (Markowitz *et al.*, 1995). Un même récepteur peut également agir comme inhibiteur ou activateur selon le type cellulaire. Ainsi, le récepteur des FGF de type 2 est un inhibiteur de la progression tumorale dans les cancers de la vessie (Joensuu *et al.*, 2001) ou dans un modèle murin de CaP (Matsubara *et al.*, 1998), alors que ce même récepteur joue un rôle oncogénique dans les cancers gastriques (Hattori and Sugihara 1996). De la même manière, le récepteur des FGF de type 3 est un oncogène dans les cancers de la vessie (Cappellen *et al.*, 1999) mais aussi un inhibiteur de la croissance des os longs (Robertson *et al.*, 2000). Les FCs et leurs récepteurs suscitent actuellement un vif intérêt dans le domaine de l'oncologie. En effet, un succès spectaculaire vient d'être rapporté concernant les tumeurs gastro-intestinales où un inhibiteur du récepteur c-kit, une TK constitutivement activée, a été utilisé efficacement en clinique (Joensuu *et al.*, 2001). Les résultats prometteurs obtenus avec ce produit ouvre la voie à de nombreux autres inhibiteurs de TKs pour une application éventuelle dans le traitement du cancer.

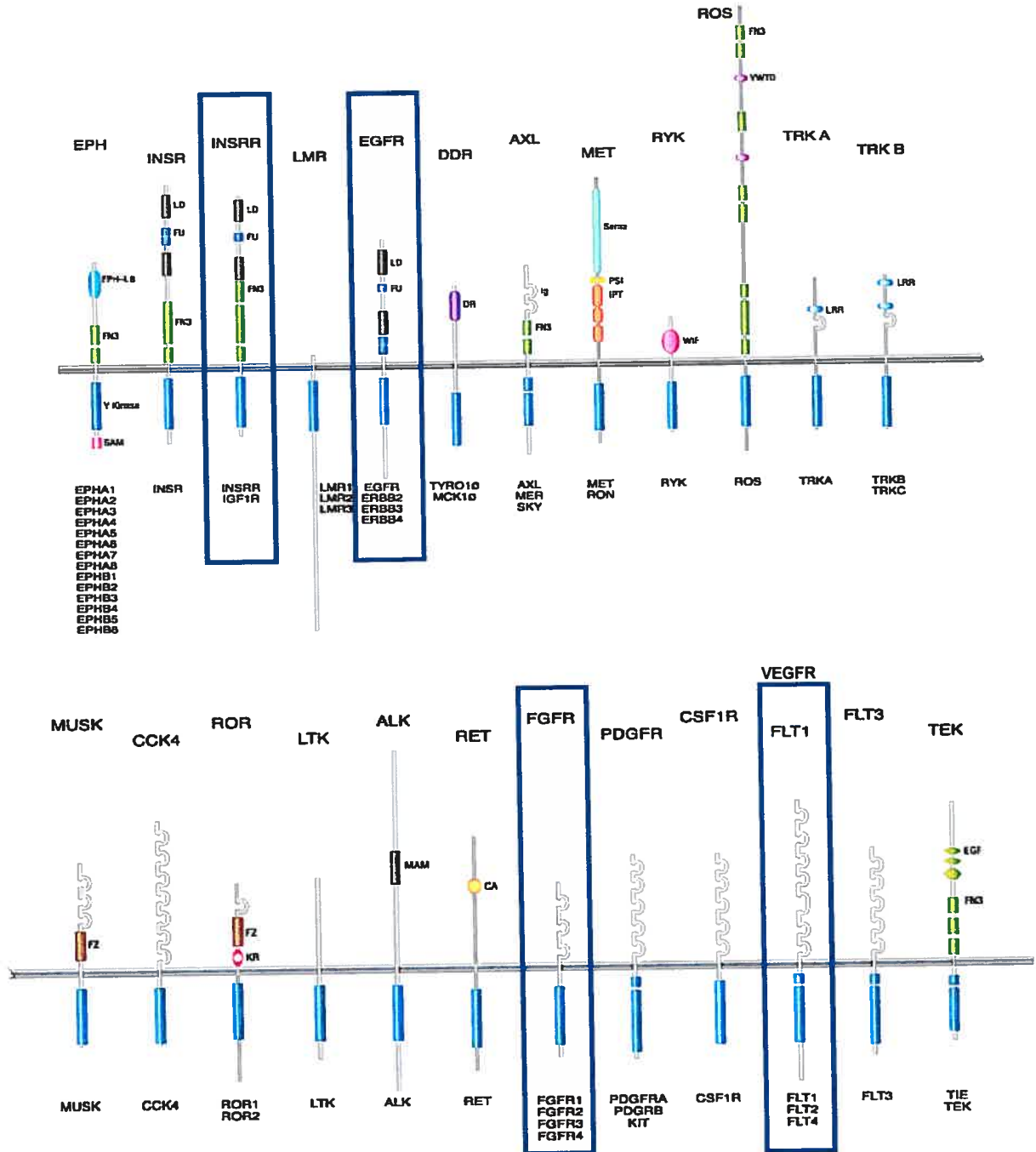
De manière générale, les récepteurs membranaires des FCs constituent un groupe de molécules capables de recevoir des signaux extérieurs pour les transmettre à l'intérieur de la cellule et induire ainsi des messagers capables d'activer des voies de signalisation intracellulaire. La transmission du message passe par l'activation et la phosphorylation du récepteur sur ses résidus tyrosine (RTK). Leurs gènes sont fréquemment dérégulés dans le cancer, soit par des mutations ponctuelles activatrices, soit par des translocations chromosomiques. À l'heure actuelle, il existe environ 58 récepteurs à activité TK. Selon leur organisation structurale, ces récepteurs se regroupent en 20 familles (Blume-Jensen and Hunter 2001).

Les RTKs se caractérisent par une région extracellulaire reliée par une région transmembranaire unique, suivie d'une partie intra-cytoplasmique douée d'une activité enzymatique de phosphorylation sur des résidus tyrosine (figure 6).

La partie **extracellulaire** comprend des domaines permettant au récepteur de se dimériser (domaines de type immunoglobuline et fibronectine, domaines riches en

cystéine et en leucine) et des sites de liaison du facteur de croissance. Le domaine **transmembranaire** est caractérisé par une séquence hydrophobe dont la fonction est l'ancrage du récepteur à la membrane. Le domaine transmembranaire est sans influence sur les capacités de signalisation des RTKs (Ullrich and Schlessinger 1990). Le domaine **intra-cytoplasmique tyrosine kinase** est le plus conservé parmi les RTKs. Il est formé de deux parties: une partie N-terminale capable de fixer l'ATP, complexée aux ions  $Mn^{++}$  ou  $Mg^{++}$ , et une partie C-terminale douée d'une activité phosphotransférase (Ullrich and Schlessinger 1990). L'activité kinasique, résultant de l'autophosphorylation sur les résidus tyrosine, est cruciale pour l'activation des voies de transduction et pour l'induction des réponses cellulaires, telles la survie, la prolifération et la différenciation (Hubbard and Till 2000).

Le mécanisme d'activation est conservé entre les différents RTKs. Les kinases possèdent une séquence appelée "boucle d'activation" dont le positionnement par rapport au site de fixation de l'ATP conditionne l'activité TK du récepteur. La boucle d'activation doit être phosphorylée pour que la kinase soit active. Dans la conformation dite «ouverte», il y a fixation de l'ATP et transphosphorylation de la protéine. Dans la conformation dite «fermée», la boucle masque le site de liaison de l'ATP, réduisant ainsi l'activité catalytique du récepteur. Ce mécanisme d'auto-inhibition, commun à de nombreuses kinases (Hubbard *et al.*, 1998), est fréquemment perturbé dans le cancer. La répression normale des domaines catalytiques est alors inhibée formant des protéines constitutivement actives. En tenant compte de la complexité des cascades de transduction à l'intérieur d'une cellule avec les nombreuses connexions entre les différentes voies, il est évident que la dérégulation de l'activation d'un RTK peut avoir de graves conséquences sur les réponses biologiques finales. Le tableau I illustre certains des FC dont l'action est associée au CaP.



**Figure 6 : Schéma montrant la structure des différentes familles de récepteurs des facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase.**

Adapté de Blume-Jensen and Hunter (2001)

Les RTKs entourées d'un cadre représentent celles qui sont présentées ci-après.

**Tableau I: Facteurs de croissance dans la prostate normale et cancéreuse**

<i>Facteur de croissance</i>	<i>Origine cellulaire</i>	<i>Sites cibles</i>	<i>Rôles dans la prostate normale</i>	<i>Rôles dans le cancer de la prostate</i>
IGF I	Stromales	IGF1R, séquestration et dégradation par IGFR2	Action paracrine sur les cellules épithéliales : croissance et différenciation	Action autocrine  Augmentation de l'EGF sérique
EGF	Épithéliales	EGFR des cellules épithéliales	Régulation de la croissance	Augmentation des métastases et de l'invasion
TGF- $\alpha$	Stromales	EGFR de la surface des cellules épithéliales	Action paracrine sur les cellules épithéliales pour réguler la croissance	Augmentation de l'expression du TGF- $\alpha$
bFGF	Stromales	bFGFR des cellules stromales de la prostate normale, des cellules et épithéliales du cancer	Régulation autocrine de la croissance	Production autocrine favorisant les métastases via la production de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse
KGF	Stromales et épithéliales	FGFR2 des cellules épithéliales	Médiation paracrine de l'action des androgènes  Différenciation	Production autocrine
VEGF	Épithéliales	VEGF-Rs à la surface des cellules endothéliales et cellules cancéreuses	Augmentation de l'expression du VEGF dans le cancer	Augmentation de l'expression du VEGF dans le cancer  Angiogenèse/invasion

Adapté de Hellowell et Bewster, 2002



#### 4.3.1.1 Famille du récepteur de l'insuline

Les facteurs de croissance insulino-mimétiques (IGF) sont des FCs qui tirent leur origine d'un gène ancestral commun. Ils ont donc des séquences et des fonctions homologues et transmettent leurs signaux par le biais de trois récepteurs : le récepteur de l'insuline, l'IGF-1R et l'IGF-2R. En plus de ces récepteurs, il existe au moins six protéines liantes IGFBP et des protéases (Hellawell and Brewster 2002). L'IGF-I et l'IGF-II sont formés de chaînes polypeptidiques uniques ayant une fonction homologue à l'insuline. Ils sont produits localement par divers tissus et agissent de manière autocrine ou paracrine (Czech 1989). L'activation du récepteur IGF-IR par l'IGF-I induit la transformation, l'adhésion, la motilité et la survie cellulaires (Macaulay 1992). Par contre, l'IGF-2R a pour rôle de séquestrer l'IGF-II afin de prévenir son activité mitotique (Hankins *et al.*, 1996).

*In vivo*, l'IGF est produit en grande partie par les cellules stromales prostatiques (Wang and Wong 1998). Dans la prostate normale, l'IGF-I se lie à son récepteur exprimé au niveau des cellules épithéliales, ce qui favorise leur croissance et différenciation *via* des actions paracrines (Hellawell and Brewster 2002). Dans le cas du cancer de la prostate, l'IGF-I est exprimé par les cellules épithéliales. Ce phénomène accompagne le développement du CaP et favorise ainsi l'activité mitogénique par ses actions autocrines (Hellawell and Brewster 2002). Des études *in vitro* montrent que les niveaux de l'IGF-IR sont plus élevés dans les lignées androgéno-indépendantes que dans les lignées androgéno-dépendantes (Iwamura *et al.*, 1993). De plus, la diminution de l'activation de l'IGF-IR par un antagoniste montre une inhibition de la croissance des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate humaine (Pietrkowski *et al.*, 1993).

Les IGFBP sont produites aussi bien par les cellules épithéliales prostatiques normales que par les cellules cancéreuses. Elles modulent l'activité mitogénique de l'IGF (Boudon *et al.*, 1996). Ce phénomène est favorisé par le clivage protéolytique de l'IGFBP (Cohick and Clemmons 1993). Ce clivage réduit l'affinité de l'IGFBP pour l'IGF en favorisant l'interaction de l'IGF avec ses récepteurs (Cohen *et al.*, 1992; Cohick and Clemmons 1993). En effet, l'APS (une sérine protéase) clive préférentiellement l'IGFBP-3 (Cohen *et al.*, 1992) et l'IGFBP-5 (Rajah *et al.*, 1996), réduisant ainsi les niveaux de ces protéines et favorisant la croissance des cellules épithéliales prostatiques (Cohen *et al.*, 1994). De plus, l'augmentation des niveaux

de l'IGFBP-2 est corrélée avec une augmentation de l'APS sérique (Rajah *et al.*, 1996). Enfin, le clivage de l'IGFBP-3 et l'IGFBP-4 par l'APS contribue probablement à une plus grande disponibilité de l'IGF-I dans le sérum (Hellawell and Brewster 2002). Des augmentations des taux d'IGF dans le sérum ont été rapportées chez les patients ayant le CaP mais ces données restent controversées (Chan *et al.*, 1998; Wolk *et al.*, 1998; Ismail *et al.*, 2002).

#### 4.3.1.2 Famille du récepteur de l'EGF

Le facteur de croissance épidermique (EGF) est un facteur de croissance sécrété aussi bien par les cellules stromales du muscle lisse que par les cellules épithéliales d'un grand nombre de cancers humains incluant le CaP (Rajan *et al.*, 1996). L'EGF et le TGF $\alpha$  s'expriment au cours de la transformation maligne de la prostate (Ware, 1993).

Plusieurs évidences illustrent l'importance de la voie de signalisation de l'EGF et de ses récepteurs (EGFR), exprimés *in vitro* et *in vivo* par les lignées cellulaires du cancer de la prostate (Fong *et al.*, 1992) et activant leur prolifération (Connolly and Rose 1989; Connolly and Rose 1990; Scher *et al.*, 1995). En culture l'ajout dans le milieu d'un anti-EGF inhibe leur prolifération (Fong *et al.*, 1992). Outre ce phénomène, l'EGF stimule l'invasion métastatique et induit la migration des cellules prostatiques *in vitro* (Fong *et al.*, 1992). L'utilisation d'un antagoniste du récepteur de l'EGF inhibe la migration alors que la surexpression des récepteurs la facilite (Zolfaghari and Djakiew 1996). Ces observations suggèrent que l'EGF a des effets pléiotropiques sur les cellules humaines du cancer de la prostate en induisant aussi bien la prolifération que la migration.

La famille du récepteur de l'EGF comprend quatre récepteurs codés par des gènes distincts : EGFR/erb-1, HER-2/erb-2 (p185<sup>erbB-2</sup>), HER-3/erb-3 (p160<sup>erbB-3</sup>) et HER-4/erb-4 (Lyne *et al.*, 1997). Ces gènes sont exprimés de façon différentielle dans la prostate. Les protéines p185<sup>erbB-2</sup> et p160<sup>erbB-3</sup> ne sont pas exprimées dans les cellules épithéliales sécrétrices de la prostate normale et hyperplasique (Zhou *et al.*, 1996). Elles sont peu exprimées dans les cellules basales (Myers *et al.*, 1994). Par contre, elles sont bien exprimées dans la majorité des cellules épithéliales du PIN et du cancer de la prostate (Myers *et al.*, 1994; Bostwick and Aquilina 1996). L'amplification du gène HER-2/erb-2 et l'augmentation de l'expression de p185<sup>erbB-2</sup>

sont corrélées avec le grade du cancer (Ross *et al.*, 1999). La surexpression de p185<sup>erbB-2</sup> dans les cellules épithéliales normales résulte en une augmentation de la prolifération et de la capacité de former des métastases (Marengo *et al.*, 1997). Dans la lignée de cellules cancéreuses prostatiques humaines androgéno-dépendantes (LNCaP), l'interleukine-6 (IL-6) induit la phosphorylation de p185<sup>erbB-2</sup> et de p160<sup>erbB-3</sup> (Qiu *et al.*, 1998). Il est donc clair que p185<sup>erbB-2</sup> et p160<sup>erbB-3</sup> apparaissent avec la progression de la maladie et que ces produits d'oncogènes entraînent un phénotype prolifératif métastatique (Djakiew 2000). Par ailleurs, la protéine codée par le gène HER-4/erb-4 est fortement exprimée dans les cellules épithéliales normales mais indétectable dans les cellules cancéreuses de la prostate (Lyne *et al.*, 1997) alors que le EGFR/erb1 est faiblement exprimée dans le CaP.

#### 4.3.1.3 Famille du récepteur de l'FGF

La famille du FGF comprend des protéines monomériques de 17 à 34 kDa regroupées au sein d'une famille multigénique formée d'environ 22 facteurs (Ornitz 2001). Les FGFs sont composés d'une région centrale dite "core", fortement conservée entre eux, qui permet la liaison de haute affinité aux récepteurs à activité TK et la liaison de basse affinité aux protéoglycans (Goldfarb 1990). La majorité des FGF possède un signal peptidique du côté N-terminal facilitant leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. On distingue quatre récepteurs FGFR, produits d'épissage alternatif. Chaque type de FGF peut se lier à plusieurs types de récepteurs. Réciproquement, chaque FGFR peut lier plusieurs types de FGF (Goldfarb 1990).

Plusieurs FGF et leurs récepteurs sont exprimés dans les cellules épithéliales et stromales isolées de prostate normale et hyperplasique (Story *et al.*, 1994). Le bFGF est synthétisé par les cellules stromales et est présent dans les cellules fibroblastiques, nerveuses, les macrophages et les cellules endothéliales (Kim *et al.*, 1996). Il est très abondant dans la prostate (Saez *et al.*, 1999). Dans la prostate normale, il serait important dans l'homéostasie du mésenchyme *via* une régulation autocrine (Story *et al.*, 1989). Dans l'HBP, l'expression du bFGF est corrélée avec l'augmentation de la prolifération du stroma (Ropiquet *et al.*, 1999). Dans le cancer de la prostate, la boucle autocrine du bFGF stromale se transforme en boucle autocrine épithéliale (Cronauer *et al.*, 1997). Ce phénomène permet aux cellules épithéliales malignes de proliférer indépendamment du contrôle du stroma (Tanaka *et al.*, 1995; Cronauer *et al.*, 1997). *In vitro*, les cellules LNCaP expriment

seulement le bFGF1 et son récepteur FGFR1 (Schmitt *et al.*, 1996). Le niveau d'expression est très faible mais augmente en réponse aux androgènes. Cependant, dans les lignées androgéno-indépendantes (PC-3, DU145), le bFGF et FGFR1 sont surexprimés (Tanaka *et al.*, 1995). Des études ont montré que la production et la sécrétion du bFGF contribuent au développement des métastases via la régulation de la production de la matrice extracellulaire et en agissant sur les cellules endothéliales qui favorisent l'angiogenèse (Pienta *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 1999). Finalement, la contribution du bFGF à la progression des tumeurs a été rapportée chez les patients souffrant du cancer avancé de la prostate (Tanaka *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1996).

Le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) est un autre membre de la famille du FGF. Le KGF joue aussi un rôle dans le développement de la prostate normale (Lu *et al.*, 1999). Ainsi le KGF, produit par les cellules stromales agit sur les cellules épithéliales de façon paracrine via le récepteur FGFR2 (Yan *et al.*, 1992). Chez les rongeurs, le KGF stimule la prolifération des cellules épithéliales (Yan *et al.*, 1992). Il est aussi impliqué dans la prolifération des cellules épithéliales du cancer de la prostate (Lu *et al.*, 1999).

#### **4.3.1.4 Famille du récepteur du VEGF**

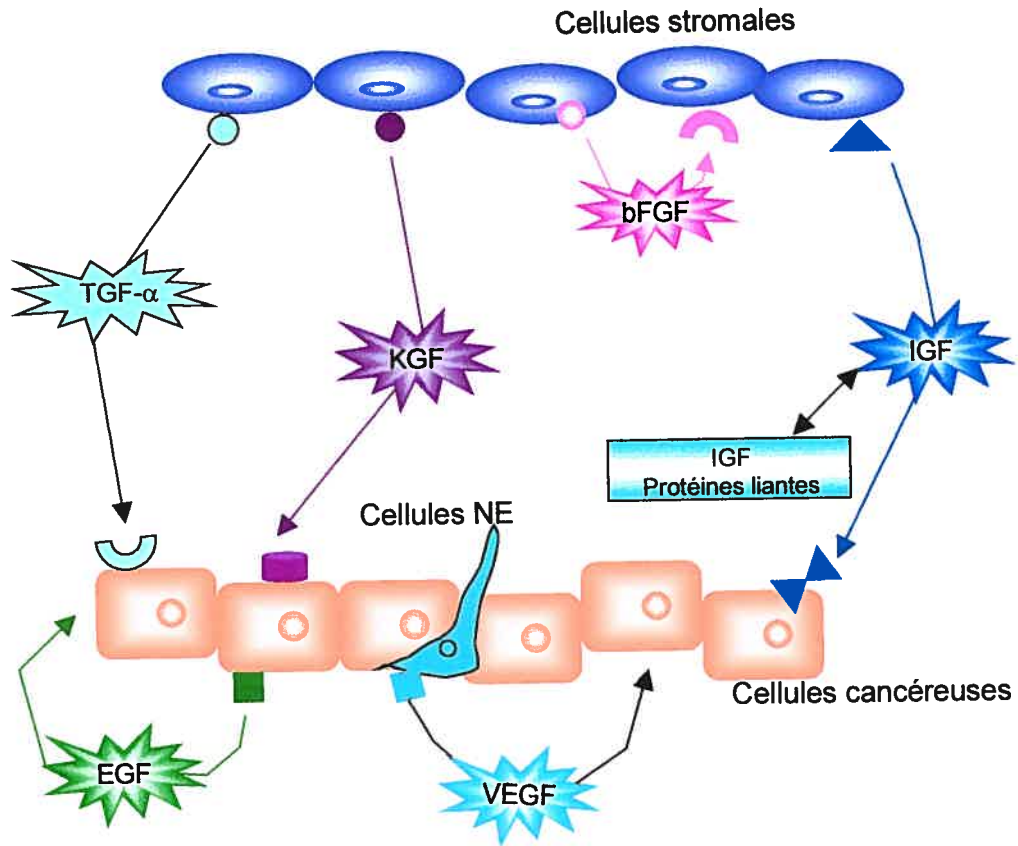
L'angiogénèse représente la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux existants. Elle est cruciale pour le développement des tumeurs lorsqu'elles excèdent deux à trois millimètres cubes (Folkman 1971) et intervient dans l'apport des nutriments et de l'oxygène nécessaire à la survie des tumeurs. L'angiogénèse est un processus qui se fait en plusieurs étapes (Gingras et Béliveau 1997) : on distingue la stimulation des cellules endothéliales par des facteurs angiogéniques, la sécrétion d'enzymes qui dégradent la membrane basale, la migration des cellules vers la source du stimulus, la formation de nouveaux vaisseaux, le remodelage du tissu et enfin la formation d'un réseau capillaire. Parmi les facteurs contribuant à l'angiogénèse, le facteur endothélial vasculaire (VEGF) est l'un des plus étudiés, notamment dans le cancer de la prostate (Hellawell and Brewster 2002).

Le VEGF est une protéine glycosylée existant sous cinq isoformes (Ferrara and Davis-Smyth 1997). L'activité du VEGF augmente souvent de façon marquée

Le VEGF est une protéine glycosylée existant sous cinq isoformes (Ferrara and Davis-Smyth 1997). L'activité du VEGF augmente souvent de façon marquée dans une vaste gamme de cellules tumorales, notamment dans les cancers du rein, du sein, de l'ovaire, de l'estomac, du poumon, de la vessie, des tumeurs du cerveau, du cou et de la prostate (Jackson *et al.*, 1997). Des résultats de recherche convaincants permettent de croire que le VEGF déclenche directement une cascade de néovascularisations dans la tumeur. Les membres de la famille du VEGF agissent via les récepteurs ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque. On distingue le VEGF-R1 (Flt-1), le VEGF-R2 (Klk-1/KDR) et le VEGF-R3 (Flt-4) (Soker *et al.*, 1998; Neufeld *et al.*, 1999). D'autres récepteurs accessoires ont été décrits, notamment la neuropiline et le protéoglycan (Soker *et al.*, 1998).

Dans la prostate humaine, l'expression du VEGF est controversée. Certaines études montrent que le VEGF est complètement absent dans l'HBP (Ferrer *et al.*, 1997) alors que d'autres travaux illustrent qu'il est exprimé uniquement dans les cellules stromales (Jackson *et al.*, 1997). Sa présence a été rapportée dans les cellules épithéliales du CaP, dans les lignées dérivées des métastases (Campbell *et al.*, 1999) et dans les cellules NE (Guy *et al.*, 1998). Il est plus abondant dans les cellules NE que dans les cellules épithéliales de la prostate normale et cancéreuse (Campbell *et al.*, 1999). Des études récentes ont montré que le VEGF est plus qu'un facteur angiogénique; il entraîne la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (Fak) et stimule la motilité des cellules PC3 exprimant le récepteur Flt-1 (Chevalier *et al.*, 2002). De plus, l'utilisation d'un anti-VEGF inhibe le développement du CaP (Borgstrom *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent que les cellules humaines cancéreuses expriment le VEGF pour l'angiogenèse et le développement des masses cancéreuses (Melnyk *et al.*, 1999). Enfin, des études cliniques montrent une corrélation positive entre les niveaux sériques du VEGF et le degré d'agressivité du cancer de la prostate (Jones *et al.*, 2000).

L'action concertée est possiblement synergistique de ces FCs contribue soit au maintien de l'homéostasie des cellules de la prostate normale et au développement du CaP par boucles autocrine ou paracrine (figure 7).



**Figure 7: Schéma résumant l'action de divers facteurs de croissance dans le cancer de la prostate.**

Adapté de Hellowell and Brewster (2002)  
et revu selon Chevalier *et al*, (2002)

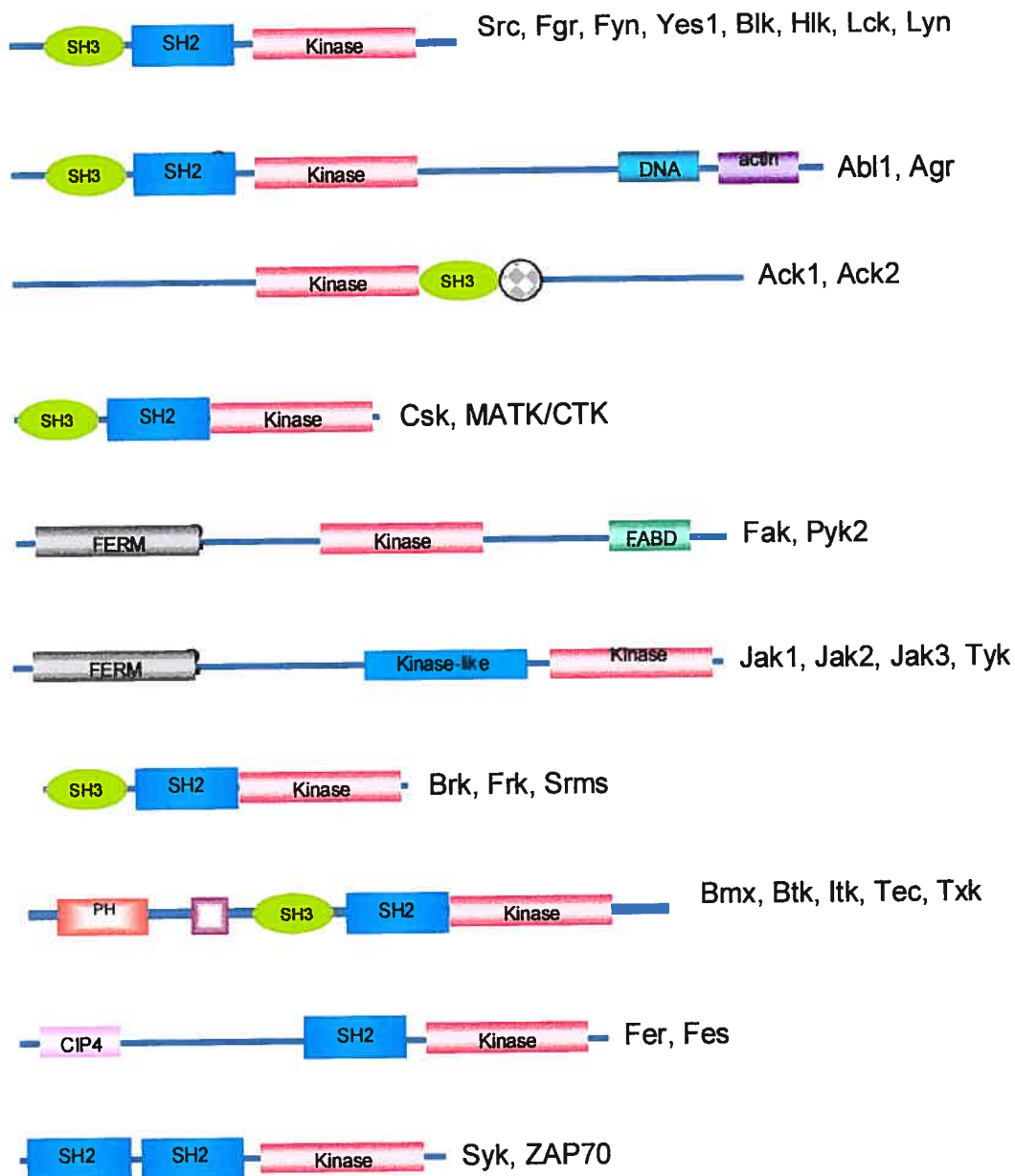
### 4.3.2 Tyrosine kinases cytoplasmiques

À ce jour, plus d'une trentaine de protéines tyrosine kinases (TKs) cytoplasmiques ont été identifiées. Les TKs cytoplasmiques sont classées en 10 groupes comprenant 32 membres (figure 8) dont la moitié sont impliquées dans le cancer. Dans le contexte de cette thèse, nous nous attarderons plus particulièrement à la description de Src, Abl, Jak et Fer.

#### 4.3.2.1 Famille Src

La protéine codée par le gène *src* du virus du sarcome de Rous (VSR) fut le premier produit oncogénique pour lequel une fonction biochimique aussi inattendue qu'excitante fut découverte: la capacité de phosphoryler les protéines (Collett and Erikson 1978). La famille Src comporte actuellement neuf membres (Src, Fgr, Fyn, Yes, Blk, Hck, Lck, Lyn et Yrk), classifiés en sous-groupes selon les types cellulaires dans lesquels elles sont exprimées. Ainsi, les kinases Src, Yes, Fyn et Yrk sont ubiquitaires, les kinases Lyn et Hck sont principalement hématopoïétiques et les kinases Fgr, Lck et Blk sont exclusivement hématopoïétiques (Hibbs and Dunn 1997).

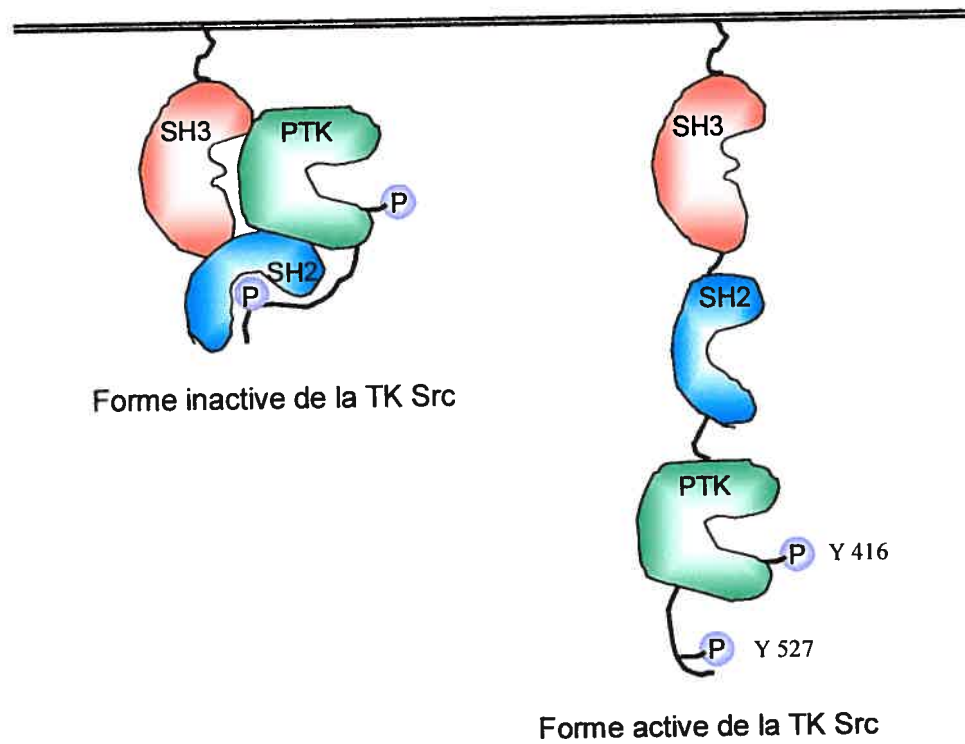
Les protéines de la famille Src possèdent entre 505 et 543 acides aminés et ont une structure similaire. Elles possèdent un domaine Src homology (SH)<sub>4</sub> facilitant l'ancrage à la membrane, des domaines SH<sub>2</sub> et SH<sub>3</sub> permettant les interactions protéine-protéine, un domaine catalytique hautement conservé d'environ 250 acides aminés et contenant une tyrosine qui est un site majeur d'autophosphorylation (en position 416 dans le cas de Src) et finalement, un court domaine de régulation en C-terminal qui renferme une tyrosine conservée (position 527 dans le cas de Src). *In vitro*, la phosphorylation de la tyrosine en position 416 se traduit par une légère augmentation de l'activité catalytique et par une régulation positive de son activité. Cependant, la phosphorylation de la tyrosine en position 527 favorise sa liaison avec son propre domaine SH<sub>2</sub> et affecte négativement son activité en inhibant son activité catalytique (figure 9) (Matsuda *et al.*, 1990). Cette phosphorylation résulterait de l'action de la TK Csk (Nada *et al.*, 1991).



**Figure 8: Familles des tyrosine kinases cytoplasmiques.**

Représentation schématique des différentes familles de TK cytoplasmiques comprenant 32 membres. Adapté de Blume-Jensen and Hunter (2001)





**Figure 9 : Modele d'activation de c-Src.**

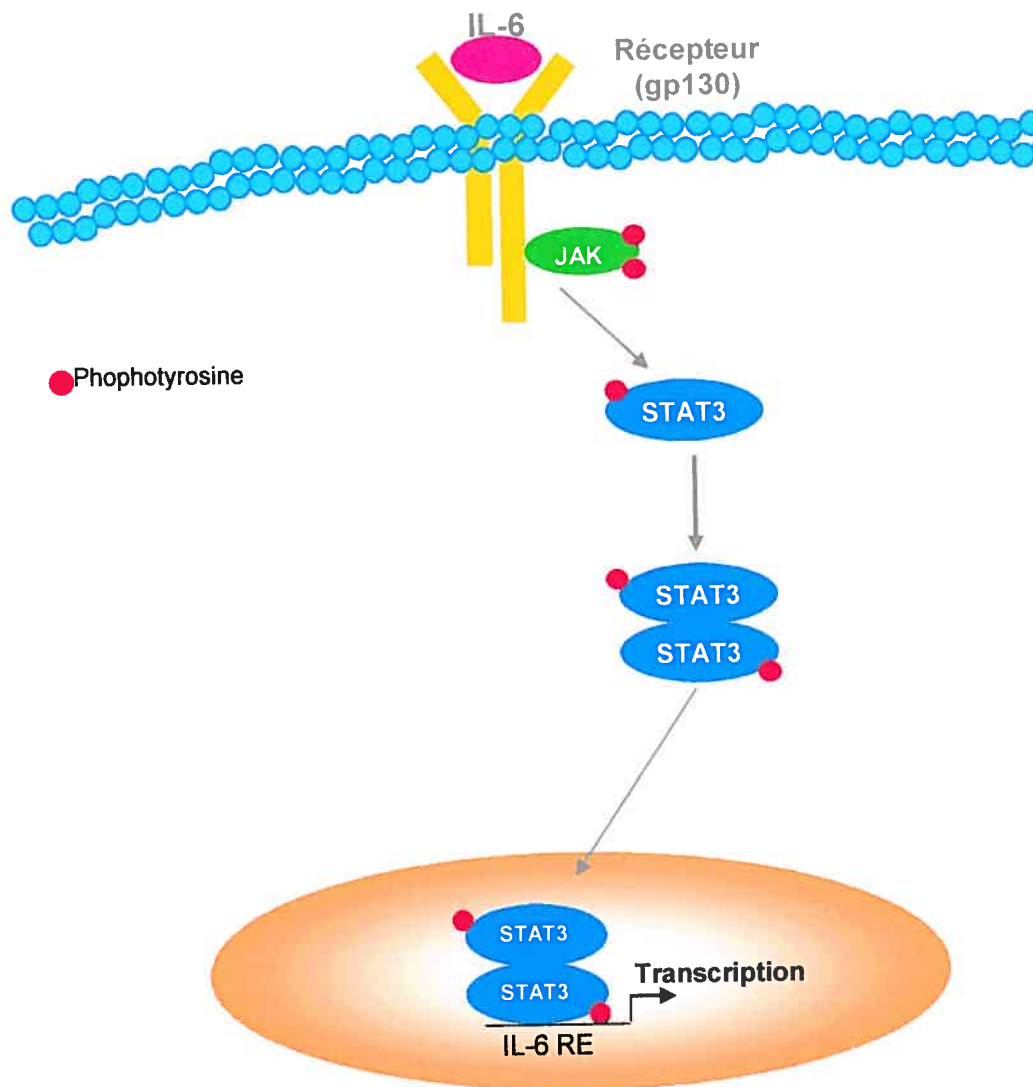
Adapté de Blume-Jensen et Hunter (2001)

La protéine Src phosphoryle de nombreux substrats parmi lesquels se trouvent les composantes du cytosquelette, des intermédiaires de la cascade de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Kinase) et des molécules impliquées dans l'adhésion dont la TK Fak. De plus, Src phosphoryle Sam68 dans le noyau. Elle peut donc être impliquée dans la maturation des ARNm dans les cellules mitotiques (Brown and Cooper 1996). Dans la prostate, Src est requise pour la motilité des cellules épithéliales cancéreuses *in vitro* (You *et al.*, 2003).

#### 4.3.2.2 Famille Jak

Les Jaks (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2) sont principalement associées aux récepteurs des cytokines et transmettent leur signal suite à la dimérisation de récepteurs hétérodimériques dépourvus d'activité TK (Heim 1996). Les kinases Jak1 et Jak2 sont exprimées dans la lignée DU145 (Gao *et al.*, 2001). Prenons l'exemple de IL-6, montré à la figure 10.

L'IL-6 se lie à son récepteur qui est composé de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La première sous-unité de 80 kDa (IL-6Rp80, IL-6R) se lie spécifiquement à l'IL-6 mais n'a aucun pouvoir de signalisation (Taga *et al.*, 1989). La deuxième sous unité, une glycoprotéine de 130 kDa (gp130), n'a aucune capacité intrinsèque de liaison à l'IL-6 mais sa présence avec l'IL-6R favorise une grande affinité pour l'IL-6 et pour la transduction du signal (Hibi *et al.*, 1990; Taga 1996). La gp130 contient six résidus tyrosines phosphorylables mais elle ne possède pas d'activité TK. Elle permet la transduction du signal après sa liaison avec l'IL-6R (Taga 1996). L'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de la gp130 active les TKs de la famille des Jak (Stahl *et al.*, 1994), qui entraîne par la suite la phosphorylation de gp130 et initiant ainsi l'activation d'une cascade de signalisation (Stahl *et al.*, 1994). Suite à la phosphorylation des différentes tyrosines de la gp130, il y a recrutement de plusieurs protéines par le biais de leur domaine SH2 tels les membres de la famille de STAT (signal transduction and activator de la transcription (Schindler and Darnell 1995) et de la tyrosine phosphatase SHP2 (Heinrich *et al.*, 1998; Schaper *et al.*, 1998) respectivement. Une fois phosphorylées par les Jaks, les STAT forment soit un homodimère, soit un hétérodimère par le biais de leurs domaines SH2 (Schindler and Darnell 1995).



**Figure 10: Voie de signalisation de Jak/STAT3 régulée par l'IL-6.**  
Adapté de Schindler (2002)

Ces complexes se transloquent ensuite dans le noyau, où ils se lient à des éléments de réponse ou des séquences spécifiques d'ADN et activent la transcription d'une batterie de gènes (Fourcin *et al.*, 1996; Giordano *et al.*, 1997). Dans le cas de STAT3, la formation du dimère est facilitée par la phosphorylation de la tyrosine en position 705 (Schindler and Darnell 1995). La sérine en position 727 est aussi phosphorylée après stimulation par l'IL-6 (Wen *et al.*, 1995).

L'IL-6 active aussi la voie des MAPK et transactive les gènes dépendants de l'IL-6 (Hirano *et al.*, 1997; Heinrich *et al.*, 1998; Ishihara and Hirano 2002; Heinrich *et al.*, 2003). De plus, l'IL-6 active la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) via la stimulation de sa sous unité p85, suggérant donc que une réponse complexe des cellules à l'action de cette cytokine (Boulton *et al.*, 1994; Takahashi-Tezuka *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999).

Les niveaux sériques d'IL-6 augmentent chez les patients atteints du cancer de la prostate avec métastases (Twillie *et al.*, 1995; Adler *et al.*, 1999). En outre, d'autres études illustrent que ces taux sont très élevés chez des patients dont la prostate est réfractaire aux hormones comparativement aux témoins et aux patients ayant une hyperplasie bénigne et un cancer localisé (Drachenberg *et al.*, 1999). Ainsi, l'IL-6 pourrait être un marqueur d'un phénotype androgéno-indépendant. Par ailleurs, les niveaux de STAT3 et de sa forme activée dans les tumeurs corrént avec la progression du CaP (Ni *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que la voie de signalisation de l'IL-6, Jak et STAT pourrait être importante dans le CaP.

#### **4.3.2.3 Famille c-abl**

Le gène *c-abl* code pour une tyrosine kinase de 140 kDa retrouvée dans le cytoplasme et le noyau de toutes les cellules et tissus étudiés. Elle a été identifiée grâce à sa similarité avec l'oncogène *v-abl*, codé par le virus murin de la leucémie d'Abelson (Wang *et al.*, 1984). Elle possède des domaines SH2 et SH3, mais diffère des membres de la famille Src par la présence d'un large domaine en C-terminal qui possède la capacité de se lier spécifiquement à une séquence de l'ADN. Il s'agit de l'élément EP, composé de six paires de bases, retrouvé dans la région activatrice «enhancer» de plusieurs virus (Dikstein *et al.*, 1992). Le domaine C-terminal de *c-abl* est phosphorylé de façon dépendante du cycle cellulaire sur des résidus sérine et thréonine, soit trois sites durant l'interphase et sept sites additionnels durant la

mitose. Neuf des dix sites de phosphorylation résultent de l'activité de la kinase p34cdc2 (Kipreos and Wang 1990). Cette phosphorylation de c-abl n'a pas d'influence sur son activité catalytique mais inhibe plutôt sa capacité à se lier l'ADN (Kipreos and Wang 1992). De plus, cette propriété de liaison à l'ADN est perdue chez la protéine Bcr-abl, où elle se trouve uniquement dans le cytoplasme des cellules leucémiques myélomateuses (Kipreos and Wang 1992). Des études récentes suggèrent que la protéine c-abl nucléaire joue un rôle dans l'apoptose induite par les dommages causés à l'ADN et que la protéine Bcr-abl, cytoplasmique, contourne cette fonction (Wang 2000). En outre, la protéine c-abl nucléaire est activée par les radiations et certaines drogues cytostatiques (Kharbanda *et al.*, 1995). Cependant, le gène suppresseur de tumeur Rb qui lie c-abl à la phase G0-G1 du cycle cellulaire, inhibe la fonction de c-abl et empêche les dommages à l'ADN (Chen *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2003). Ces dommages induisent l'activation de la protéine c-abl nucléaire qui s'observe uniquement après l'entrée en phase S du cycle cellulaire où c-abl est relâchée par l'hyperphosphorylation de Rb (Blume-Jensen and Hunter 2001). Ainsi, les cellules déficientes en Rb sont plus sensibles à l'apoptose induite par les dommages au niveau de l'ADN (Chen *et al.*, 1996; Blume-Jensen and Hunter 2001; Cho *et al.*, 2003). Dans la prostate, abl protège la lignée de cellules prostatiques cancéreuses androgéno-indépendantes DU145 de l'apoptose suite à un traitement aux radiations (Bowen *et al.*, 2002).

#### **4.3.2.4 Tyrosine kinase Fer**

Fer est une tyrosine kinase de type non récepteur de 94 kDa, codée par un proto-oncogène localisé sur le chromosome 5q21 (Morris *et al.*, 1990). Fer appartient à la famille de Fes. Fer et Fes sont identiques à 49% et ont une structure semblable (Morris *et al.*, 1990), ce qui suggère que ces deux protéines jouent des rôles similaires sur le plan biologique. Le gène *fer* est conservé au cours de l'évolution puisque ses homologues ont été clonés chez la drosophile et chez l'éponge marine *Sycon raphanus* (Cetkovic *et al.*, 1998). Elle possède un potentiel de transformation chez la drosophile (Paulson *et al.*, 1997) et est exprimée et activée dans une grande variété de cellules (Pawson *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 1990). Elle joue un rôle dans la régulation de l'inflammation et participe au recrutement des leucocytes durant la réponse immunitaire innée (Zirngibl *et al.*,

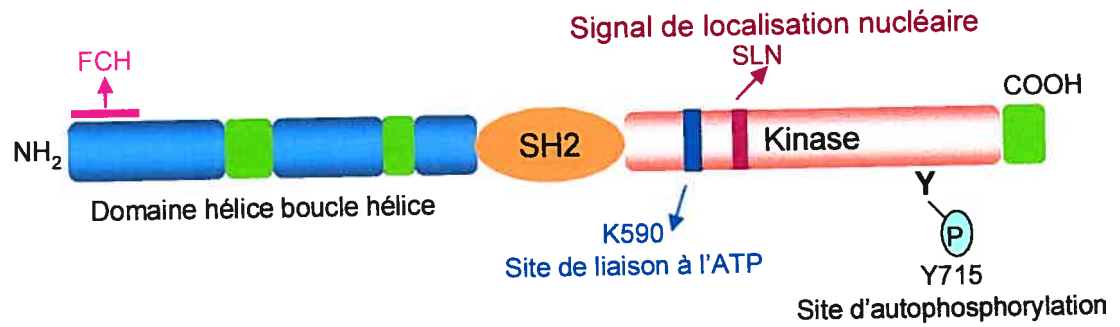
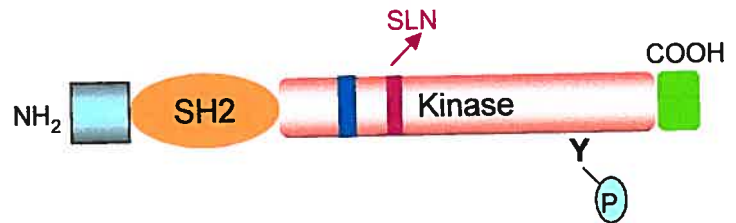
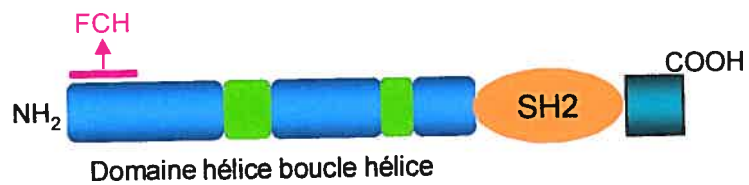
2002). Fer est localisée dans la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau (Hao *et al.*, 1991; Allard *et al.*, 2000).

#### 4.3.2.4.1 Structure de Fer

La structure de Fer consiste en un domaine FCH (Fps/Fes/Fer et Cdc42-interacting protein Homology), un domaine hélice boucle hélice en N-terminal, un central SH2 et un domaine kinasique en C-terminal (figure 11). Ces différents domaines permettent à Fer de former des complexes avec diverses molécules de signalisation, ce qui lui confère donc plusieurs rôles (Greer 2002).

- **Le domaine FCH** : ce domaine a été identifié dans Fer en raison de son homologie avec les protéines qui interagissent avec Cdc42 (CIP) (Aspenstrom 1997). Les protéines qui présentent le domaine CIP sont principalement impliquées dans la régulation du cytosquelette, du transport des vésicules et de l'endocytose (Tribioli *et al.*, 1996; Modregger *et al.*, 2000; Qualmann and Kelly 2000; Tian *et al.*, 2000). Cependant, le rôle exact du FCH de Fer n'a pas encore été établi.

- **Le domaine hélice boucle hélice** : ce domaine présente une série d'hélices boucles hélices qui s'enroulent pour former une superhélice permettant l'homo- ou l'hétéro-oligomérisation des protéines (Kim and Wong 1995; Craig *et al.*, 1999). Ce type de domaine se retrouve dans la structure de certains facteurs de transcription. Fer possède trois motifs hélice boucle hélice capables de s'homodimériser et permettant à la protéine de se transphosphoryler. La mutation du premier ou du second motif de la superhélice abolit l'oligomérisation mais n'affecte pas l'autophosphorylation (Craig *et al.*, 1999; Orlovsky *et al.*, 2000). De plus, la délétion de ce domaine n'affecte pas la phosphorylation de Fer. Quand à Fer T, qui ne contient pas le domaine hélice boucle hélice, elle est active sous forme monomère (Orlovsky *et al.*, 2000). Il a été proposé que ce domaine retienne Fer dans le cytoplasme, puisque FerT est essentiellement nucléaire. D'autre part, Fer est présente aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules. Ceci peut être relié à l'oligomérisation des protéines suggérant que seule la forme monomérique de Fer entre dans le noyau (Orlovsky *et al.*, 2000). D'autre part, le domaine hélice boucle hélice permet à Fer de former un complexe avec p120Cas, une protéine importante dans les interactions cellule-cellule (Kim and Wong 1995).

**Fer****FerT****iFer**

**Figure 11: Structure schématique de Fer et de ses formes tronquées.**

Adapté de Greer (2002) et Iwanishi (2002)

- **Le domaine SH2** : ce domaine permet les interactions protéine-protéine (Moran *et al.*, 1990) qui sont essentielles pour les activités oncogéniques de certaines TKs comme Src et Fps/fes (Moran *et al.*, 1990). La conservation de ce domaine dans diverses protéines de signalisation et son rôle dans les interactions spécifiques avec des protéines phosphorylées sur tyrosine sont bien établis. Le domaine SH2 de Fer permet son association avec la cortactine (Kim and Wong 1998) et serait aussi impliqué dans les interactions avec les récepteurs du PDGF et de l'EGF (Kim and Wong 1998), la PI3 kinase et le substrat 1 du récepteur de l'insuline (Iwanishi *et al.*, 2000).

- **Le domaine catalytique** : ce domaine lui confère son activité kinasique. Il est situé en C-terminal de la molécule et contient le site de liaison de l'ATP (Gly-x-Gly-x-x-Gly-x<sub>15</sub>-Lys) situé entre les acides aminés 571 et 592. On y retrouve la tyrosine conservée en position 715 qui est responsable de l'autophosphorylation de Fer (Hao *et al.*, 1991). De plus, au moins trois autres sites de phosphorylation ont été identifiés par l'analyse des phosphopeptides tryptiques, mais la localisation de ces résidus n'a pas encore été identifiée (Craig *et al.*, 1999; Orlovsky *et al.*, 2000). Enfin, le signal de localisation nucléaire est situé dans la région 651-660 (Hao *et al.*, 1991). Il permet à Fer de se transloquer dans le noyau des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) à la phase G1-S du cycle cellulaire (Ben-Dor *et al.*, 1999). En outre, un court peptide dans la région C-terminale est aussi requis pour cette translocation (Ben-Dor *et al.*, 1999). Cependant d'autres études dans les cellules COS-1 rapportent que de Fer est diffuse dans le cytoplasme et aucun signal n'a été observé dans le noyau au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Zirngibl *et al.*, 2001).

#### 4.3.2.4.2 Formes tronquées de Fer

Fer existe aussi sous deux formes tronquées qui sont des produits d'épissage alternatif. On distingue: 1) La protéine FerT de 51 kDa, dépourvue du domaine N-terminal, présente un domaine SH2 et une séquence unique de 44 acides aminés en N-terminal (figure 11). Elle est exprimée exclusivement dans les testicules et localisée dans le noyau. 2) La protéine iFer, de 60 kDa, dépourvue du domaine C-terminal de Fer, contient le même domaine N-terminal que Fer, ainsi



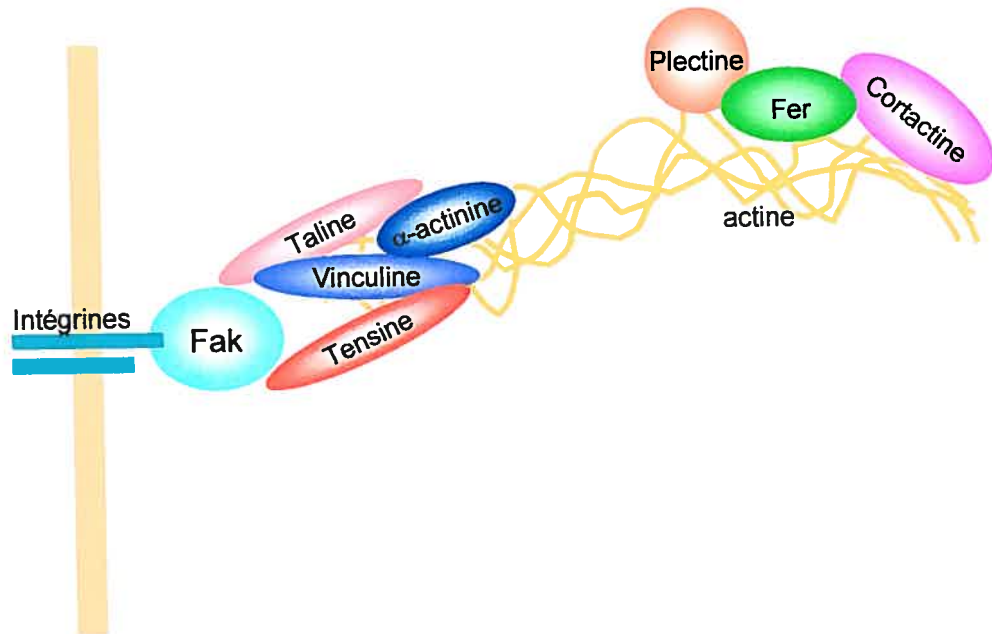
qu'un domaine FCH et un domaine hélice boucle hélice, un domaine SH2 et une séquence de 42 acides aminés en C-terminal. Elle est dépourvue du domaine catalytique et ne peut donc phosphoryler aucun substrat. Elle fut découverte dans les adipocytes. Son expression est augmentée lors de la différenciation des fibroblastes en adipocytes. Comme iFer contient le même domaine hélice boucle hélice que Fer, elle pourrait former un oligomère avec Fer et la retenir dans le cytoplasme (Iwanishi *et al.*, 2000). Cependant, sa localisation n'a pas encore été rapportée.

#### **4.3.2.4.3 Fer dans la signalisation et les fonctions cellulaires**

Fer est impliquée dans différentes voies de signalisation régulant le cytosquelette d'actine (Kim and Wong 1995; Kim and Wong 1998), les interactions cellule-cellule (Kim and Wong 1995), les adhésions focales (Rosato *et al.*, 1998; Arregui *et al.*, 2000), la différenciation (Iwanishi *et al.*, 2000; Taler *et al.*, 2003), la prolifération (Allard *et al.*, 2000; Orlovsky *et al.*, 2000; Orlovsky *et al.*, 2002), la survie (Halachmy *et al.*, 1997; Iwanishi *et al.*, 2000) et l'inflammation (McCafferty *et al.*, 2002).

##### **4.3.2.4.3.1 Régulation du cytosquelette**

Le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine et sa réorganisation font partie des processus dynamiques permettant à la cellule d'exercer ses diverses fonctions. La réorganisation du cytosquelette d'actine est régulée par différentes voies de signalisation qui font appel aux TKs. Hormis l'actine qui constitue la composante centrale du cytosquelette, d'autres protéines comme la cortactine et la plectine jouent également un rôle prépondérant. Il a été démontré que Fer interagit avec la cortactine (figure 12) (Kim and Wong 1998). La cortactine est une protéine du cytosquelette qui permet de coupler les voies de signalisation impliquant les RTKs à celles régulant le cytosquelette (Weed and Parsons 2001). L'interaction de Fer avec la cortactine est favorisée par le domaine SH2 de Fer. Il en résulte la phosphorylation de la cortactine. Cette phosphorylation est inhibée par le dominant négatif de Fer suggérant que la cortactine est un substrat direct de Fer (Kim and Wong 1998).



**Figure 12: Schéma de la position de Fer dans le cytosquelette d'actine.**

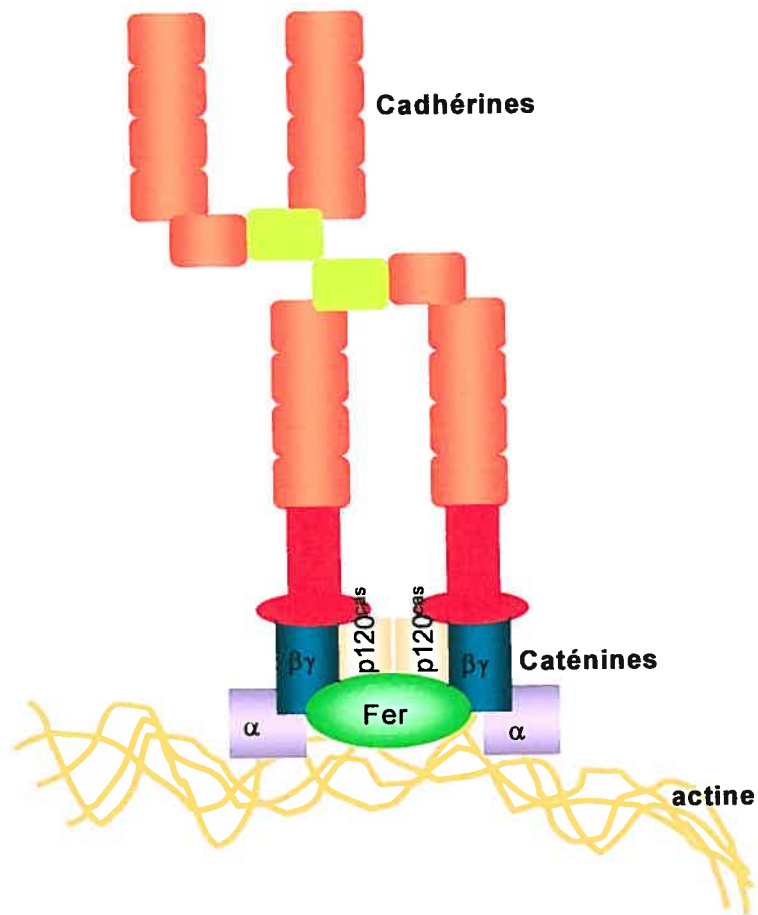
La phosphorylation de la cortactine induite par Fer est modulée par différents FC dont le PDGF (Kim and Wong 1998) et le stress osmotique (Kapus *et al.*, 2000). En effet, le PDGF favorise la localisation du complexe Fer/cortactine au niveau des replis membranaires et induit la phosphorylation de Fer qui, par la suite induit celle de la cortactine (Kim and Wong 1998). L'effet du PDGF sur la cortactine est inhibé dans les cellules (Kim and Wong 1998) et les souris transgéniques par la surexpression du dominant négatif de Fer (Craig *et al.*, 2001). D'autre part, le stress osmotique induit la phosphorylation de Fer et de la cortactine par le biais de l'activation de la tyrosine kinase Fyn (Kapus *et al.*, 2000). L'inhibition de la phosphorylation de Fyn par le PP2 (un inhibiteur spécifique de la famille Src) entraîne une diminution de la phosphorylation de Fer qui s'accompagne d'une baisse de celle de la cortactine. Ceci suggère que Fyn agit en amont de Fer (Kapus *et al.*, 2000). De plus la surexpression de la forme sauvage de Fer dans les cellules mène à une activation de la cortactine sous l'effet du stress osmotique alors que le dominant négatif de Fer l'abolit (Kapus *et al.*, 2000). La phosphorylation de la cortactine s'accompagne d'une baisse de son interaction avec l'actine et de sa disponibilité à la dégradation par la calpaine (Huang *et al.*, 1997).

Parallèlement, Fer s'associe à une autre protéine du cytosquelette, la plectrine (figure 12) (Lunter and Wiche 2002). Cette dernière régule la dynamique du cytosquelette (Allen and Shah 1999) via son interaction avec l'actine et les filaments intermédiaires (Steinbock and Wiche 1999). Fer et la plectrine interagissent via leurs domaines N-terminal. Leur co-localisation partielle dans les fibroblastes suggère aussi que ces deux protéines s'associent directement (Lunter and Wiche 2002). Cependant, la plectrine n'est pas un substrat de Fer car elle n'est pas phosphorylée sur résidu tyrosine. La surexpression de Fer dans les fibroblastes dépourvus de plectrine mène à l'hyperphosphorylation de Fer (Lunter and Wiche 2002). De plus, l'expression de la forme tronquée de Fer en N-terminal montre le même niveau de phosphorylation de Fer, aussi bien dans les cellules dépourvues de plectrine que dans les cellules sauvages. Ceci indique que l'autophosphorylation de Fer diminue quand la plectrine est présente et que le domaine N-terminal de Fer est nécessaire à ce phénomène. Il a donc été proposé que la plectrine pourrait modifier l'oligomérisation de Fer par la séquestration de la forme monomérique ou

altérer la structure quaternaire des oligomères de Fer, réduisant ainsi le potentiel du domaine kinasique à s'engager dans les interactions intermoléculaires (Lunter and Wiche 2002).

#### 4.3.2.4.3.2 Interaction cellule-cellule

Les interactions cellules-cellules sont assurées par une structure bien déterminée (figure 13), formée par les caténines et la p120Cas qui permettent de lier les cadhérines aux filaments d'actine (Gumbiner 2000). La phosphorylation au niveau des résidus tyrosine de ces protéines est un mécanisme crucial dans la régulation des jonctions adhérentes (Daniel and Reynolds 1997; Roura *et al.*, 1999; Owens *et al.*, 2000). Dans la plupart des cas, l'augmentation de la phosphorylation des protéines des jonctions adhérentes va de pair avec la dissociation des contacts (Behrens *et al.*, 1993). Plusieurs travaux suggèrent que les TKs jouent un rôle capital, par un mécanisme direct ou indirect dans la phosphorylation de ces éléments de contact (Calautti *et al.*, 1998; Owens *et al.*, 2000). La phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur la tyrosine en position 654 est importante pour la modulation des interactions E-cadhérine et  $\beta$ -caténine *in vivo* (Piedra *et al.*, 2003) et la stabilisation des jonctions dans les cellules épithéliales intestinales (Roura *et al.*, 1999). Cette stabilisation des jonctions adhérentes est modulée en partie par Fer qui interagit avec p120Cas et la  $\beta$ -caténine (figure 13) (Kim and Wong 1995 ; Piedra, Miravet *et al.* 2003). Ainsi, Fer s'associe avec p120Cas via son domaine hélice boucle hélice. Ceci augmente sa phosphorylation, aussi modulée par le PDGF et l'EGF, et favorise ainsi l'association du complexe Fer/p120Cas à ces récepteurs respectifs (Kim and Wong 1995). Une fois phosphorylée, la p120Cas augmente sa liaison avec la E-cadhérine et facilite les interactions de Fer avec les complexes des jonctions adhérentes, ce qui entraîne la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et sa dissociation du complexe. Ceci se traduit par la perte des jonctions adhérentes (Piedra *et al.*, 2003). De plus, Fer s'associe avec la  $\beta$ -caténine. Cette interaction est assurée par le domaine SH2 de Fer. Fer phosphoryle la  $\beta$ -caténine (Rosato *et al.*, 1998) sur la tyrosine en position 142 (Piedra *et al.*, 2003). En effet, la surexpression de Fer entraîne la phosphorylation sur la tyrosine de la  $\beta$ -caténine et cause ainsi une diminution de la  $\beta$ -caténine associée aux cadhérines. Il en résulte une perte des jonctions adhérentes.



**Figure 13: Schéma de la position de Fer dans les interactions cellulaires.**

#### 4.3.2.4.3.3 Adhésions focales

Des études effectuées sur les cellules de la rétine de poussin ont montré l'implication de Fer dans la régulation des jonctions adhérentes et des adhésions focales durant la croissance neuronale via ses interactions avec les N-cadhérines et la protéine Fak (Lilien *et al.*, 1999; Arregui *et al.*, 2000). La dissociation de Fer des complexes N-cadhérine/p120Cas et  $\beta$ -caténine induite par le peptide trojan (un agent qui perturbe les interactions protéines/protéines au niveau des jonctions adhérentes) cause une perte de l'interaction de la N-cadhérine avec la protéine phosphatase 1B (PTP-1B) et favorise la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine. Cette action est associée à la perte des jonctions adhérentes. Une fois dissociée, Fer apparaît dans un complexe avec Fak. Ceci perturbe les adhésions focales et la diminution de la phosphorylation sur tyrosine de p130Cas, un substrat de Fak. Par ailleurs, le neurocan, un régulateur endogène des N-cadhérines, induit la même dissociation de Fer des jonctions adhérentes (Lilien *et al.*, 1999; Arregui *et al.*, 2000). Ces observations indiquent que Fer peut réguler les jonctions adhérentes et favoriser une signalisation croisée entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales.

La surexpression de Fer dans les fibroblastes embryonnaires en culture entraîne des changements majeurs qui se traduisent par l'arrondissement des cellules et la perte de leur adhérence au support de culture. Les études de cytométrie en flux montrent que les cellules qui surexpriment Fer manifestent une réduction de la viabilité et une augmentation de la mort par apoptose. Les auteurs suggèrent que la baisse de la viabilité des cellules flottantes n'est pas une conséquence directe de la surexpression de Fer mais plutôt une incapacité des cellules à s'attacher (Rosato *et al.*, 1998).

#### 4.3.2.4.3.4 Différenciation

L'expression de Fer et de iFer est augmentée dans les adipocytes différenciés. Aussi dans ces cellules, le PDGF entraîne l'activation rapide de Fer suivie par son recrutement au complexe PDGFR et PI3K. De plus, l'insuline stimule l'association de Fer avec le complexe PI3K et IRS-1 (Iwanichi *et al.*, 2000). D'autres études ont montré que l'expression de Fer est augmentée dans les cellules

myogéniques C2C12 en différenciation sous le contrôle de l'insuline (Taler *et al.*, 2003). L'insuline induit alors l'association de Jak1 avec Fer durant les premières 24 heures de traitement, phase correspondant plutôt à un état de prolifération des C2C12 (Taler *et al.*, 2003). Les niveaux d'expression et de la phosphorylation de Fer deviennent maximaux après 48 heures, période où les cellules myogéniques se différencient en myotubes. Jak cède alors sa place à STAT3 dans le complexe avec Fer et STAT3 devient hyperphosphorylée malgré la diminution de son niveau d'expression. Ceci illustre que le complexe Fer/STAT3 est sous le contrôle de l'insuline dans les cellules myogéniques en différenciation. Le traitement des cellules myogéniques par le LY294002, un inhibiteur de la PI3K, antagonise l'effet de l'insuline sur le complexe Fer/STAT3 et bloque l'induction de la différenciation (Taler *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent l'implication de Fer dans la voie de signalisation de l'insuline.

#### 4.3.2.4.3.5 Prolifération

Fer semble participer à la régulation soit positive ou négative de la prolifération des cellules ou de la transcription des gènes. Il a été récemment rapporté que Fer s'associe avec STAT3 dans les cellules Cos (Priel-Halachmi *et al.*, 2000). La surexpression d'un dominant négatif de Fer entraîne une diminution drastique de la phosphorylation de STAT3 et conduit à l'incapacité de STAT3 de se lier à l'ADN (Priel-Halachmi *et al.*, 2000). Quant au complexe Fer/STAT3, il est régulé par l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), connu comme étant un inhibiteur de la prolifération des cellules cancéreuses du colon (Orlovsky *et al.*, 2002). Le traitement des cellules par l'IFN- $\gamma$  entraîne une réduction des niveaux de Fer et une diminution de l'activité de STAT3 (Orlovsky *et al.*, 2002). D'autres études montrent l'implication de Fer nucléaire dans la régulation de la prolifération et de la transcription. En effet, Fer peut se transloquer dans le noyau à la phase G1-S du cycle cellulaire (Ben-Dor *et al.*, 1999), se lier à la chromatine (Bern *et al.*, 1997) et phosphoryler le facteur modulateur de l'élément TATA (TATA element modulatory Factor) ou TMF. Ce facteur se lie à l'élément TATA de l'ARN polymérase II et inhibe la synthèse de l'ARN (Schwartz *et al.*, 1998). La phosphorylation du TMF par Fer peut activer ou inhiber la liaison du TMF à l'ADN et affecter par la suite la formation du complexe d'initiation de la transcription (Schwartz *et al.*, 1998). D'autres études suggèrent que Fer pourrait être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et

pourrait être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN par le biais de la phosphorylation de p34cdc2 (Halachmy *et al.*, 1997).

#### **4.3.2.4.3.6 Survie**

La surexpression de Fer dans les cellules pre-T affecte légèrement le cycle cellulaire mais n'affecte pas la mort par apoptose induite par les irradiations gamma. Cependant, les cellules qui survivent à ce traitement récupèrent. Ces résultats suggèrent que la surexpression de Fer dans les pre-T augmente leur capacité de survivre (Halachmy *et al.*, 1997). De plus, Fer est impliquée dans la voie de la PI3K qui est considérée comme une voie de survie (Cantley, 2002).

#### **4.3.2.4.3.7 Inflammation**

Dans les mastocytes, Fer est activée en aval du récepteur RI $\epsilon$ Fc, un processus relié à leur dégranulation en réponse à l'inflammation (Penhallow *et al.*, 1995). Alors que l'activation de Fer en aval des récepteurs RI $\epsilon$ Fc et c-Kit est inhibée dans les mastocytes des souris transgéniques exprimant le dominant négatif de Fer la dégranulation, la biosynthèse des leucotriènes et la sécrétion des cytokines ne sont pas affectés. Par ailleurs, toujours suite à la stimulation des récepteurs RI $\epsilon$ Fc et c-Kit, leur adhésion est augmentée et leur motilité est diminuée. D'autre part, ces deux processus -adhésion et migration- augmentent suite à un traitement des leucocytes aux lipopolysaccharides (LPS) (McCafferty *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que Fer est impliquée dans l'inflammation.

#### **4.3.2.4.4 Fer dans la prostate**

À ce jour, malgré la soixantaine d'articles publiés sur Fer, aucune étude, mis à part les travaux de notre équipe n'a relié son expression ou son activation avec une pathologie humaine. Nous avons cloné l'ADNc de Fer du chien qui présente 95% d'homologie avec celle de l'homme et du rat. Des anticorps contre un peptide C-terminal de Fer ont été produits et ont permis d'étudier son expression aussi bien dans les lignées cellulaires (cancer de la prostate) et cellules épithéliales de la prostate normale en culture primaire ainsi que dans les tissus humains normaux, hyperplasiques et cancéreux. Les résultats ont montré qu'au niveau cellulaire, l'expression de Fer est plus élevée dans les cellules PC3 et les cellules primaires basales de prostate de chien en division que dans les cellules LNCaP et les cellules



basales normales au repos fraîchement isolées (Allard *et al.*, 2000). Au niveau tissulaire, Fer est plus exprimée dans les tissus de prostate cancéreuse humaine que dans les tissus de prostate humaine hyperplasique ou normale (Allard *et al.*, 2000). Ces résultats indiquent une association entre l'expression de Fer, la croissance des cellules basales et le CaP. D'autre part, des études effectuées sur les cellules primaires épithéliales de la prostate de chien ont montré que l'expression, l'activation et la distribution de Fer dépendent initialement de l'habilité des cellules à se diviser. Notons cependant que l'expression et la localisation changent par la suite au fur et à mesure du ralentissement de la prolifération et de la différenciation des cellules (Olivier, 2003).

## 5 Hypothèses et objectif

Le cancer de la prostate est le cancer le plus diagnostiqué et le plus meurtrier chez l'homme. Les androgènes ont souvent été considérés comme responsables du développement du CaP. Cependant, leur rôle demeure énigmatique étant donné la récurrence malgré les traitements endocriniens. Ceci suggère l'existence de mécanismes androgéno-indépendants régulant la survie et la croissance des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses. Il a été rapporté, qu'outre les stéroïdes sexuels, les facteurs de croissance, les cytokines, les produits de sécrétion des cellules NE, jouent un rôle majeur dans cette pathologie en activant des molécules de signalisation qui induisent la croissance anarchique des cellules prostatiques indépendantes des androgènes. De ce fait, notre laboratoire s'est intéressé à identifier les protéines kinases impliquées dans le développement et la progression du CaP. Parmi celles-ci, Fer semble jouer un rôle prépondérant.

Le but principal de cette étude est donc de déterminer le rôle de Fer dans le cancer de la prostate. Cette recherche a été motivée par les raisons suivantes : 1) Fer est un produit d'oncogène ; 2) Fer est activée par différents facteurs de croissance ; 3) Fer est impliquée dans diverses fonctions dont la prolifération cellulaire ; 4) Fer est associée à la division des cellules prostatiques.

Afin de poursuivre notre étude du rôle de Fer dans le CaP et comprendre comment cette protéine peut exercer ses fonctions, nous avons eu recours à la

production de différents outils tels la production d'un nouvel anticorps et la fabrication de constructions moléculaires. Ces outils ont permis d'étudier, sa localisation dans les cellules et les tissus de la prostate, d'établir sa fonction dans la croissance des cellules prostatiques cancéreuses, d'identifier ses partenaires et de démontrer l'importance de son activité et de son activation dans les interactions avec ses partenaires et son implication dans certaines voies de signalisation.

Ces travaux, présentés sous forme d'articles et d'annexes, montrent que Fer est impliquée dans la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses. De plus, Fer se retrouve dans la voie de signalisation de l'IL-6 où elle semble jouer un rôle prépondérant dans la phosphorylation de STAT3. Dans cette voie, Fer s'associe avec gp130 de même que le récepteur des androgènes et la tyrosine kinase Lyn. En outre, Fer s'associe avec d'autres partenaires comme l'actine et la Cdc42 qui pourraient réguler le cytosquelette et le remodelage de la chromatine.

Par l'identification des partenaires de Fer dans le CaP et les modèles proposés, on peut mieux comprendre la relation entre Fer et cette pathologie invasive et même entrevoir son implication dans la progression du CaP de l'hormono-dépendance à l'hormono-indépendance.

Les outils produits et les résultats obtenus au cours de cette étude ouvrent la voie à de nouveaux projets de recherche qui pourraient évaluer l'implication de Fer dans l'activation du récepteur des androgènes et la relation de Fer avec l'actine nucléaire.

## II RESULTATS

Cette thèse comprend des études démontrent que:

- **Manuscrit I** : Fer est importante pour la prolifération et/ou la survie des cellules cancéreuses de la prostate. En effet, la surexpression des antisens dirigés contre Fer entraîne la réduction du taux de prolifération et abolit la tumorigénicité des cellules PC3 sans affecter les interactions cellule-cellule, cellule-matrice et la forme cellulaire.
- **Manuscrit II** : Fer est impliquée dans la voie de signalisation de l'IL-6, puisque la prolifération des PC3 et l'activation de Fer sont modulées par l'IL-6. Dans cette voie, Fer forme des complexes avec des partenaires tels gp130 et STAT3. Dans cette voie, Fer est considérée comme la protéine majeure pour l'activation de STAT3. Finalement, Fer est transloquée dans le noyau de pair avec STAT3. Ces observations ont été validées chez les patients atteints de CaP.
- **Annexe I** : Fer pourrait être impliquée dans la progression du CaP du stade hormono-dépendant au stade hormono-indépendant. En effet, Fer forme un complexe avec le récepteur des androgènes. De plus, le récepteur des androgènes est phosphorylé sur tyrosine et cette phosphorylation est modulée par l'IL-6.  

Fer interagit avec un quatrième partenaire que nous avons identifié, la tyrosine kinase Lyn. Celle-ci est aussi impliquée dans la voie de l'IL-6.
- **Manuscrit III** : Fer pourrait être impliquée dans une fonction au niveau de la chromatine. En effet, elle s'associe avec l'actine qui est aussi phosphorylée sur tyrosine. Cette phosphorylation fait intervenir Fer. De plus, l'accumulation de complexes Fer/actine nucléaires semble faire partie de la réponse des cellules cancéreuses au stress.
- **Annexe II** : Fer forme un complexe avec Cdc42 suggérant fortement une implication additionnelle de Fer au niveau de l'organisation de l'actine.

L'ensemble de ces données, couplées à des résultats complémentaires (antisens) montrent un rôle critique de Fer dans la survie et la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses. En plus de dévoiler un mécanisme potentiel pour la compréhension de la progression du CaP du stade hormono-dépendant au stade hormono-indépendant, nos données suggèrent aussi que Fer pourrait représenter un marqueur du CaP et potentiellement, une nouvelle cible thérapeutique.

## **1 Manuscrit I : Links Between Fer Tyrosine Kinase Expression Levels and Prostate Cell Proliferation.**

Allard P, Zoubeidi A, Nguyen LT, Tessier S, Tanguy S, Chevrette M, Aprikian A, Chevalier S.

(2000)

Mol Cell Endocrinol.;159(1-2):63-77.

### **Contribution des auteurs :**

Allard P : A réalisé les expériences présentées dans les figures 3B,4, 5, 6 et 7.

Zoubeidi A : A réalisé les expériences présentées dans les figures 2 et 3A.

Nguyen LT : A cloné fer canin présenté dans la figure 1.

Tessier S : A aidé pour l'immunisation des lapins pour la production de l'anticorps.

Tangay S : A fourni une aide technique dans le but d'évaluer le potentiel tumorigénique des antisens de fer chez les souris. Les résultats obtenus n'ont cependant pas été retenus dans la version finale de l'article.

Chevrette M : A aidé dans la conception des expériences de croissance en agar mou présentées dans la figure 6B.

Aprikian A : A fourni les tissus prostatiques.

Chevalier S : Directrice de recherche.

## Links between Fer tyrosine kinase expression levels and prostate cell proliferation<sup>☆</sup>

Pierre Allard<sup>a,c</sup>, Amina Zoubeidi<sup>a,c</sup>, Linh T. Nguyen<sup>a,c</sup>, Sylvain Tessier<sup>c</sup>,  
Simon Tanguay<sup>b,e</sup>, Mario Chevrette<sup>b,d,e</sup>, Armen Aprikian<sup>b,e</sup>, Simone Chevalier<sup>a,b,c,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

<sup>b</sup> Department of Surgery (Urology Division), McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1A4

<sup>c</sup> Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

<sup>d</sup> Department of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3A 1A3

<sup>e</sup> The Montreal General Hospital Research Institute, 1650 Cedar Avenue, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1A4

Received 4 August 1999; accepted 1 October 1999

### Abstract

In our cloning strategy to identify tyrosine kinases implicated in the regulation of prostate growth, the dog *fer* cDNA was obtained and shown to be highly homologous to known *fer* cDNAs. Using a polyclonal Fer antibody directed against a C-terminal peptide, we studied its associations with cortactin,  $\beta$ -catenin and p120Cas in human prostate carcinoma PC-3 cells. In contrast to previous reports, no interactions were observed. To assess its functional role, *fer* cDNA constructs were transfected in PC-3 cells. Antisense clones exhibiting a marked diminution of Fer expression had a reduced growth rate (doubling time of 29 vs. 42 h) and were unable to form colonies in soft agar. In agreement with these results, Fer protein expression was linked to human prostatic proliferative diseases, with enhanced levels in extracts from cancer tissues as compared to those from normal and hyperplastic ones, and was also expressed in the human prostate carcinoma cell lines DU145 and LNCaP. In the dog model, Fer expression was up-regulated in dividing versus resting prostate epithelial cells in vitro, and also in vivo when basal cell hyperplasia and metaplasia was induced by estrogen after castration. Minimal effects were observed when renewing the luminal epithelium with androgens. Taken together, these results show that Fer expression is associated with prostate cell proliferation and enhanced in prostate cancer. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Fer; Tyrosine kinase; Prostate cancer; Antisense RNA; Sex steroids

### 1. Introduction

Tyrosine kinases (TKs) are implicated in numerous signal transduction pathways, including those regulated by growth factors (Heldin, 1996). In most instances, TK activity is tightly modulated upon phosphorylation by other kinases and dephosphorylation by phosphatases (Wang, 1992; Fischer, 1993). The dysregulation of TK activity profoundly affects cell fate and causes abnormal cell proliferation. In this regard, TKs can act as oncogene products when overexpressed or

expressed as mutated forms of signalling molecules (Rodrigues and Park, 1994). It is therefore clear that TKs are important candidates to examine the understanding of mechanisms leading to abnormal cell proliferation such as cancer.

Over the years, our laboratory has been interested in the biology of human and dog prostate epithelial cells, due to their involvement in proliferative diseases of this gland (Bonkhoff, 1996; De Marzo et al., 1998) and to the high incidence of prostate carcinoma in North America and Europe (Black et al., 1997; Gaudette et al., 1998). We reported in the dog prostate model that basal epithelial cell hyperplasia and metaplasia is linked to enhanced tyrosine phosphorylation of proteins (Landry et al., 1996) and enhanced TK activity (Tessier et al., 1989; Allard et al., 1997), which are also elevated

<sup>☆</sup> This work was presented in part at the 1998 International Symposium on Biology of Prostate Growth, Bethesda, MA, USA

\* Corresponding author. Tel.: +1-514-937-6011 ext. 4616; fax: +1-514-934-8261.

in human prostate cancer cell lines (Durocher et al., 1989). To characterize activated TKs by molecular cloning, we established a cDNA library from proliferating prostatic epithelial basal cells in primary culture, which was screened with anti-phosphotyrosine (anti-pY) antibodies (Tremblay et al., 1996a). One of the clones corresponded to the canine *fer* cDNA, encoding a 94 kDa non-receptor tyrosine kinase whose structure is composed of a C-terminal catalytic domain, a SH2 domain and a N-terminal coiled-coil domain (Hao et al., 1989; Kim and Wong, 1995). It appears that Fer expression is rather ubiquitous as its TK activity was detected in many mice and human cell lines and chicken tissues (MacDonald et al., 1985; Feldman et al., 1986; Hao et al., 1989). Data from cell fractionation studies indicate a cytoplasmic and nuclear distribution of Fer in human cell lines (Hao et al., 1991). Moreover, there is an increased Fer distribution into the nucleus during the S-phase of the cell cycle through its nuclear localization signal mapped to residues 651–660 in the catalytic domain (Ben-Dor et al., 1999). The regulation of this translocation is also mediated by the coiled-coil domain and the ATP binding site, which could affect the structure of the protein (Ben-Dor et al., 1999).

The exact function of Fer is still unknown. Growth factors such as EGF and PDGF triggering signal transduction by their receptors activate Fer which then interacts with proteins such as cortactin and p120Cas, implicated in the reorganisation of the actin cytoskeleton (Kim and Wong, 1995, 1998). Also, as Fer interacts with  $\beta$ -catenin, this TK may be involved in the regulation of cell–cell adhesion (Rosato et al., 1998). In the nucleus, Fer could affect transcription, as it binds and phosphorylates a TATA element modulatory factor (Schwartz et al., 1998). Fer may also act as a proto-oncogene product, as supported by the observation that the *Drosophila Fer/Fes* homolog transforms avian and rodent cells when expressed from retroviral vectors (Paulson et al., 1997). In addition, the presence of a 51 kDa nuclear spliced variant of Fer, FERT, expressed in the rat testis only during specific stages of spermatogenesis, suggests that FERT may be involved in controlling meiotic division (Keshet et al., 1990).

Thus, we sought to determine a role for Fer in the highly tumorigenic human prostate carcinoma PC-3 cells by looking first at its phosphorylation and interactions with potential signalling proteins, using antibodies produced against the C-terminal portion of Fer. We then examined the effect of antisense Fer constructs on their growth properties. Finally, to evaluate the possibility of a link between Fer protein expression and prostate growth, we performed Western blotting studies on extracts from human and dog prostate cells and tissues.

## 2. Materials and methods

### 2.1. cDNA cloning

Procedures were as already described (Tremblay et al., 1996b). Briefly, messenger RNA from proliferating dog prostate epithelial cells was reverse transcribed to cDNA, packaged into  $\lambda$ gt22A DNA and transfected into DH5 $\alpha$  E.Coli. Following screening with anti-phosphotyrosine antibody (4G-10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), four positive clones were shown to encode the Fer kinase. The longest one (2947 bp) was sequenced entirely, analyzed, compared using the BLAST program and submitted to Genbank (Accession number: AF187884).

### 2.2. Southern blot analysis

Genomic DNA was isolated from dog prostate using the protocol from Sambrook et al. (1989). 50  $\mu$ g DNA samples were digested with the restriction enzymes BamHI, EcoRI or Hind III, size fractionated on a 1.0% agarose gel and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with a  $^{32}$ P-random prime-labeled EcoRI-KpnI fragment (950 bp) of the *fer* cDNA, specific for the coding region. Hybridization was done in buffer containing 5  $\times$  Denhardt's solution, 4  $\times$  SSC, 0.5% SDS, 20 mM Tris–HCl (pH 7.4) and 100  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA for 14 h at 50°C. Membranes were then washed twice for 30 min (1  $\times$  SSC, 0.1% SDS at 65°C) and submitted to autoradiography.

### 2.3. Antibody production and purification

A peptide corresponding to the C-terminal 13 amino acids was chemically coupled to a polylysine core during synthesis (Biotechnology Research Institute, Montreal, Qc, Canada). For immunization, 1 mg of peptide was emulsified in complete Freund adjuvant and injected subcutaneously on the back of female rabbits. Two boosts with incomplete Freund adjuvant were done at two weeks intervals. The immune response was monitored by ELISA, and rabbits were sacrificed after eight weeks.

Specific immunoglobulins to the Fer-peptide were then purified from the immune serum over a protein-A agarose column followed by an affinity column, consisting of the immunizing peptide coupled to a reacti-gel activated resin (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer instructions. Purified antibodies were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  in 20 mM Tris–HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 50% glycerol. Control immunoglobulins from the pre-immune rabbit serum were also purified on protein-A agarose column.

#### 2.4. Expression and purification of mycHis-tagged Fer protein

The mycHis-tagged Fer protein was produced by amplifying by PCR the complete coding sequence of *fer* with the 5' primer 5'-CTACCGGATCCGCCGCCGC-CATGGGGTTTGGGAGTGACC-3' and the 3' primer 5'-CCGGTAGGGTAGTCTAGACTGTGTGACTTT-CTTCTTGATGA-3', carrying BamHI and XbaI restriction sites, respectively. The PCR product was then digested with BamHI and XbaI, submitted to electrophoresis, extracted from the gel, and inserted with the same restriction enzymes into the pcDNA3-mycHis expression vector (gift from Dr Y. Durocher, Montreal, Qc, Canada). The amplified product was sequenced entirely to ensure that no mutation occurred during PCR. The pcDNA3-mycHis construct was then transfected with lipofectin (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) into the 293 human kidney fibroblast cell line (gift from Dr Y. Durocher).

Purification of the tagged protein was done on Ni-NTA column (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) according to manufacturer instructions. To verify if it was active, mock and transfected 293 cells were resuspended in ice-cold buffer (50 mM Na-phosphate pH 8.0 and 300 mM NaCl), sonicated and cleared by centrifugation. Extracts were loaded onto the Ni-NTA column and washed with the same buffer supplemented with 10% glycerol. Bound proteins were eluted with a gradient of 0–0.5 M imidazole in wash buffer. Purified extracts were submitted to *in vitro* phosphorylation assays by incubating 15 min at 25°C in phosphorylation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.7, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol) in the presence or absence of 500 μM ATP. Preparations were then submitted to electrophoresis and analysed by Western blot with anti-phosphotyrosine antibody as described in a next section.

#### 2.5. Dog and human prostate epithelial cells and tissues

Dog prostate cells were isolated by collagenase dispersion as already described (Chevalier et al., 1981). Epithelial cells were then either isolated by Percoll gradient or cultured in primary monolayers in conditions favoring adhesion of nonsecretory epithelial cells and used after three days, a time period where they actively synthesize DNA (Chevalier et al., 1981). Hormonal manipulations in dogs were performed as already described (Chevalier et al., 1990; Allard et al., 1997) and confirmed by histological examinations. Briefly, following a four week castration period, animals were injected with estrogens (17β-estradiol 17-cyclopentylpropionate) to induce basal cell hyperplasia and metaplasia ( $n = 4$ ), or androgens (5α-androstane-3α, 17β-diol) to renew the secretory epithelium ( $n = 3$ )

(Merk et al., 1982). Normal dog prostates ( $n = 3$ ) were used as controls. Prostates from normal and androgen-treated castrated dogs are characterized by a low proliferative index (Barrack and Berry, 1987) correlated by low levels of tyrosine phosphorylated proteins and TK activity (Landry et al., 1996; Allard et al., 1997), whereas prostate from estrogen-treated castrated dogs have high proliferative index correlated with high levels of tyrosine phosphorylated proteins and TK activity present in basal epithelial cells (Tessier et al., 1989).

The human prostatic carcinoma cells, PC-3, DU145, and LNCaP ( $n = 6$ , for each line) were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and used when reaching 70% confluency. Hyperplastic ( $n = 7$ ) and malignant ( $n = 10$ ) human prostate tissues were obtained from patients undergoing transurethral resections, whereas normal prostates ( $n = 4$ ) were obtained from autopsies (within 8 h post-mortem) of men under 50 years old. All tissues were snap-frozen in liquid nitrogen upon retrieval. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from areas adjacent to frozen tissues were submitted to histological evaluation to ensure classification and, in general, revealed similar contributions of cancer, normal epithelial and stromal cells in individual categories.

To obtain prostatic tissue extracts, minces were homogenized at 4°C with a Polytron in solubilization buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 1% nonidet P-40 and 10 μg/ml aprotinin. In most instances, cultured cells were directly solubilized in the same buffer by scraping. All preparations were then incubated for 1 h at 4°C with agitation, centrifuged at 10000 × *g* for 10 min and supernatants kept at –80°C until use. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

#### 2.6. Cellular fractionation

This procedure was from Storrie and Madden (1990) and was reported to give 95–100% pure nucleus preparations. Briefly, cells in monolayer were washed in ice-cold PBS and scraped in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 1 mM PMSF and 10 μg/ml aprotinin). They were then homogenized with 25 strokes in a Dounce homogenizer and centrifuged at 1000 × *g* for 5 min. The nuclear pellet was washed once with 10 volumes of hypotonic buffer, once with hypotonic buffer containing 1% Triton X-100, and again in hypotonic buffer. Purified nucleus were then swelled in hypotonic buffer supplemented with 250 mM KCl, and recovered by centrifugation. The supernatant of the 1000 × *g* centrifugation,



was centrifuged at  $10\,000 \times g$  for 15 min, yielding a C10 000 pellet. Then, 250 mM KCl was added to the supernatant, and recentrifuged at  $150\,000 \times g$  for 1 h. The resulting pellet and supernatant corresponded to the membrane and cytosolic fractions, respectively.

### 2.7. Western blotting and immunoprecipitations

All procedures were carried out at 4°C. Prostatic tissue extracts (human and dog) were pre-cleared for 30 min with protein-G sepharose (25 ml) and centrifuged before being submitted to SDS-PAGE using 20–30 µg protein/lane. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes and incubated for 1 h with 5% skim milk in TTBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20). They were then probed with anti-Fer antibodies (0.1 µg/ml) in TTBS containing 1% skim milk. To assess specificity, the immunizing peptide (50 µg/ml) was added along with the antibody. Some blots were also probed with monoclonal antibodies directed against Src mab327 (1/1000 dilution, Oncogene Research Products, Cambridge, MA), myc (1/5000 dilution, Invitrogen, San Diego, CA), β-catenin (1/1000 dilution, Transduction Laboratories, Lexington, KY), focal adhesion kinase (1 µg/ml), p120Cas (2B12, 1/500 dilution) or cortactin (4F11, 1/1000 dilution) (the latter all from Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Following washes, membranes were incubated with corresponding secondary goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies coupled to horseradish peroxidase. Immunodetection was achieved with the enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagent (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, England). The levels of Fer were evaluated by densitometric scanning of films through the use of a Sci Scan 500 (USB, Cleveland, OH) and compared using the one-tailed unpaired modified *t*-test for small sampling. Differences were considered to be significant at a *P* value of less than 0.05.

For immunoprecipitations, cells were lysed in immunoprecipitation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% nonidet P-40 and 10 µg/ml aprotinin). In some instances, this buffer was supplemented with 1% sodium deoxycholate/0.1% SDS for β-catenin immunoprecipitations, while nonidet P-40 was omitted for cortactin immunoprecipitations. All extracts were cleared by centrifugation and left untreated or immunoprecipitated overnight with 2–4 µg of pre-immune antibodies (mouse or rabbit), 4 µg of anti-phosphotyrosine (anti-pY) antibodies (4G-10, Upstate Biotechnology), or 2 µg of anti-Fer, anti-Cas, anti-cortactin or anti-β-catenin antibodies. Immune complexes were recovered by incubation with 50 µl of protein-G sepharose and centrifugation, followed by washes in the same immunoprecipitation buffer used for lysis. They were then

submitted to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and used for Western blotting.

### 2.8. Plasmid construction and transfection into PC-3 cells

To construct Fer expression plasmids, an EcoRI fragment (420 bp) of the *fer* cDNA corresponding to the 5' of the coding region was inserted into the EcoRI site of the pcDNA3 vector (Invitrogen). The insertions in the sense (pcDNA3-ferS) or antisense (pcDNA3-ferAS) orientation was determined by NsiI digestion and fragments were analyzed by electrophoresis (7% polyacrylamide gel). The transcription of the cDNA is under the control of the cytomegalovirus promoter and contains the neomycin phosphotransferase gene for G418 selection.

For transfections, PC-3 cells were grown in 6-well plates until 60–70% confluency in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum. Medium was then changed for fresh RPMI without serum and containing 5 µg pcDNA3-ferS or pcDNA3-ferAS and 25 µl lipofectin according to the manufacturer instructions. After 6 h of incubation, the medium was changed for fresh RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and cells were grown for 2 days. They were then trypsinized, plated onto 100 mm dishes and the G418 concentration (100 µg/ml) was gradually increased up to 800 µg/ml by doubling the concentration every day. Medium was changed every 3 days and 2–3 weeks later, twenty G418-resistant colonies from pcDNA3-ferS and pcDNA3-ferAS transfected cells were isolated and expanded. After 2–3 weeks, an aliquot of each clone was frozen in liquid nitrogen. All antisense and seven sense clones were analyzed for Fer expression by Western blotting.

### 2.9. PCR of genomic DNA

Genomic DNA from PC-3 cells and derived sense and antisense clones was isolated according to Sambrook et al. (1989). Primers for PCR were designed so as to amplify specifically *fer* in the antisense orientation. The first primer 5'-AGTGTGATGGATATCTGCAG-3' hybridizes with the pcDNA3 vector, immediately downstream from the EcoRI site where the 420 bp Fer fragment was inserted. The second primer 5'-ACCTTGATCATTTCCGCCTC-3' hybridizes with the 677–696 bp region of the canine *fer* cDNA, present in the 420 bp insert. PCR reactions were carried out by adding 1 U Taq DNA polymerase to 1 × PCR buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 1 mM of each primer and 1 µg genomic DNA, and processed under the following conditions: 94°C for 3 min and then 94°C for 1 min and 65°C for 2 min for 35 cycles. An aliquot was then run on a 1% agarose gel,

stained with ethidium bromide and the gel was photographed. The specificity of the resulting 383 bp PCR product was first determined using pcDNA3-ferAS and pcDNA3-ferS vectors, as positive and negative controls respectively (not shown).

### 2.10. Growth assays

Cell proliferation in monolayers of parental PC-3, three sense and eight selected antisense transfected clones was measured by plating 5000 cells in 24-well plates in conditions previously described. Cell number was determined every 2 days for a period of 8 days by trypsinisation and cell counting under an hemacytometer. Viability was assessed by staining with Trypan blue.

To measure anchorage-independent growth, the colony formation assay in soft agar was used as described by Rizzino (1987). Briefly,  $1 \times 10^4$  cells were plated in triplicate onto 60 mm dishes in RPMI containing 10% fetal bovine serum and 0.3% soft agar, and were allowed to grow for 3 weeks. Plates were then incubated overnight with 1 ml of a 1 mg/ml MTT (Sigma, Oakville, On, Canada) solution to stain viable cells, examined under microscope and photographed.

## 3. Results

### 3.1. Cloning of the canine *fer* cDNA

In order to characterize TKs that could play a role in prostate cell proliferation, we established a cDNA expression library using mRNA from proliferating canine prostate non-secretory epithelial cells in primary culture (Chevalier et al., 1990; Tremblay et al., 1996b). Among the four *fer* cDNA clones isolated after screening with an anti-pY antibody, the longest one (2947 bp) was entirely sequenced (Accession number: AF187884). The putative initiation codon was located at the 314 bp position and the termination codon at 2785 bp of the cDNA (Fig. 1A). The cDNA encodes a 823 amino acid protein, for an estimated size of 94 700 Da. At the amino acid level, the canine Fer protein was highly homologous to its human and rat counterparts with 95% identity (Letwin et al., 1987; Hao et al., 1989). However, it presented an additional amino acid at the C-terminus end (Fig. 1B). Characteristic sequences of tyrosine kinases were found, such as the consensus sequence for ATP binding Gly-X-Gly-X-X-Gly-X<sub>15</sub>-Lys (position 571–592) and the putative autophosphorylation site (Tyr-714), both also located at identical positions in rat and human Fer proteins. The SH2 and coiled-coil domains implicated in protein–protein interaction, which were previously characterized in the human protein, were also present in the canine Fer.

Southern blot analysis was performed on canine DNA to verify if more than one *fer* gene was present. Numerous bands were detected following digestion with restriction enzymes, with major ones at 9, 10 and 16 kb for BamHI; 4.8, 7.7 and 15 kb for EcoRI and 3.6, 4.3 and 14 kb for HindIII (not shown).

### 3.2. Characterization of Fer antibodies

In order to study proteins interacting with Fer and its expression level in relation to prostate cell growth, we produced anti-Fer antibodies. A synthetic peptide corresponding to the last 13 amino acids in the C-terminus tail of the canine Fer sequence (bold in Fig. 1B), was selected for immunization. This peptide is 100% homologous (75% identical) to the human Fer counterpart for the first 12 amino acids and is unrelated to the human Fes protein (33% identity, 50% homology), the only other known member of the Fer family (Hao et al., 1989). It is also unrelated to other proteins in the database.

Specific immunoglobulins against the Fer peptide were purified and their specificity against the Fer protein was ascertained by producing into 293 cells the recombinant canine Fer protein tagged with a mycHis epitope. Western blotting on whole cell lysates with an anti-myc antibody revealed a single band of the expected size at 94 kDa (Fig. 2, left panel). When the extract was submitted to immunoprecipitation, either with anti-Fer or pre-immune immunoglobulins, followed by anti-myc detection, a specific band of 94 kDa was detected only in the Fer immunoprecipitate. These data indicate that the antibody can immunoprecipitate Fer. The canine *fer* cDNA was also shown to encode an active tyrosine kinase as the purified mycHis tagged Fer protein had the ability to autophosphorylate on tyrosine when submitted to in vitro kinase assay (Fig. 2, right panel).

We next looked at Fer expression in the human prostatic carcinoma PC-3 cell line. Fig. 3A shows by Western blot that the antibody reacted strongly against a 94 kDa protein, along with other proteins at 110, 60 and 50 kDa, and fainter ones of 90 and 55 kDa. These bands were specific to the immunizing peptide as none was detected when the antibody was pre-incubated with 50 µg/ml of peptide or when pre-immune immunoglobulins were used (not shown).

Since Fer is a tyrosine phosphorylated protein (Hao et al., 1989), we then examined if the 94 kDa band was recovered among proteins immunoprecipitated with an anti-pY antibody in PC-3 cells. After immunoprecipitation, anti-Fer antibodies reacted with a major band at 94 kDa, which was not detected in control immunoprecipitates. To further characterize the 94 kDa protein detected with this antibody in PC-3 cells, we examined its distribution by subcellular fractionation. Fig. 3B

shows that the 94 kDa band was mainly observed in the cytoplasmic ( $37 \pm 27\%$ ) and nuclear ( $42 \pm 25\%$ ) fractions, a finding which is in agreement with the distribution of Fer in other cell lines (Hao et al., 1991). Altogether, these data indicate that the anti-Fer antibody immunoprecipitated the 94 kDa Fer protein and recognized it in Western blot.

### 3.3. Functional role of Fer in PC-3 cells

To get insight into the role of Fer in PC-3 cells, we looked at proteins described in other cell types that associate constitutively and co-immunoprecipitate with the 94 kDa Fer protein. Fig. 4A shows that Fer was not associated with p120Cas by doing immunoprecipitation

```

1
5 ACTCACTTCCCACCAAATTCTTTGGGTGAAGGCGCTCCTGAACCACCCTCCCTGGAGGA
65 GCCAGCCGGTCGGGGTGGGCGCGCGCACCCGGCCTGGAAAGAGCTCCTGTTTTCTGGCC
125 AGACCTGTGGTCGTTCCAGTGAGACTCACTGCACATTTTCTCAAGGGTCTTCTCATCCCC
185 TAATGTGTAATCCTTCAACATGGACCTGCTGCTTTAGCTAAGACATGACCAGCAATGAAC
245 AGTAGTAAGATATGTGCTGATTAGAAGGCTCACAGCGCAGTGTGGAGGATAAGACAGTGC

305 CTTACAAAAATGGGGTTTGGGAGTGACCTGAAGAATTCACATGAAGCTGTGCTAAAATTG
1 M G F G S D L K N S H E A V L K L

365 CAAGACTGGGAATTACGGTTACTGAAACAGTGAAGAAATTTATGGCCCTGAGAATAAAA
18 Q D W E L R L L E T V K K F M A L R I K

425 AGTGATAAAGAATATGCATCTACTTTACAGAACCTTTGTAATCAAGTTGATAAGGAAAGT
38 S D K E Y A S T L Q N L C N Q V D K E S

485 ACTGTTCAAATGAATTATGTCAGCAATGTATCCAAGTCTTGGCTACTTATGATTCAGCAA
58 T V Q M N Y V S N V S K S W L L M I Q Q

545 ACAGAACAACCTTAGCAGAATCATGAAGACACATGCAGAGGACCTAAATTCTGGACCCTTA
78 T E Q L S R I M K T H A E D L N S G P L

605 CACAGGCTCACCATGATGATCAAAGACAAGCAGCAGGTGAAGAAAAGTTTTATAGGTGTT
98 H R L T M M I K D K Q Q V K K S F I G V

665 CATCAGCAGATAGAGCGGAAATGATCAAGGTTACAAAGACAGAATTAGAGAAATTA AAA
118 H Q Q I E A E M I K V T K T E L E K L K

725 TCCAGCTATAGACAGTTAATAAAAAGAAATGAATCTGCCAAAGAGAAATATAAAGAAGCT
133 S S Y R Q L I K E M N S A K E K Y K E A

785 TTAGCTAAAGGGAAAGAAACCGAAAAGGCCAAGGAACGATATGACAAAGCGACAATGAAA
158 L A K G K E T E K A K E R Y D K A T M K

845 CTTTCATGTATTGCATAATCAGTATGTATTGGCACTGAAAGGGGCACAGCTTCATCAGAAT
178 L H V L H N Q Y V L A L K G A Q L H Q N

905 CAGTATTATGACACCACACTTCTTTGCTTCTGGACTCTCTTCAGAAGATGCAAGAAGAA
198 Q Y Y D T T L P L L L D S L Q K M Q E E

965 ATGATAAAAGCACTAAAAGGTATATTTGATGAATACAGCCAGATAACCAAGTCTCGTTACA
218 M I K A L K G I F D E Y S Q I T S L V T

1025 GAGGAAATAGTGAATGTCCATAAAGAGATTCAAATGTCAGTTGAACAGATAGACCCTAGC
238 E E I V N V H K E I Q M S V E Q I D P S

1085 ACAGAATATAATAATTTTCATAGATGTTACAGAACAACGGCTGCTAAAGAGCAAGAAATT
258 T E Y N N F I D V H R T T A A K E Q E I

1145 GAGTTTGATACTTCCTTACTAGAAGAAAATGAAAATCTTCAGGCAAATGAAATTATGTGG
278 E F D T S L L E E N E N L Q A N E I M W

1205 AATAATTTAACAGCAGAAAGTTTGCAAGTAATGTTGAAAACCTTAGCAGAGGAACTTATA
298 N N L T A E S L Q V M L K T L A E E L I

```

Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequence analysis of *fer*. Sequence of the canine *fer* cDNA (A) and comparison at the amino acid level with human and rat (partial sequence) counterparts (B). The amino acids in bold in the C-terminus of the canine Fer protein refer to the synthetic peptide used for immunization of rabbits to produce antibodies.

1265 CAGACACAGCAGATGCTTGTAACAAGGAGGAGGCTGTCCTGGAGCTAGAGAAGAGAATT  
 318 Q T Q Q M L V N K E E A V L E L E K R I  
 1325 GAGGAGTCCTCTAAGACCTGTGAAAAGAAGTCTGATATTGTGCTTCTGCTAAGCCAAAA  
 338 E E S S K T C E K K S D I V L L L S Q K  
 1385 CAGACACTAGAAGAGCTGAAACAGTCAGTCCAGCAGCTGAGATGCACTGAGGCAAAGTTT  
 358 Q T L E E L K Q S V Q Q L R C T E A K F  
 1445 ACAGCACAGAAAGAATTACTAGAGCAAAAAGTACAAGAAAATGAAGGGAAAGGCCACCT  
 378 T A Q K E L L E Q K V Q E N E G K E P P  
 1505 CCAGTAGTGAATTATGAAGAAGATGCACGATCAGTTACATCTATGGAAAGAAAGGAGAGG  
 398 P V V N Y E E D A R S V T S M E R K E R  
 1565 CTATCCAAATTTGAGTCCATCCGTCATTCAATTGCTGGAATAATTAGGTCTCCAAAGTCT  
 418 L S K F E S I R H S I A G I I R S P K S  
 1625 GCCTGGGCTCTTCAACATTCTCTGATACGATCCCCATAAGTGAGAAGCCCTTGGCAGAA  
 438 A L G S S T F S D T I P I S E K P L A E  
 1685 CAGGACTGGTACCACGGTGCAATTCACAGAATAGAAGCGCAAGATCTATTAACAACAA  
 458 Q D W Y H G A I P R I E A Q D L L K Q Q  
 1745 GGAGACTTCTTGGTGCAGAGAGTCAATGGGAAACCTGGTGAATATGTCCTTTCTGTATAT  
 478 G D F L V R E S H G K P G E Y V L S V Y  
 1805 TCTGATGGACAAAGGAGACACTTTATCATACAATTTGTTGATAATCTATATCGATTGAA  
 498 S D G Q R R H F I I Q F V D N L Y R F E  
 1865 GGCCTGGTTTTTCAAACATTCTCACTTATAGATCATCACTATAACAACAAACAGGTC  
 518 G T G F S N I P Q L I D H H Y T T K Q V  
 1925 ATCACTAAGAAGTCAGGTGTAGTTCTGCTGAATCCTATTCCTAAGGATAAGAAATGGGTT  
 538 I T K K S G V V L L N P I P K D K K W V  
 1985 CTCAATCACGAAGATGTCACATTGGGAGAATTACTGGCAAGGGGAATTTTGGTGAAGTA  
 558 L N H E D V T L G E L L G K G N F G E V  
 2045 TATAAGGGCATATTAAGGATAAAACTGCTGTTGCTGTTAAACATGTAAAGAAGATCTT  
 578 Y K G I L K D K T A V A V K T C K E D L  
 2105 CCTCAGGAACAGAAATAAAATTTTACAAGAAGCCAAAATTTCTCAAGCAATACGATCAT  
 598 P Q E L K I K F L Q E A K I L K Q Y D H  
 2165 CCCAATATTGTCAAACCTTATAGGCGTTTGCACACAAAGACAGCCTATCTACATCATTATG  
 618 P N I V K L I G V C T Q R Q P I Y I I M  
 2225 GAACTGGTCCAGGAGGTGATTTCTGTCCTTTCTGAGAAAGAAGAAGGATGAAATAAAA  
 638 E L V P G G D F L S F L R K K K D E I K  
 2285 CTCAAACAATTAGTGAAGTTTTTCATTAGATGCTGCTTCTGGTATGTCCTATCTCGAGAGT  
 658 L K Q L V K F S L D A A S G M S Y L E S  
 2345 AAAAAGTGTATACACAGGGATCTGGCTGCAAGAAACTGCCTGGTAGGTGAAAATAACGTT  
 678 K N C I H R D L A A R N C L V G E N N V  
 2405 CTGAAAATCAGTGACTTTGGAATGTCTCGTCAAGAGGATGGTGGAGTGTATTTCATCTTCT  
 698 L K I S D F G M S R Q E D G G V Y S S S

Fig. 1. (Continued)

with anti-Cas antibodies and immunodetection with anti-Fer antibodies, or the reverse experiment. It is noteworthy that PC-3 cells contained low levels of p120Cas, detected only after immunoprecipitation.

Similarly, and as shown in Fig. 4B and C, no specific interaction was detected between Fer and  $\beta$ -catenin and cortactin. Western blotting with  $\beta$ -catenin antibody did show a protein band in Fer immunoprecipitates, but

not in the reverse experiment. However, a lack of specificity was observed as  $\beta$ -catenin was also detected in control immunoprecipitates with rabbit immunoglobulins purified from pre-immune serum or from commercial sources. In addition, a pre-clearing step with pre-immune immunoglobulins (not shown) and increasing the stringency of the immunoprecipitation buffer (by adding 0.1% SDS and 1% sodium deoxycholate) still resulted in non-specific immunoprecipitation of  $\beta$ -catenin. For cortactin, the interaction was also non-specific as it was seen both in the pre-immune and cortactin immunoprecipitates in the absence of the detergent in immunoprecipitation buffer. No bands were detected when immunoprecipitating Fer and blotting against cortactin.

To determine the importance of Fer expression in PC-3 cells, we then used an antisense strategy to reduce its levels. A 420 bp fragment of the coding region of the canine *fer* cDNA was cloned in the sense orientation as a control, or in the antisense orientation, into the pcDNA3 expression vector. Seven control sense and twenty antisense transfectants were analyzed. They showed no evident morphological differences, except for clones AS-B3 and AS-C3 for which cells were more elongated (Fig. 5A) and, together with clone AS-B1, seemed to grow less rapidly. We next carried on the characterization of these antisense transfectants and examined if they had correctly integrated the antisense DNA. Fig. 5B shows amplification from genomic DNA of a 383 bp fragment corresponding to a portion of the antisense *fer* cDNA construct in all antisense selected clones, but not in the sense transfected clone or parental PC-3 cells. When Fer protein levels were ana-

lyzed by Western blotting (Fig. 5B, lower panel), a 30% reduction of expression was observed for clone AS-B1 and 70% for clones AS-B3 and AS-C3 in comparison to the parental PC-3 cells and the seven sense transfected clones, as illustrated by clone S-A2. The Fer expression level also remained unchanged in all other antisense clones analyzed (not shown). The levels of the other bands detected by the anti-Fer antibody were unaltered, with the exception of the faint 90 kDa band, immediately under the Fer band, whose expression pattern was reduced similarly to Fer. The expression of p120Cas, cortactin and  $\beta$ -catenin, as well as the previously studied p60Src and focal adhesion kinase (Atfi et al., 1994; Tremblay et al., 1996a) were not significantly affected in all clones (not shown).

To ascertain the extent of alteration in growth properties of PC-3 transfectants, we next determined their proliferative rate in monolayer and in soft agar. As shown in Fig. 6A, the rate of cell proliferation was largely decreased in clones exhibiting the strongest reduction of Fer expression. In comparison to parental PC-3 cells and the S-A2 clone, which had comparable doubling time (respectively  $29 \pm 3$  h and  $31 \pm 2$  h), the clone AS-B1 had a statistically significant ( $P < 0.05$ ) longer doubling time of  $35 \pm 4$  h, which was extended to  $42 \pm 4$  h for both AS-B3 and AS-C3 clones ( $P < 0.01$ ). Other sense transfected clones also presented growth rates similar to the controls (not shown). This difference in growth was also seen when colony formation was assessed in soft agar (Fig. 6B). Indeed, while PC-3 cells and the sense transfected clone S-A2 formed numerous colonies, fewer were seen with clone AS-B1 and none with clones AS-B3 and AS-C3. These results

```

2465 GGCTTAAAGCAGATTCCCATTAATGGACAGCACCAGAAGCTCTTAATTATGGGAGATAC
718 G L K Q I P I K W T A P E A L N Y G R Y

2525 AGTTCTGAGAGCGACGTGTGGAGCTTCGGCATCCTCCTCTGGGAGACCTTCAGCTTAGGA
738 S S E S D V W S F G I L L W E T F S L G

2585 GTGTGCCCTACCCCGGAATGACAAATCAGCAGGGCAGCGAGCAAGTGGAAAGAGGGTAC
758 V C P Y P G M T N Q Q A T E Q V E R G Y

2645 CGAATATCAGCCCCCAGCATTGCCAGAGGACATTTTAAATATGATGAAGTGTGG
778 R I S A P Q H C P E D I F K I M M K C W

2705 GATTATAAACCTGAAAACCGCCCAAGTTCAGTGAACCTTCAGAAAGAGCTCACGGTCATC
798 D Y K P E N R P K F S E L Q K E L T V I

2765 AAGAAGAAAGTCACACAGTGACGGAGCAGTGCCAACCGCCTCCGGGACCTGGGCGTCTGG
818 K K K V T Q *

2825 CAGAGTGACATCGTTCTCCCGCTAACAATGAGTTTATACCACATTACCTGCAACAGTCT
2885 TCTAAGGTGATTTTTGTTATTAAGTGTGTTTGTGTTTGTGTTTAAAGTATGTGCCACT
2945 CAC

```

Fig. 1. (Continued)

Fer (dog) 1	MGFGSDLKNS	HEAVLKLQDW	ELRLLETVKK	FMALRIKRDK	EYASTLQNLCS
Fer (human)	M...			S	
Fer (dog) 51	NQVDKESTVQ	MNYVSNVSKS	WLLMIQQTEQ	LSRIMKTHAE	DLNSGPLHRL
Fer (human)					
Fer (dog) 101	TMMIKDKQQV	KKSFIGVHQQ	IEAEMIKVTK	TELEKLGSSY	RQLIKEMNSA
Fer (human)		Y		C	
Fer (dog) 151	KEKYKEALAK	GKETEKAKER	YDKATMKLHV	LHNQYVLALK	GAQLHQNQYY
Fer (human)				M	
Fer (dog) 201	DTTLPPLLLDS	LQKMQEEMIK	ALKGIFDEYS	QITSLVTEEI	VNVHKEIQMS
Fer (human)	I				
Fer (dog) 251	VEQIDPSTEY	NNFIDIHRTT	AAKEQEIEFD	SSLLEENENL	QANEIMWNNL
Fer (human)		V		T	
Fer (dog) 301	TAESLQVMLK	TLAEELIQTQ	QMLVNKEEAV	LELEKRIEES	SKTCEKKSDEI
Fer (human)		M	L		E
Fer (dog) 351	VLLLSQKQTL	EELKQSVQQL	RCTEAKFTAQ	KELLEQKVQE	NEGKEPPFVV
Fer (human)	A		S		D
Fer (dog) 401	NYEEDARSVT	SMERKERLSK	FESIRHSIAG	IIRSPKSALG	SSTFSDTIPI
Fer (human)				V	AL MS
Fer (dog) 451	SEKPLAEQDW	YHGAIPRIEA	QDLLKQQLDF	LVRESHGKPG	EYVLSVYSYG
Fer (human)			E K G		
Fer (rat)					(TRUNCATED CLONE)R
Fer (dog) 501	QRRHFIIQFV	DNLYRFEGTG	FSNIPQLIDH	HYTTKQVITN	NSGVVVLNPI
Fer (human)		Y M			K K L
Fer (rat)				FN	K K L
Fer (dog) 551	PKDKKWILSH	EDVTLGELLG	KGNFGEVYKG	ILKDKTAVAV	KTCKEDLPQE
Fer (human)		I		T S	
Fer (rat)		V N S		T P	
Fer (dog) 601	LKIKFLQEAK	ILKQYDHPNI	VKLIGVCTQR	QPIYIIMELV	PGGDFLSFLR
Fer (human)				V S T	
Fer (rat)				V	
Fer (dog) 651	KKKDEIKLKQ	LVKFSLDAAS	GMSYLESKNC	IHRDLAARNC	LVGENNVLKI
Fer (human)	R L		A L		
Fer (rat)	R L		V A L		T
Fer (dog) 701	SDFGMSRQED	GGVYSSGLK	QIPIKWTAPE	ALNYGRYSSE	SDVWSFGILL
Fer (human)					
Fer (rat)					
Fer (dog) 751	WETFSLGVCP	YPGMTNQAR	EQVERGYRIS	APQHCPEDIF	KIMMKCWDYK
Fer (human)				M S	
Fer (rat)				M N E T	
Fer (dog) 801		PENREKFSSEL	QKELTVIKKK	VTQ	
Fer (human)		P		I R L -	
Fer (rat)		P D H	A	I -	

Fig. 1. (Continued)

were highly reproducible and differences in growth of antisense transfectants persisted after several cycles of culture. Taken together, these findings highly suggest that Fer is a functional protein linked to PC-3 cell

proliferation. The correlation between reduced expression and growth, both in monolayer and soft agar, also supports a role in pathways independent of cell adhesion or spreading.

### 3.4. Regulation of *Fer* expression in dog and human prostates

The above findings showing a correlation between *Fer* protein expression and PC-3 cell growth prompted us to verify if such correlations existed *in vitro* and *in vivo* in well characterized dog prostate models, and in human prostatic tissues and other Pca cell lines. We first studied freshly isolated dog prostate epithelial cells in the resting state, in comparison to corresponding cells synthesizing DNA once cultured in monolayers (Chevalier et al., 1981; Nguyen et al., 1996). The latter cells were also used to establish the cDNA library from which *fer* was obtained. As seen in Fig. 7A, *Fer* protein expression, as determined by Western blotting, could only be detected in dividing cells. We then analyzed *Fer* protein expression in the *in vivo* model, using extracts from normal dog prostates (N) and from prostates of castrated dogs supplemented with androgens (C + A) to restore the differentiated epithelium or supplemented with estrogens (C + E) to induce basal cell hyperplasia and metaplasia. As shown in Fig. 7B, *Fer* was not detected in prostate extracts from intact dogs, in agreement with the lack of expression in freshly isolated dog prostate epithelial cells. It was present at low levels in extracts from castrated dogs supplemented with androgens. A 20-fold upregulation was observed following castration and estrogen treatment, which was statistically higher ( $P < 0.001$ ) than in androgen-treated animals.

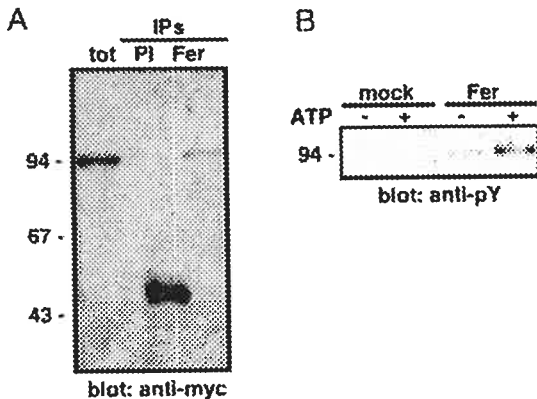


Fig. 2. Characterization of *Fer* antibodies. A mycHis-tagged recombinant *Fer* protein was expressed into 293 fibroblasts. (A) Total extracts (tot) and immunoprecipitates (IPs) with pre-immune (PI) or anti-*Fer* (Fer) immunoglobulins were fractionated by SDS-PAGE, and the mycHis-tagged protein detected by probing with an anti-myc antibody. (B) Extracts from 293 cells transfected either with the mycHis-tagged *Fer* cDNA (Fer) or empty vector (mock) were passed over a Ni-NTA affinity column. Purified preparations were then submitted to autophosphorylation assays with (+) or without (-) ATP, electrophoresed, transferred onto nitrocellulose membranes and blotted with anti-pY antibodies. Molecular weight standards in kDa are shown on the left side.

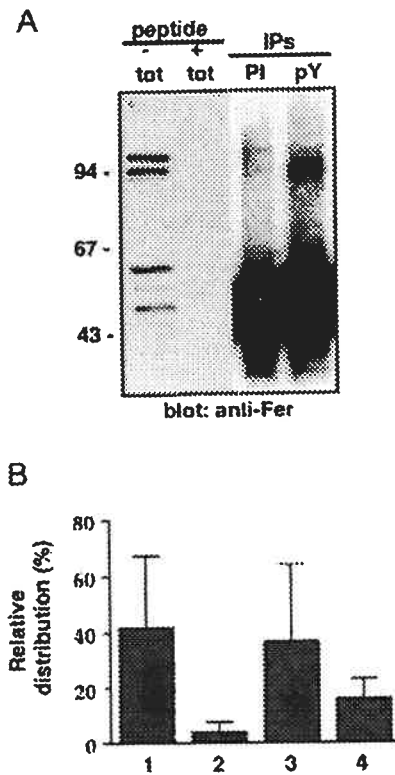


Fig. 3. *Fer* protein expression, phosphorylation and distribution in PC-3 cells. (A) Immunodetection with anti-*Fer* antibodies of total extracts (tot) from PC-3 cells and immunoprecipitates (IPs) with either pre-immune immunoglobulins (PI) or anti-phosphotyrosine (pY) antibodies. To attest specificity, a displacement study (+ peptide) was made by incubating the antibodies with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the immunizing peptide. (B) The distribution of *Fer* in PC-3 cells was assessed by differential centrifugation to obtain nuclear (1), C10000 pellet (2), cytoplasmic (3) and membrane (4) fractions which were analyzed by Western blot. Histograms represent the relative distribution of *Fer* as percentage in each fraction as determined by scanning of six cell preparations, and calculated according to the total proteins within each fraction.

*Fer* protein levels were then determined by Western blotting in extracts from human prostatic tissues and Pca cell lines. Fig. 7C shows that the *Fer* protein was undetectable or present at low levels in nine out of 11 non malignant (normal and hyperplastic) prostatic tissue extracts examined while it was present in significant amounts in nine out of ten extracts from Pca tissues. Analysis by densitometry showed that on average, *Fer* protein levels were 2-fold increased in benign prostatic hyperplasia as compared to normal prostatic tissues and 20-fold higher in Pca tissues. Among groups, this was statistically different only for Pca tissues ( $P < 0.05$ ). However, *Fer* levels were similar in localized and metastatic Pca. The *Fer* protein was also expressed in the human Pca cell lines (Fig. 7D), with highest levels in PC-3 cells ( $P < 0.05$ ) as compared to DU145 and LN-CaP cells.

Collectively, these findings suggest that Fer protein expression is upregulated in situations where growth was induced in canine and human prostates, or when these cells were actively dividing, while its expression seems unrelated to epithelial cell differentiation.

#### 4. Discussion

In the present investigation, the canine *fer* cDNA was isolated. It was used as a tool first to demonstrate that an antibody produced against a Fer peptide recognized the Fer protein and can thus be utilized for expression studies in prostate tissues and cells. Then, it was used to assess by an antisense strategy the role of the Fer protein in cell growth in the highly tumorigenic human prostatic carcinoma PC-3 cells.

At the gene level, Southern blot analysis performed on dog DNA suggested the presence of other *fer* or *fer*-related genes, which is in agreement with a previous study with human DNA (Hao et al., 1989). Such genes may give rise to Fer-related proteins, as first suggested by the detection of several proteins in Western blot with the anti-Fer antibody. However, as the antisense

expression of the 5' portion of the coding region of the *fer* cDNA did not affect the expression of the majority of the proteins detected with the anti-Fer antibody, this suggests that these are only immunologically related and/or may be degradation products of the Fer protein, despite the use of protease inhibitors.

At the amino acid level, the canine *fer* cDNA encoded a 94 kDa protein which was highly homologous to its human and rat counterparts. In addition, as revealed with the tagged MycHis-Fer protein, this cDNA encoded an active 94 kDa TK immunoprecipitated by our anti-Fer antibody. These observations, along with the fact that a 94 kDa tyrosine phosphorylated protein was detected after Fer immunoprecipitation in PC-3 cells, justified the use of the canine cDNA in preparation of Fer constructs for transfection in human. The distribution into the nuclear and cytoplasmic fractions of PC-3 cells of a 94 kDa protein which was recognized in Western blot by this antibody, a finding corresponding to data in the literature on the localization of the Fer protein in human cells (Hao et al., 1991), also supports the identification of this protein as Fer. Thus, this antibody could be used to study Fer expression in extracts from prostate models selected. It is also a good tool for Fer immunoprecipitation studies but not to assay enzymatic activity since all our attempts failed (not shown). This is in agreement with previous reports showing that the binding of an antibody in proximity to the catalytic site hinders Fer activity (Pawson et al., 1989) and thus confirms that the C-terminal tail of Fer may be important for the conformation of the active catalytic domain (Ben-Dor et al., 1999). On the other hand, this antibody is of no use for immunohistochemistry, due to the recognition of other unidentified proteins related to the immunizing peptide.

To get insight into the functional role of the Fer protein in human Pca cells, an antisense strategy was developed to reduce its expression. In clones exhibiting the lowest Fer levels (70% reduction as compared to parental cells), this resulted in an increased doubling time from 29 to 42 h and the inability of Pca cells to form colonies in soft agar. These findings together with our inability to recover clones which do not express Fer are in support of a role of Fer in PC-3 cell proliferation. This is in agreement with the increased nuclear distribution of Fer in the S phase of the cell cycle (Ben-Dor et al., 1999) and the transforming properties of the *Drosophila* Fer/Fes homolog in avian and rodent cells (Paulson et al., 1997).

The observation that antisense transfected clones with lowest Fer protein levels exhibited morphological changes, suggested that Fer may also regulate cell shape by affecting organization of the cytoskeleton. On the other hand, it appears from our study that at least in human PC-3 cells, where growth properties were highly affected both in monolayer and in soft agar, Fer is

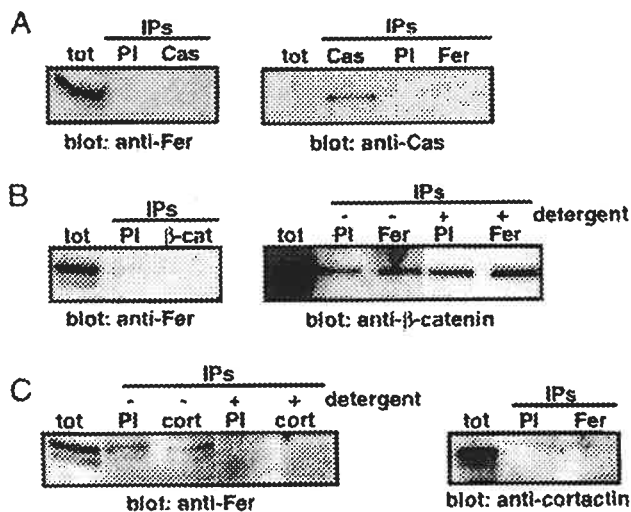


Fig. 4. Fer interactions with signalling molecules. Total PC-3 cells extracts (tot) were immunoprecipitated (IPs) and submitted to Western blot following SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. (A) Immunoprecipitations (IPs) with pre-immune immunoglobulins (PI), anti-Cas (Cas) or anti-Fer (Fer) antibodies followed by Western blot against Fer (left panel) or Cas (right panel). (B) Immunoprecipitations (IPs) with pre-immune immunoglobulins (PI), anti-β-catenin (β-cat) or anti-Fer antibodies followed by Western blot against Fer (left panel) or β-catenin (right panel). In some cases, 1% sodium deoxycholate/0.1% SDS (+) was added to the immunoprecipitation buffer in order to decrease non specific interactions. (C) Immunoprecipitations (IPs) with pre-immune immunoglobulins (PI), anti-cortactin (cort) or anti-Fer antibodies followed by Western blot against Fer (left panel) or cortactin (right panel). The effect of the detergent nonidet P-40 in the immunoprecipitation buffer (+ vs. -) is also shown.



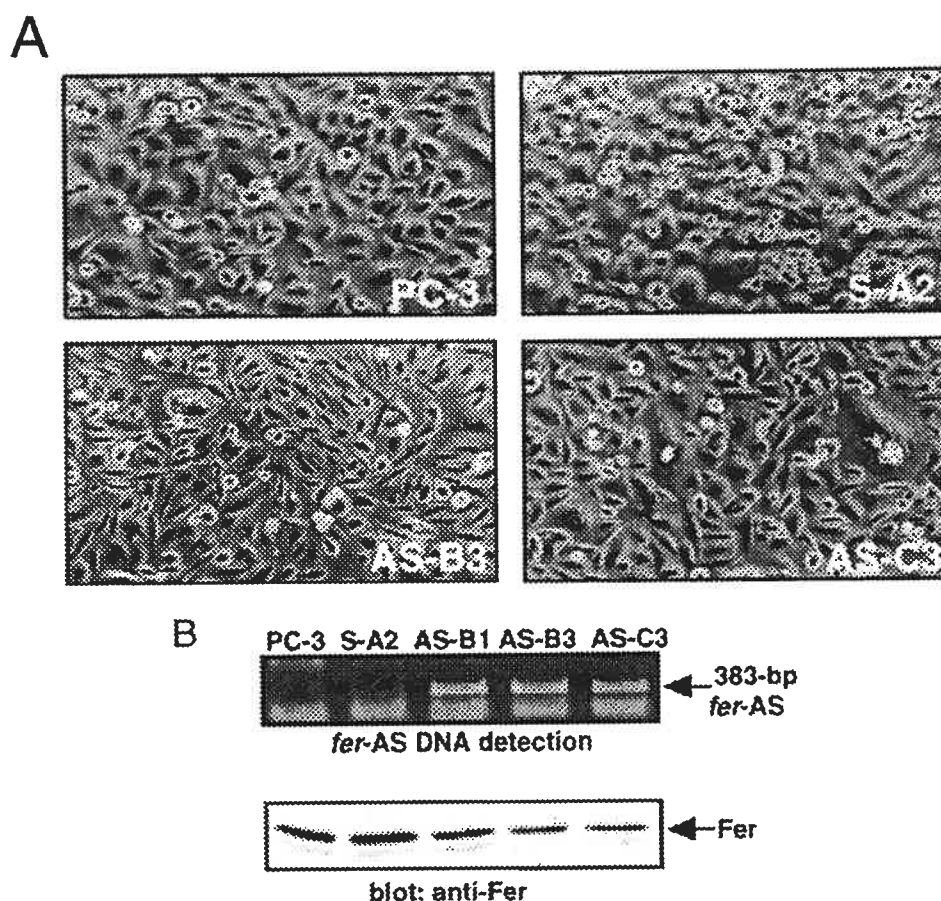


Fig. 5. Effect of antisense expression of *fer* cDNA in PC-3 cells. Analysis of parental and transfected PC-3 cells with the pcDNA3 vector carrying a 420 bp fragment of the coding region of *fer* in the sense (clone S-A2) or antisense (clones AS-B1, AS-B3 and AS-C3) orientation. (A) Cell morphology of indicated clones as shown by phase contrast microscopy (magnification 100 $\times$ ). (B) Integration of antisense *fer* cDNA as shown by the 383 bp fragment corresponding to the antisense *fer* cDNA amplified by PCR from genomic DNA. The lower panel shows Fer protein expression levels in these clones by Western blotting with anti-Fer antibodies.

unlikely to be a key player regulating cell–cell or cell–matrix interactions. Other signalling molecules are likely partners of Fer, since no interaction with known proteins, such as  $\beta$ -catenin, p120Cas and cortactin, was observed. This discrepancy with published data may also partly be explained by differences in cell types used, as with the exception of p120Cas, in human A431 cells (epidermal carcinoma), all associations were found in embryonic cells, such as in NIH 3T3 and Swiss 3T3 mouse cells for Cas (Kim and Wong, 1995), Rat-2 fibroblasts for  $\beta$ -catenin (Rosato et al., 1998) and NIH 3T3 cells and 293 human kidney cells for cortactin (Kim and Wong, 1998). It is noteworthy that similar differences were depicted for the Fes kinase, the other member of the Fer family, which was reported to be associated or not with the beta subunit of GM-CSF and IL-3 receptors depending of the system under study (Hanazono et al., 1993; Witthuhn et al., 1993; Quelle et al., 1994). Among other mechanisms by which Fer may affect cell proliferation is the regulation of gene transcription during the cell cycle (Schwartz et al., 1998;

Ben-Dor et al., 1999). Further investigations are needed to identify the signalling mechanisms in which Fer is implicated in PC-3 cells.

In support of a putative role of Fer in prostatic cell proliferation is the observation of an up-regulation of Fer expression in primary culture and during basal cell hyperplasia and metaplasia in prostates from castrated dogs treated with estrogens. Since in these in vitro and in vivo canine models, basal epithelial cells also exhibited enhanced TK activity (Tessier et al., 1989; Nguyen et al., 1996) and levels of tyrosine phosphorylated proteins (Landry et al., 1996), this supports our finding that Fer expression may be increased mainly in these dividing cells. However, the contribution of the stroma cannot be excluded at the present time. In contrast, Fer was undetectable or expressed at low levels in extracts from prostate epithelial cells in a quiescent state when freshly dispersed, and from dog prostate tissues where the proliferative index is low. Also, Fer levels remained low in extracts where the prostatic secretory epithelium was renewed under androgenic supplementation, sug-

gesting that the Fer protein is unlikely contributing to cell differentiation in the prostate. These data of a link with prostate cell proliferation are also supported by findings on Fer protein levels in extracts from human prostatic cell lines, all initially established from metastases, as well as in Pca tissues. Indeed, the 94 kDa Fer protein was not detected or present in low amounts in most non malignant human prostatic tissues analyzed, either obtained from autopsies (normal) or from resection (BPH), but was expressed in the majority of Pca specimens. As histological evaluation revealed similar contributions of epithelial and stromal cells in individual categories, it is unlikely that the elevation of Fer levels in cancer tissues is caused solely by an increased ratio of stromal/epithelial cells. In addition, since Fer levels were not statistically different in localized versus metastatic Pca, this protein is unlikely implicated directly in invasion. However, due to the limited number of specimens analyzed, complementary analyses will be necessary to ascertain this point. Immunohistochemical

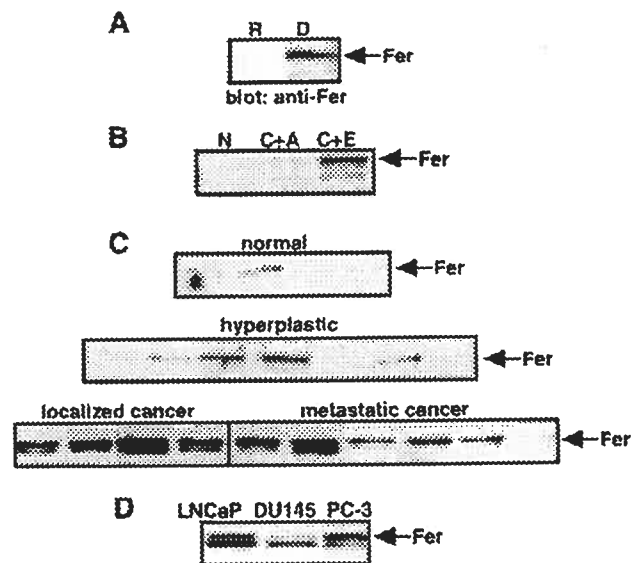


Fig. 7. Regulation of Fer protein expression. For each panel, 25µg of total protein extracts were submitted to a 7% acrylamide gel electrophoresis, transferred onto nitrocellulose membrane and submitted to Western blot with anti-Fer antibody. (A) Canine prostatic epithelial cells in a resting (R) or in dividing (D) state after 3 days in primary culture. (B) Prostate extracts from normal (N), castrated and androgen supplemented (C + A) or castrated and estrogen supplemented (C + E) dogs. (C) Human prostate extracts from normal (N), hyperplastic (BPH) and malignant (Pca) tissues. (D) LNCaP, DU145 and PC-3 human Pca cell lines. The position of Fer is indicated by an arrow.

studies with an antibody detecting only Fer in Western blot will help to assess if Fer is indeed expressed in epithelial cells and determine its nuclear versus cytoplasmic distribution.

Collectively, these data demonstrate that the expression of the Fer protein tyrosine kinase correlates positively with prostate epithelial cell proliferation in vitro, and most likely in vivo in the dog and human prostate models examined.

**Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada and awards from the FCAR/FRSQ to Pierre Allard (Studentship).

**References**

Allard, P., Atfi, A., Landry, F., Chapdelaine, A., Chevalier, S., 1997. Estradiol activates p60src, p53/56lyn and reactivated p50/55 protein tyrosine kinases in the dog prostate. *Mol. Cell. Endocrinol.* 126, 25–34.  
Atfi, A., Drobetsky, E., Boissonneault, M., Chapdelaine, A., Chevalier, S., 1994. Transforming growth factor beta down-regulates Src family protein tyrosine kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 269, 30688–30693.

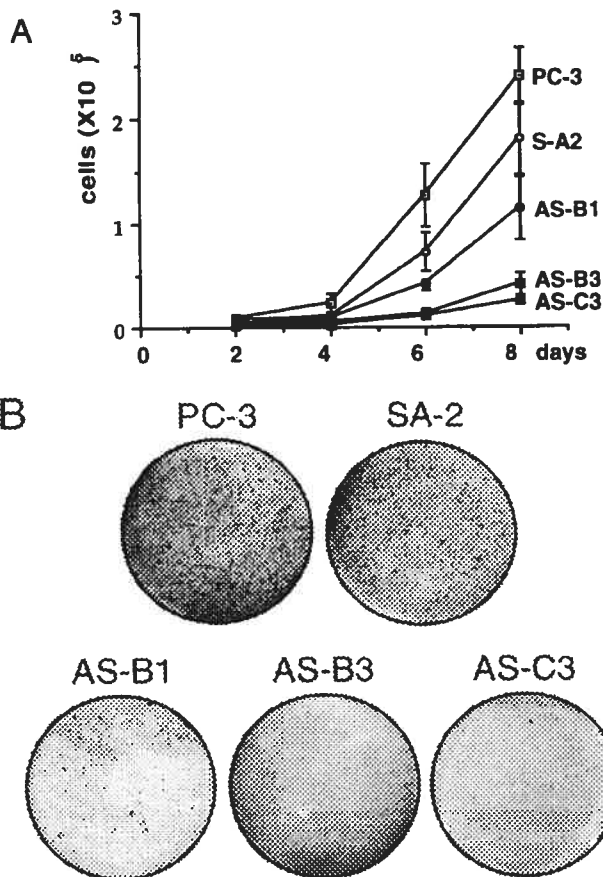


Fig. 6. Growth properties of fer transfected PC-3 clones. (A) The proliferation rate in monolayers of parental, sense and antisense transfected PC-3 cells, was determined every 2 days for a period of 8 days. Cell number was determined by counting following trypsinisation. (B) Ability to form colonies in soft agar as assayed after 21 days in culture. Viable cells were stained with MTT and dishes were photographed. Each experiment was reproduced at least three times.

- Barrack, E.R., Berry, S.J., 1987. DNA synthesis in the canine prostate: effects of androgen and estrogen treatment. *Prostate* 10, 45–56.
- Ben-Dor, I., Bern, O., Tennenbaum, T., Nir, U., 1999. Cell cycle-dependent nuclear accumulation of the p94(fer) tyrosine kinase is regulated by its NH2 terminus and is affected by kinase domain integrity and ATP binding. *Cell Growth Differ.* 10, 113–129.
- Black, R.J., Bray, F., Ferlay, J., Parkin, D.M., 1997. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur. J. Cancer.* 33, 1075–1107.
- Bonkhoff, H., 1996. Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: a stem cell concept for the development of prostate cancer. *Eur. Urol.* 30, 201–205.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Chevalier, S., Bleau, G., Roberts, K.D., Chapdelaine, A., 1981. Proliferation and differentiation of canine prostatic epithelial cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 24, 198–208.
- Chevalier, S., Turcotte, G., McKercher, G., Boulanger, P., Chapdelaine, A., 1990. Steroid metabolism and binding in relation to prostatic cell growth and differentiation in vitro. In: Castagnetta, L., d'Aquino, S., Labrie, F., Bradlow, H.L. (Eds.), *Steroid formation, degradation, and action in peripheral tissues*, vol. 595. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, New York, pp. 173–183.
- De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Epstein, J.I., Coffey, D.S., 1998. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am. J. Pathol.* 153, 911–919.
- Durocher, Y., Chapdelaine, A., Chevalier, S., 1989. Tyrosine protein kinase activity of human hyperplastic prostate and carcinoma cell lines PC3 and DU145. *Cancer Res.* 49, 4818–4823.
- Feldman, R.A., Tam, J.P., Hanafusa, H., 1986. Antipeptide antiserum identifies a widely distributed cellular tyrosine kinase related to but distinct from the c-fps/fes-encoded protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 6, 1065–1073.
- Fischer, E.H., 1993. Protein phosphorylation and cellular regulation II. *Angew. Chem. Int. Edit.* 32, 1130–1137.
- Gaudette, L.A., Altmayer, C.A., Wysocki, M., Gao, R.N., 1998. Cancer incidence and mortality across Canada. *Health Rep.* 10, 51–66.
- Hanazono, Y., Chiba, S., Sasaki, K., Mano, H., Yazaki, Y., Hirai, H., 1993. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and kinase activity of the c-fps/fes proto-oncogene product in human erythropoietin-responsive cells. *EMBO J.* 12, 1641–1646.
- Hao, Q.L., Heisterkamp, N., Groffen, J., 1989. Isolation and sequence analysis of a novel human tyrosine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1587–1593.
- Hao, Q.L., Ferris, D.K., White, G., Heisterkamp, N., Groffen, J., 1991. Nuclear and cytoplasmic location of the FER tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1180–1184.
- Heldin, C.H., 1996. Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv.* 27, 7–24.
- Keshet, E., Itin, A., Fischman, K., Nir, U., 1990. The testis-specific transcript (ferT) of the tyrosine kinase FER is expressed during spermatogenesis in a stage-specific manner. *Mol. Cell. Endocrinol.* 10, 5021–5025.
- 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. *Mol. Cell. Endocrinol.* 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. *J. Biol. Chem.* 273, 23542–23548.
- Landry, F., Chapdelaine, A., Bégin, L.R., Chevalier, S., 1996. Phosphotyrosine antibodies preferentially react with basal epithelial cells in the dog prostate. *J. Urol.* 155, 386–391.
- Letwin, K., Yee, S.P., Pawson, T., 1987. Novel protein-tyrosine kinase cDNAs related to fps/fes and eph cloned using anti-phosphotyrosine antibody. *Oncogene* 3, 621–627.
- MacDonald, I., Levy, J., Pawson, T., 1985. Expression of the mammalian c-fes protein in hematopoietic cells and identification of a distinct fes-related protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 5, 2543–2551.
- Merk, F.B., Ofner, P., Kwan, P.W.L., Leav, I., Vena, R.L., 1982. Ultrastructural and biochemical expressions of divergent differentiation in prostates of castrated dogs treated with estrogen and androgen. *Lab. Invest.* 47, 437–450.
- 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 as part of a membrane complex present in dividing but not in resting prostatic epithelial cells. *Biochem. Cell Biol.* 74, 75–85.
- Paulson, R., Jackson, J., Immergluck, K., Bishop, L.M., 1997. The DFER gene of *Drosophila melanogaster* encodes two membrane-associated proteins that can both transform vertebrate cells. *Oncogene* 14, 641–652.
- Pawson, T., Letwin, K., Lee, T., Hao, Q.L., Heisterkamp, N., Groffen, J., 1989. The FER gene is evolutionarily conserved and encodes a widely expressed member of the FPS/FES protein-tyrosine kinase family. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5722–5725.
- Quelle, F.W., Sato, N., Witthuhn, B.A., Inhorn, N.C., Eder, M., Miyajima, A., Griffin, J.D., Ihle, J.N., 1994. JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4335–4341.
- Rizzino, A., 1987. Soft agar growth assays for transforming growth factors and mitogenic peptides. In: Barnes, D., Sirbasku, D.A. (Eds.), *Methods in Enzymology: Peptide Growth Factors*, vol. 146. Academic Press, New York, pp. 341–352.
- Rodrigues, G.A., Park, M., 1994. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Biol.* 4, 15–24.
- Rosato, R., Veltmaat, J.M., Groffen, J., Heisterkamp, N., 1998. Involvement of the tyrosine kinase fer in cell adhesion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 18, 5762–5770.
- Sambrook, T., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. In: Nolan, C. (Ed.), Boston: Cold Spring Harbour Laboratory, pp. 9.22–9.23.
- Schwartz, Y., Ben-Dor, I., Navon, A., Motro, B., Nir, U., 1998. Tyrosine phosphorylation of the TATA element modulatory factor by the FER nuclear tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 434, 339–345.
- Storrie, B., Madden, A., 1990. Isolation of subcellular organelles. In: Deutscher, M.P. (Ed.), *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*, vol. 182. Academic Press, New York, pp. 203–213.
- Tessier, S., Chapdelaine, A., Chevalier, S., 1989. Alkali-resistant protein phosphorylation and tyrosine kinase activity of epithelial cell types from normal and metaplastic canine prostates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 66, 59–70.
- Tremblay, L., Hauck, W., Aprikian, A.G., Bégin, L.R., Chapdelaine, A., Chevalier, S., 1996a. Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 68, 164–171.
- Tremblay, L., Hauck, W., Nguyen, L.T., Allard, P., Landry, F., Chapdelaine, A., Chevalier, S., 1996b. Regulation and activation of focal adhesion kinase and paxillin during the adhesion, proliferation, and differentiation of prostatic epithelial cells in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.* 10, 1010–1020.

Wang, J.Y.J., 1992. Oncoprotein phosphorylation and cell cycle control. *Biochim. Biophys. Acta* 1114, 179–192.

Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B.,

Miura, O., Ihle, J.N., 1993. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74, 227–236.

- **Préambule au manuscrit II:** La surexpression d'un antisens dirigé contre l'ADNc de Fer dans les cellules PC3 n'a pas permis d'isoler des clones qui n'expriment pas Fer. Dans les clones où le taux d'expression de Fer est abaissé de 70%, la prolifération est retardée (le temps de dédoublement passe de 29h à 42h). Par ailleurs, ces clones perdent leur capacité à former des colonies en agar moue, utilisé comme test de tumorigénicité. Ceci est sans conséquence sur les interactions et adhésions cellulaires et n'affecte pas sensiblement la forme des cellules. Cette étude démontre aussi dans les cellules PC3, Fer ne s'associe pas avec la  $\beta$ -caténine, la cortactine et p120Cas.

Ces résultats suggèrent que Fer est impliquée dans la survie, la prolifération et la tumorigénicité des cellules prostatiques cancéreuses et qu'elle utilise donc d'autres partenaires dans les cellules prostatiques. La recherche de nouveaux partenaires s'imposait.

Comme Fer s'associe avec STAT3 dans d'autres types de cellules, que STAT3 se trouve dans la voie de signalisation de l'IL-6 et que la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses est stimulée par l'IL-6, nous proposons que :

- **Hypothèse :** Fer est impliquée dans la voie de signalisation de l'IL-6 dans les cellules prostatiques cancéreuses.

## **2      Manuscrit II : Fer: A Novel Tyrosine Kinase in Interleukin-6 signaling in Advanced Prostate Cancer**

**Amina Zoubeidi, Nicolas Tritch, Fatima Zouanat, Armen. G Aprikian and**

**Simone Chevalier.**

**(2003)**

**En révision dans la revue Oncogene**

### **Contribution des auteurs :**

**Amina Zoubeidi : A réalisé toutes les expériences à l'exception de la figure 2A et 7.**

**Nicolas Tritsh : A participé à la mise au point des conditions de stimulation des cellules à l'IL-6.**

**Fatima Zouanat : A fait la mise au point de la technique d'immunohistochimie montré dans la figure 7 et les études de prolifération obtenues à la figure 1A.**

**Armen G Aprikian : A fourni les tissus prostatiques.**

**Simone Chevalier : Directrice de recherche.**

**Fer: A novel tyrosine kinase implicated in interleukin-6 signaling in advanced prostate cancer**


**Amina Zoubeidi<sup>1,2</sup>, Nicolas Tritsch<sup>3</sup>, Fatima Z. Zouanat<sup>2</sup>, Armen G. Aprikian<sup>2</sup>,  
and Simone Chevalier<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Department of Biochemistry, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville  
Montréal, Quebec, H3C 3J7, Canada*

<sup>2</sup> *Urologic Oncology Research Group, Departments of Surgery (Urology Division),  
Medicine, and Oncology, McGill University Health Center and Research Institute,  
1650, Cedar Avenue, Montreal, Quebec, H3G 1A4, Canada*

<sup>3</sup> *Center for Neuronal Survival, Montreal Neurological Institute, McGill University,  
3801 University Street, Montreal, Quebec, H3A 2B4, Canada*

\* *Correspondence: Dr S. Chevalier, McGill University Health Center, Research  
Institute, 1650 Cedar Avenue, Montreal, Quebec, H3G 1A4, Canada*

  
Phone: (514) 934-1934 ext. 44616

Fax: (514) 934-8261

*Running head: Fer in IL-6 signaling in prostate cancer cells*

*Key Words: Interleukin-6, cytokine, gp130, STAT3, Fer, tyrosine kinase, prostate cancer*

### Abstract

The expression of several components of the interleukin-6 (IL-6) pathway, namely IL-6, gp130, and STAT3, was recently correlated with progression of human prostate cancer. *In vitro*, IL-6 stimulates the growth of several human cancer cell lines, including the commonly used PC-3 cells known to mimic advanced prostate cancer in man. Our recent study indicates an up-regulated expression of the Fer tyrosine kinase in human prostate cancer and its implication in growth. Since Fer associates with STAT3 in other cell types, this raises the question of whether Fer may be implicated in the IL-6 pathway in prostate cancer cells. We demonstrated that indeed IL-6 stimulates PC-3 cell growth and activates the tyrosine phosphorylation of Fer in a bimodal manner. This corresponded initially with the formation of Fer complexes with the IL-6 receptor, the glycoprotein gp130, and then with STAT3. The levels of STAT3 and of tyrosine phosphorylated STAT3 (pY-STAT3) in Fer complexes paralleled the Fer activation pattern. In addition, as demonstrated using a dominant negative *fer* construct, Fer activity was responsible for STAT3 phosphorylation but not determinant for the formation of Fer/STAT3 complexes. Moreover, the time-dependent effect of IL-6 on Fer activation was accompanied by changes in the distribution of Fer/STAT3 complexes in the cytoplasm and the nucleus. Furthermore, nuclear levels of Fer/pY-STAT3 complexes were particularly elevated and complexes were detected in the chromatin fraction. Finally, the significance of these findings was established in human prostate cancer specimens. Fer and STAT3 were expressed at high levels in tumours and often detected in the nucleus of the same subsets of cells. Altogether these findings show for the first time the implication of the Fer kinase in the IL-6 modulation of prostate cancer cell growth. We propose that by modulating the activation of STAT3 up to the chromatin level, Fer exerts a novel role in the transcription of IL-6 dependent genes.



## Introduction

The 94 kDa Fer (Fps/Fes related) protein belongs to a small family of non-receptor tyrosine kinases (TK) composed of Fps and Fes (Pawson *et al.*, 1989). The Fer structure contains a putative N-terminal CIP4 (cdc42interacting protein) homology domain, followed by three regions of predicted coiled-coil domains directing protein-protein interactions, a central Src Homology (SH) domain 2, and a C-terminal domain containing the catalytic kinase domain, a nuclear localization signal (NLS), and a regulatory tyrosine residue located at position 714 that reflects Fer activation when phosphorylated (Ben-Dor *et al.*, 1999).

Fer was assigned a wide variety of functions but its exact role in normal and malignant cells is still incompletely known. Our understanding of Fer involvement in signaling is largely based on the use of constitutively active or inactive *fer* mutants and/or its subdomains in diverse model systems. This has provided valuable information on Fer implication in pathways regulating a wide variety of cell functions (Greer, 2002), ranging from the cytoskeleton (Kim and Wong 1995; Kim and Wong 1998; Lunter and Wiche 2002) to cell-cell interactions (Kim and Wong 1995), adhesion (Rosato *et al.*, 1998), motility (Craig and Greer 2002), proliferation (Ben-Dor *et al.*, 1999) and survival (Iwanishi *et al.*, 2000). Additional observations in transgenic mice expressing a dominant negative Fer protein have recently confirmed a central role in the cytoskeleton by controlling cortactin phosphorylation in fibroblasts (Craig *et al.*, 2001). Besides this anomaly, animals did not present detectable growth defects (Craig *et al.*, 2001), thereby implying that Fer activity is not determinant for embryogenesis and subsequent post-natal development. Nevertheless, the situation may differ appreciably as a consequence of phenotypical changes taking place in specific organs or tissues, namely according to the hormonal host status or as a result of malignant transformation. This is apparently the case of the prostate where the 94 kDa Fer protein is barely detectable in normal prostate but expressed at significantly elevated levels when inducing basal cell metaplasia in the dog model and in prostate cancer in man (Allard *et al.*, 2000). In addition, Fer is constitutively activated in human prostate carcinoma cell lines, with highest levels observed in the most aggressive and androgen-independent PC-3 cell line (Allard *et al.*, 2000). Moreover, a role in the regulation of prostate cancer cell

growth was demonstrated using an antisense *fer* cDNA (Allard *et al.*, 2000). This strategy did not result in null *fer* clones but reducing Fer levels had significant effects on PC-3 cell proliferation rate and abolished their tumourigenicity *in vitro*, without significantly affecting cell interactions/adhesions. Accordingly, and in contrast with findings in fibroblasts, Fer did not interact with cortactin, p120Cas, and  $\beta$ -catenin in a specific manner (Allard *et al.*, 2000). Therefore, Fer most likely uses other growth-related partners in human prostate cancer.

In the present investigation, we tested signaling molecules implicated in the interleukin (IL)-6 pathway as Fer partners in PC-3 cells. Underlying observations are the regulation of prostate cancer cell proliferation by IL-6 (Chung *et al.*, 1999) and the interaction between Fer and the signal transducer and activator of transcription, STAT3, in other cell types (Priel-Halachmi *et al.*, 2000; Orlovsky *et al.*, 2002; Taler *et al.*, 2003). We confirmed the IL-6 stimulation of PC-3 cell proliferation and demonstrated, for the first time, that IL-6 leads to the activation of Fer. This effect was observed at the receptor level, with the formation of gp130/Fer complexes, and then with STAT3 in both the cytoplasm and the nucleus. Fer activity was responsible for STAT3 tyrosine phosphorylation. Moreover, Fer and STAT3 were found in the chromatin of PC-3 cells as well as in the cytoplasm and the nucleus of tumour cells in human prostate cancer specimens. We propose that by its ability to maintain elevated levels of tyrosine phosphorylated transcription factors, Fer may play a novel regulatory function in prostate cancer.

## Materials and Methods

### ***Cell culture and transfection***

The rapidly growing human PC-3 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were routinely grown in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic/antimycotic solution (all from Life Technologies, Burlington, Canada). For IL-6 treatment, 90% confluent monolayers were serum-starved for 48 hours and stimulated for the time indicated at optimal doses of IL-6 (PeproTech, Rock Hill, NJ; 100 ng.ml<sup>-1</sup>), as reported (Okamoto *et al.*, 1997). The effect of IL-6 on PC-3 cell growth was assessed in 96 wells using MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]) assays (Sigma Aldrich Canada Ltd, Oakville, Ontario).

For constructs and transfections, the full length *fer* cDNA already tagged with a myc-6His epitope in C-terminal (Allard *et al.*, 2000) was used. A dominant negative (DN) *fer* construct was obtained by substitution of lysine 591 by arginine and tyrosine 714 by phenylalanine (Quick Change *in vitro* mutagenesis kit, Stratagene, La Jolla, CA). PC-3 cells (at 75 % confluency in 60 mm dishes) were transiently transfected with 5 µg DNA using SuperFect (30 µl; Qiagen, Mississauga, Ont, Canada) and lysed 48 hours later in RIPA buffer (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM sodium vanadate, 1% Nonidet P-40, 10µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin). In some instances, transfected PC-3 cells were serum-starved for 4 hours, exposed to IL-6 for 30 min, fixed as described below and analyzed by fluorescence microscopy. Recombinant Fer proteins were analyzed by Western blotting and kinase assays, as described below.

### ***Fer antibodies***

A fusion Fer-GST protein was engineered using a 420pb EcorI-EcorI fragment of the *fer* cDNA (position 9-146), fused to a *Glutathione S Transferase* (GST) construct, subcloned in a pGEX vector (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Baie d'Urfée, QC, Canada), and induced in *Escherichia Coli* for 6 hours using 0.4 mM isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside. The fusion protein was solubilized with urea, purified on a

GST-column, and used for immunization of rabbits. The immune response was followed periodically by ELISA to harvest the antiserum when reaching a high titer (a million-fold). Immunoglobulins were purified on protein-A sepharose beads (Life Technologies) using both pre-immune and immune sera. Specificity was assessed by Western blotting after SDS-PAGE, as described below, using whole PC-3 proteins and extracts from transfected PC-3 cells expressing the myc-Fer recombinant protein. The antiserum was also pre-incubated with varying concentrations of GST-Fer (used for immunization) and tested for the loss of immunoreactive 94 kDa Fer protein and immunoreactivity, by both fluorescence in PC-3 cells and immunohistochemistry in prostate tissue sections, as outlined below. In addition, Fer was immunoprecipitated using purified immunoglobulins from pre-immune and immune sera as negative and positive controls, respectively, and tested for activity, as described below. Lastly, Fer antibodies were compared to pre-immune immunoglobulins for immunoreactivity on PC-3 cells and prostate tissues.

### ***Cell fractionation***

For whole cell lysates, monolayers were rapidly washed 5 min with ice-cold PBS containing 1% sodium vanadate, scraped in RIPA buffer, left on ice for 20 min, and clarified by centrifugation (14,000 × g for 5 min). Cytoplasmic and nuclear proteins were fractionated using the NE-PER kit (Pierce, Rockford, IL), as recommended by the manufacturer. The chromatin was obtained essentially as described previously (Kreitz *et al.*, 2001). Briefly, PC-3 cells were first swollen in hypotonic buffer A (20 mM Hepes, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, pH 7.5) and broken by Dounce homogenization to obtain nuclei by low speed centrifugation. The nuclear pellet was resuspended in buffer A containing 0.5% Nonidet P40 to separate the free nucleosolic proteins from the chromatin by centrifugation. The chromatin fraction was digested with micrococcal nuclease (Fermentas, Canada; 30 Units; 10 min at 14°C) in 20 mM Hepes, pH 7.5, containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM ATP, and 0.3 mM sucrose. This was followed by deproteinization of all fractions using proteinase K (Life Technologies; 200 μg/ml) in 0.5% SDS for 30 min at 37°C.

Proteins were assayed, using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976). The quality of cytoplasmic and nuclear protein fractions was

attested by Western blotting (30  $\mu$ g protein aliquots), as described below using antibodies against cortactin, paxillin, and Raf-1 (all from Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), nucleolin, histone H1, and histone acetyl N-transferase (all from Santa Cruz, San Diego, CA). Histones were also visualized using Coomassie staining and the DNA was analyzed after electrophoresis in agarose gels.

### ***Immunoprecipitation***

Proteins of interest (750 $\mu$ g, unless otherwise stated) were immunoprecipitated overnight at 4°C on a rocking platform after the addition of 2 $\mu$ g of antibodies, against Fer (as obtained above), myc (Life Technologies), phosphotyrosine (pY; polyclonal from Upstate Biotechnology), gp130 (Santa Cruz), and STAT3 (Cell Signaling, Beverly, MA). Immune complexes were recovered with protein-G sepharose (Life Technologies; 20 $\mu$ l; 40 min at 4°C), washed with RIPA buffer three times, centrifuged, and submitted to SDS-PAGE, as described (Allard *et al.*, 2000). Proteins were transferred on nitrocellulose membranes and probed using antibodies against Fer, STAT3, pY-STAT3 (Cell Signaling), myc, and pY, as indicated in legends of Figures. Detection was achieved after incubation with goat anti-rabbit or mouse antibodies coupled to horseradish peroxidase (Pierce; 1:2000) using the enhanced chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia Biotech.), according to the manufacturer's specifications. Bands of interest on films were analyzed by densitometric scanning through the use of Hewlett Packard Scan Jet ADF and Image Quant 50 (Molecular Dynamics). Levels were compared using the one-tailed unpaired modified t-test for small sampling. Differences were considered significant at a *p* value of less than 0.05.

### ***In vitro phosphorylation and kinase assays***

Fer immunoprecipitates were submitted to *in vitro* phosphorylation assays for 30 min at 37°C in 50 mM Tris-HCl pH 7.7, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 14 mM  $\beta$ -mercaptoethanol containing 0.1  $\mu$ M [ $\gamma$  <sup>32</sup>P] ATP. Reactions were stopped by addition of Laemmli buffer (1X) and Fer activity was determined after SDS-PAGE by submitting dried gels to autoradiography (X-Ray films), as reported (Allard *et al.*,

1997). In-gel kinase assays were performed on Fer immunoprecipitates, as described (Durocher *et al.*, 1992).

### ***Immunofluorescence***

Cells growing in eight well plastic chambers were fixed in 3.7% paraformaldehyde (10 min), incubated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl (10 min), 0.5 % Triton X-100 (5 min), and 0.5 % BSA/PBS (10 min) prior addition of antibodies for 4 hours to detect Fer (1:150), myc (1:150 ) STAT3 (1:150) and pY-STAT3 (1:150). Antigens were visualized using anti-rabbit Alexa antibodies coupled to FITC (Molecular Probes, Eugene, OR; 1:3000; 30 min). Counterstaining was achieved using either TRITC phalloidin (Sigma Aldrich Canada Ltd; 1:3000; 30 min), actin antibodies (Chemicon, Temecula, CA), or DAPI (Santa Cruz; 1:3000; 30 min). Photomicrographs were taken at a 400X magnification using either a ZEISS LSM 510 confocal microscope or a MIKON ECLIPSE E600 fluorescence microscope.

### ***Immunohistochemistry***

Formalin-fixed and paraffin-embedded prostate cancer specimens from 8 patients were analyzed by immunohistochemistry. Briefly, 4µm sections were deparaffinized with toluene, rehydrated with graded alcohol, and permeabilized with 1% of Triton X-100 in PBS for 30 min at room temperature. For STAT3, an antigen retrieval step was included after permeabilization by incubating sections at 95°C for 20 min in 0.01M sodium citrate buffer, pH 6, as adapted from Owens *et al.* (2001). Endogenous peroxidase activity was quenched by 30 min incubation with 3% hydrogen peroxide in PBS-methanol (1:1). After washing (3 times 5 min with PBS), slides were incubated with 10% normal horse serum in PBS (30 min; room T) to prevent non-specific staining and further incubated overnight at 4°C with antibodies to detect Fer (1:25 dilution or 4µg/ml) and STAT3 (1:100) in PB containing 0.1% BSA. Slides were washed (3 times 5 min with PBS) and incubated with biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulins followed by avidin peroxidase using the Vectastatin ABC elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The reaction was revealed in less than 2 min using 20µl of 30% hydrogen peroxide in a 0.06% DAB solution (Sigma Aldrich Canada Ltd). Sections were counterstained with haematoxylin,

dehydrated, and mounted. Negative controls included sections incubated without primary antibodies or using pre-immune immunoglobulins (4 $\mu$ g). As mentioned above, Fer antibodies were also pre-incubated with increasing amounts of GST-Fer fusion protein and then tested to confirm loss of immunoreactivity.

## Results

### ***Specificity of Fer antibodies***

We previously reported on polyclonal antibodies raised in rabbits against a C-terminal Fer peptide that allowed a study on Fer in prostate cells and tissues using Western blotting (Allard *et al.*, 2000). However, a few other proteins were also detected (Allard *et al.*, 2000). To alleviate this problem and increase specificity, novel antibodies were raised against a GST-Fer fusion protein (420bp fragment corresponding to amino acid 9-146 from the N-terminal). The characteristics of purified Fer antibodies are depicted in Figure 1. Fer antibodies recognized a single 94 kDa protein in PC-3 cell extracts, not detected by pre-immune immunoglobulins (IgGs) (upper left panel). Specificity was further ascertained by competition of Fer antibodies with increasing concentrations (from 2 to 10  $\mu\text{g/ml}$ ) of the GST-Fer antigen, which led to a loss of the immunoreactive 94 kDa protein (second from left). Moreover, as shown by an *in vitro* phosphorylation assay, Fer antibodies but not pre-immune IgGs, immunoprecipitated a major active 94 kDa kinase in PC-3 cells, as revealed by *in vitro* kinase assays (third from left). Similarly, Fer antibodies recognized and immunoprecipitated the myc-his-tagged Fer protein (transfection of *fer* cDNA construct in PC-3 cells), as detected with myc antibodies and according to the quantity of immunoglobulins used for immunoprecipitation (right of top panel). These new Fer antibodies did not specifically immunoprecipitate cortactin,  $\beta$ -catenin, and p120Cas (data not shown), in agreement with earlier data (Allard *et al.* 2000). Immunofluorescence studies with Fer antibodies are shown in Figure 1 (lower panels). Positive reactivity was observed in the cytoplasm and the nucleus of PC-3 cells (panel a), in support of fractionation studies (Allard *et al.*, 2000). The pre-incubation of Fer antibodies with the purified GST-Fer protein largely decreased immunostaining (panel b) and no reactivity was detected using purified pre-immune immunoglobulins (panel c). This confirmed specificity of immunofluorescence. Moreover, Fer distribution in cytoplasm and nucleus was confirmed by myc antibodies in PC-3 cells overexpressing myc-Fer protein (panel e), also showing high efficiency of transfection and contrasting with the weak immunofluorescence of endogenous myc in parental cells (panel d). Taken together these results indicate that Fer antibodies are suitable for studies on Fer at the protein and cellular levels.



### ***IL-6 induces PC-3 cell growth and the activation of Fer***

Several lines of evidence have suggested that IL-6 controls the growth of human cancer cell lines (Chyczewska and Mroz 1997; Okamoto *et al.*, 1997; Gado *et al.*, 2000; Kurebayashi 2000; Lazar-Molnar *et al.*, 2000), including PC-3 (Chung *et al.*, 1999; Lou *et al.*, 2000). Prior studying effects of exogenous IL-6 on signaling *via* Fer, we first ascertained its effects on PC-3 cell growth. This is shown in Figure 2A, with a 2-fold increase observed by 48 hours of IL-6 treatment as compared to control cells in serum-free conditions. Although modest in comparison to reported effects elicited by serum (Allard *et al.*, 2000), this growth stimulation was significant ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ). Thus we investigated whether Fer might be activated by IL-6. For this purpose and in agreement with the very rapid and transient, i.e. within minutes, activation of tyrosine kinases by cytokines (Ernst *et al.*, 1996; Heinrich *et al.*, 1998), we first demonstrated that IL-6 did not affect overall cellular levels of Fer in PC-3 cells after various time periods while rapidly activating Fer (Figure 2B). Interestingly, Fer phosphotyrosine (pY) content after immunoprecipitation (pY-Fer) changed within minutes of IL-6 stimulation, peaking at 10 minutes, decreasing to almost basal levels after 20 minutes, and increasing again at 30 minutes. Immunoprecipitated Fer protein levels were similar (Fig. 2B). It was estimated by densitometric scanning of pY-Fer bands expressed relatively to immunoprecipitated Fer (right panel of Fig. 2B) that within 10 and 30 minutes, Fer activation had increased by 12.5- and 11-fold, respectively. Results were reproducible ( $n = 4$ ) and changes over time were significant ( $p < 0.001$ ). The transient nature of Fer activation by IL-6 is compatible with the implication of pY-phosphatases in this pathway (Heinrich *et al.*, 1998). Taken together, these findings suggest that Fer is implicated in IL-6 signaling in PC-3 cells.

### ***Fer interacts with gp130 in an IL-6 mediated pathway***

To get further insight in this very rapid kinetic of Fer activation by IL-6, we investigated if Fer may be involved early in this signaling cascade, namely at the IL-6 receptor level. We determined whether Fer forms a complex with the glycoprotein gp130 (IL-6 receptor subunit  $\alpha$ ) in PC-3 cells. Figure 3A shows reciprocal blots

probed with antibodies to detect Fer (left) and gp130 (right) on gp130 and Fer immunoprecipitates. Controls included pre-immune immunoglobulins and whole cell lysates to show Fer and gp130 migration. In both instances, Fer and gp130 were specifically immunoprecipitated, as revealed by blots showing Fer and gp130. Fer was detected in gp130 immunoprecipitate and gp130 in Fer immunoprecipitates. Taken together these results indicate that the IL-6 receptor subunit, gp130, forms endogenous complexes with Fer in PC-3 cells.

We next determined whether gp130/Fer complexes were modulated by IL-6 (Figure 3B). We first showed that during the course of the experiment, i.e. at different time points after stimulation, IL-6 did not alter overall levels of gp130 and Fer but regulated the ability of gp130 to co-immunoprecipitate Fer (left panels). Interestingly, levels of gp130/Fer complexes were maximal by 5 to 10 minutes and decreased afterwards. This time-course was in line with the rapid IL-6 induced tyrosine phosphorylation of the gp130 receptor determined in parallel and maximal at 5 minutes (Fig. 3B). Immunoprecipitated gp130 levels were constant. When average levels of gp130/Fer complexes and pY-gp130 were reported relatively to gp130 protein levels (Fig. 3 B; right panels; n=3), the increases over basal levels by 5 minutes were significant ( $p < 0.001$ ) and represented 1.6- and 2.6-fold levels over time zero, respectively. Together, these results confirmed the IL-6 responsiveness of the PC-3 cell model and are consistent with an action of IL-6 occurring through activation of gp130. The above findings also suggest that IL-6 binding to its receptor is followed by the recruitment and activation of Fer in the gp130 receptor complex.

#### ***Fer constitutively interacts with and phosphorylates STAT3 in PC-3 cells***

Recent studies indicate that Fer interacts with STAT3 in other cell types (Priel-Halachmi *et al.*, 2000; Orlovsky *et al.*, 2002; Taler *et al.*, 2003). Moreover, the overexpression of Fer in COS cells results in enhanced STAT3 tyrosine phosphorylation (Priel-Halachmi *et al.*, 2000). Since Fer is a tyrosine kinase up-regulated in human prostate cancer, tissues and cell lines (Allard *et al.*, 2000), active in PC-3 cells (Allard *et al.*, 2000), and stimulated by IL-6 (Fig. 2B), we tested whether its activation may contribute to STAT3 phosphorylation in this model. We first examined the presence of Fer/STAT3 complexes by probing in reciprocal

experiments, Fer and STAT3 immunoprecipitates with STAT3 and Fer antibodies, respectively. These complexes are illustrated in Figure 4A and were not found in controls obtained using pre-immune immunoglobulins. Western blots showing STAT3 and Fer in corresponding whole cell extracts are also illustrated. Therefore, specific Fer/STAT3 complexes are constitutively found in prostate cancer cells.

To assess the role of Fer in STAT3 activation by tyrosine phosphorylation, we engineered a myc-tagged DN-fer cDNA mutated in the catalytic domain and lacking the autophosphorylation site. Wild type (WT), DN and empty vector (Mk) constructs were next transfected in PC-3 cells. Figure 4B (left) shows the expression of recombinant WT- vs DN-Fer proteins by Western blotting of whole cell lysates. As expected, myc antibodies detected myc-Fer proteins in WT- and DN transfected cells while Fer antibodies recognized both myc-Fer and endogenous Fer. Only endogenous Fer was observed in controls (Mk). The immunoprecipitation using myc and Fer antibodies followed by Western blotting yielded similar results: myc-WT and DN-Fer were detected with myc antibodies (similarly to Fer immunoprecipitate blotted with myc antibodies in Fig. 1) while Fer antibodies revealed myc-Fer and endogenous Fer in WT and DN-cells and endogenous Fer in Mk-transfectants. Fer activity/activation was determined in parallel assays after immunoprecipitation with myc and Fer antibodies by *in vitro* phosphorylation, in-gel kinase assays, and phosphotyrosine blots (Figure 4B, left). Only WT-Fer was active in myc immunoprecipitates and no corresponding bands were detected in DN- as well as in Mk-transfectants. Fer immunoprecipitation and phosphotyrosine blots showed two bands, myc-Fer and endogeneous pY-Fer in WT, no pY-Fer protein in DN, and only endogenous pY-Fer in mock cells. These findings are in line with other reports (Kim and Wong, 1998; Ben Dor *et al.*, 1999, Lunter and Wiche, 2003) and illustrate the dominant negative action of our DN construct on Fer in PC-3 cells.

Based on the above and findings in COS cells (Priel-Halachmi *et al.*, 2000), we determined if overexpression of DN-Fer in PC-3 cells would affect STAT3, Fer/STAT3 complexes, and STAT3 activation (Fig. 4C). Levels of STAT3 in lysates were unchanged in cells overexpressing WT and DN-Fer. Moreover, as shown by myc immunoprecipitation and STAT3 blots, expression of DN-Fer did not affect Fer/STAT3 complexes. On the other hand, the activation of STAT3 was largely impaired. This was shown by direct Western blotting with pY-STAT3 antibodies and phosphotyrosine blots of STAT3 immunoprecipitates. Furthermore, no STAT3

tyrosine phosphorylation was detected when probing enriched pY-proteins for the presence of STAT3 in PC-3 cells overexpressing DN-Fer (Fig. 4C). These results are consistent with an earlier report showing that transfection of DN-Fer in COS cells hampers STAT3 function (Priel-Halachmi *et al.*, 2000). Therefore, the formation of Fer/STAT3 heteromers does not depend on Fer activity and Fer appears to be the main kinase responsible for STAT3 activation in PC-3 cells.

#### ***IL-6 modulates the level of Fer/STAT3 complexes***

The Fes protein was reported to regulate STAT3 activation in IL-6 stimulated hematopoietic cells (Hackenmiller *et al.*, 2000). Since the Fes protein was not detected in PC-3 cells (data not shown), we investigated whether Fer may fulfill a similar function in controlling Fer/STAT3 interaction under IL-6 stimulation. We first ascertained that STAT3 and Fer protein levels (as in Fig. 2B) were unchanged during the 30 min time-course stimulation with IL-6 (Fig. 5, left panel). We next demonstrated that Fer/STAT3 and Fer/pY-STAT3 complexes fluctuated according to a bimodal curve with maximal increases observed by 10 and 30 minutes reminiscent of the kinetic of Fer activation (Figure 2B). This kinetic also suggest some regulation by phosphatases. Immunoprecipitated Fer and STAT3 protein levels are shown. Figure 5 (right panels) shows variations in averages levels of Fer/STAT3 and Fer/pY-STAT3 complexes over time of IL-6 stimulation, with significant increases at both 10 and 30 minutes ( $p < 0.005$ ) in comparison to basal levels at time 0 ( $n=3$ ). Levels were 2.6- and 2.3-fold higher by 10 minutes and 1.7 and 1.5-fold by 30 minutes, respectively. Together, these findings indicate that in PC-3 cells, Fer is constitutively associated with STAT3 and that STAT3 activation is linked to Fer activity. Moreover the parallel activation of Fer and of pY-STAT3 in Fer complexes under IL-6 stimulation suggests that the two proteins may function in concert in these cells.

#### ***The intracellular distribution of Fer in PC-3 is regulated by IL-6***

The signaling cascade downstream of the IL-6 receptor is well documented. Tyrosine phosphorylation of STAT proteins induces dimerization in the cytoplasm and translocation of activated STAT3 dimers into the nucleus (Ihle, 1996). Fer bears

a NLS and has been shown to translocate into the nucleus (Ben-Dor *et al.*, 1999). Based on the even distribution of Fer in the cytoplasm and the nucleus of PC-3 cells (Allard *et al.*, 2000), the above kinetics (Fer activation and Fer/STAT3 complexes), and the relationship between Fer activity and pY-STAT3, we investigated whether over time, IL-6 may affect Fer distribution in PC-3 cells. This was first tested in cells, comparing unstimulated (time 0) to time-points 10 and 30 minutes (bimodal kinetics) corresponding to maximal levels of Fer activation and Fer/STAT3 complexes in response to IL-6 stimulation. Fixed cells were stained using antibodies against Fer and STAT3 and examined by immunofluorescence (Fig. 6A). The two proteins were distributed throughout the cytoplasm and the nucleus of unstimulated cells. At 10 minutes of IL-6 exposure, the immunoreactivity initially diffuse in the cytoplasm for both Fer and STAT3 antibodies was particularly concentrated in this compartment while, at 30 minutes, it was mostly confined in the nucleus. The displayed immunoreactivity for Fer and STAT3 at 30 minutes is also illustrated by merged images contrasting the PC-3 cell actin cytoskeleton, either stained with actin antibodies (data not shown) or phalloidin, with nuclear Fer and STAT3. Similar results were observed for pY-STAT3 in PC-3 cells as well as with myc antibodies in PC-3 cells overexpressing WT-Fer exposed to IL-6 (shown in Fig. 6A at 30 min). These observations in parental (physiologic situation) and transfected cells highly suggest that IL-6 drives Fer translocation from the cytoplasm in the PC-3 nucleus, similarly to reports on cytokine-mediated signaling through STAT proteins in diverse cell types (Schaper *et al.*, 1998, Harre *et al.*, 2002). As they also suggested that Fer and STAT3 may form nuclear complexes, PC-3 cell cytoplasmic and nuclear proteins were tested for Fer, STAT3, and pY-STAT3 as well as for complexes following IL-6 stimulation, with emphasis on their presence in nuclear fractions. Results are shown in Figures 6B and 6C. Western blotting results reflected observations seen by immunofluorescence (Fig. 6A), with on a time basis higher nuclear to cytoplasmic ratio for each protein at 30 minutes (Fig. 6B). The co-precipitation of STAT3 and pY-STAT3 with Fer immunoprecipitates demonstrate changes in levels of cytoplasmic and nuclear Fer complexes according to time of IL-6 treatment. They were maximal for Fer/STAT3 in cytoplasmic extracts at 10 minutes and at 30 minutes for Fer/pY-STAT3 in nuclear fractions (Fig. 6B). The relative enrichment of fractions is also shown (Fig. 6C; cortactin and nucleolin blots as cytoplasmic and nuclear markers). Other markers yielded (Raf-1, paxillin, histone

H1, and histone acetyltransferase) yielded similar results (data not shown). These observations demonstrate that IL-6 modulates the intracellular distribution of Fer. Moreover, Fer forms signaling complexes with STAT3 and pY-STAT3 in the nucleus. Since activated STAT3 dimers ultimately act at the chromatin level to activate transcription (Chen *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 2001), we tested the presence of Fer/STAT3 complexes in the chromatin 30 minutes after IL-6 stimulation. Figure 6C shows a relative enrichment of Fer/STAT3 complexes, including pY-Fer in the chromatin vs nucleosolic protein fractions. Moreover, fractionation of the chromatin by micrococcal nuclease digestion (Fig. 6C, histones- and DNA-enriched) indicated the presence of Fer and STAT3 in the DNA matrix. Thus nuclear Fer/STAT3 complexes were detected in the chromatin of IL-6 stimulated PC-3 cells where Fer was also activated. Moreover, the two proteins were found in the DNA fraction.

#### ***Fer and STAT3 in prostate cancer***

The significance of these findings in PC-3 cells was ascertained by immunohistochemistry in a small series of surgical prostate cancer specimens. Adjacent sections were stained for Fer and STAT3 expression. Representative photomicrographs are presented (Figure 7). In accordance with results shown in Figure 1 on Fer antibodies, Fer staining was specific and no immunoreactivity was detected on sections when omitting the primary antibody or when the antibody was pre-incubated with the antigen (Fer-GST fusion protein) (data not shown). In general, Fer staining was clearly positive in prostate cancer and detected in the cytoplasm and the nucleus of tumour cells, while faint or no staining was detected in epithelial cells of non-malignant areas of the same sections (Figure 7). For STAT3, positive staining was seen in both non-malignant and malignant areas (Figure. 7), with higher intensity in cancer and consistent with the literature (Mora *et al.*, 2002). Of interest was the distribution of the two proteins on adjacent sections, often seen in the nucleus and the cytoplasm of the same subsets of tumour cells. Taken together, these findings suggest that Fer is an important element of the IL-6 signaling pathway in human prostate cancer and uses gp130 and STAT3 as partners.

## Discussion

Cytokine signaling has become increasingly more complex than initially thought, with action on cell types other than hematopoietic and involving not only classical the TK members of the JAK family (Taga 1996). Indeed, the present investigation provides insights on the contribution of Fer as the major tyrosine kinase implicated in the IL-6 pathway in the human PC-3 cell line mimicking the androgen-independent stage of prostate cancer (Wilding *et al.*, 1989; Lokeshwar and Block 1992) and *in situ* in tumours. Moreover, several findings on Fer represent novel observations that may apply to IL-6 signaling in general and other systems as well.

We ascertained by biochemical means and immunofluorescence/histochemistry studies that the novel Fer polyclonal antibody produced against a Fer-GST fusion protein represented a highly valuable tool to carry out the present study on Fer in prostate cancer cells and tissues. Fer antibodies specifically detected and immunoprecipitated both endogeneous Fer (94 kDa protein and active TK) and the recombinant myc-tagged protein and revealed its presence in the cytoplasm and the nucleus of prostate cancer cells, in agreement with earlier fractionation studies (Allard *et al.* 2000). We next confirmed the IL-6 stimulatory effects on PC-3 cell growth, as reported in the literature (Hirano *et al.*, 2000; Lou *et al.*, 2000) and showed that downstream signaling occurs through the rapid and transient tyrosine phosphorylation of the gp130 receptor subunit and STAT3 (Lou *et al.*, 2000). Our observations on Fer (kinetic and fractionation studies, use of fluorescence microscopy, DN- vs WT- Fer, and levels of complexes with gp130 and STAT3/pY-STAT3) strongly suggest that Fer fulfills this function in PC-3 cells. Indeed, Fer appeared as the predominant kinase of the IL-6 pathway that activates STAT3 in these cells and escorts this transcription factor in its ultimate site of action in the nucleus, the chromatin. Of particular interest was the bimodal kinetic of Fer activation by IL-6, which paralleled the formation of several signaling complexes with time following addition of the cytokine and also suggested the implication of pY-phosphatases (Heinrich *et al.*, 1998). The first Fer-induced complex implicated the gp130 receptor subunit itself. In fact, the maximal interaction between Fer and gp130 corresponded to the time period where gp130 was rapidly and maximally tyrosine phosphorylated upon IL-6 stimulation. Therefore, gp130/Fer complexes likely reflect the initial activation step required for signaling through TKs following IL-

6 binding to its receptor (Arzt 2001). Since this occurred within the first phase of Fer activation by IL-6, it is possible that IL-6 triggered the recruitment of Fer by gp130 and then, activated Fer phosphorylates gp130. These novel findings on IL-6 modulated gp130/Fer complexes in PC-3 cells resemble the situation reported for Fes in hematopoietic cells (Matsuda *et al.*, 1995). In general, this step is followed by the recruitment of and activation of STATs by TKs and then by the nuclear translocation of activated STATs for activation of transcription (Taga 1996; Hirano *et al.*, 2000). In the IL-6/PC-3 setting, several of these events were reproduced but implicated Fer. IL-6 induced the formation of STAT3 complexes with a tyrosine kinase, Fer in parallel with the activation of STAT3 (pY-STAT3) and STAT3 nuclear translocation. More importantly and in addition to Fer activation, IL-6 regulated Fer intracellular distribution and induced its translocation from the cytoplasm to the nucleus. In addition, Fer was found in pY-STAT3 nuclear complexes at particularly elevated levels. Moreover, nuclear Fer and STAT3 proteins remained associated in chromatin complexes and substantial levels of the two proteins were detected in the DNA matrix. Taken together, these findings support the implication of Fer in IL-6 signaling up to the nucleus, a novel function that has not been described for JAK kinases (Horn *et al.*, 2000) or else, for Fes in IL-6 stimulated hematopoietic cells (Hackenmiller *et al.*, 2000).

Another significant finding for IL-6 signaling in PC-3 cells was the link between active Fer protein and STAT3 activation. As shown by transient expression of the recombinant inactive protein, the DN-Fer was found in signaling complexes with STAT3, similarly to WT-Fer. This implies that molecular interactions between Fer and STAT3 are unlikely mediated *via* their SH2 domains but may possibly occur through coiled-coil domains. Of particular interest was the observation that in PC-3 cells overexpressing DN-Fer, the overall STAT3 tyrosine phosphorylation was drastically reduced and not only the portion found in Fer complexes. This suggests that DN-Fer inhibited endogenous Fer. This most likely occurred through Fer oligomerization (Craig and Greer, 1999), although similarly to several other reports (Kim and Wong, 1998; Lunter and Wiche, 2003), complexes between ectopic Fer with the endogenous protein were not detected. Nonetheless, our findings in PC-3 cells argue for a major role of Fer in IL-6 signaling and activation of STAT3. Moreover, a similar mechanism appears to apply in the LNCaP model (manuscript under preparation), a prostate cancer cell line where IL-6 mimics the action of



androgens *via* cross talks between androgen receptors and STAT3 (Lin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2002). Moreover, the modulation of Fer/STAT3 complexes by other factors was recently reported in other cell lines, for instance by interferon-gamma in human colon cancer cells (Orlovsky *et al.*, 2002) and by insulin in myogenic cells where JAKs interact with Fer (Taler *et al.*, 2003). JAKs expression was reported in prostate cancer (Chott *et al.*, 1999) but our findings in PC-3 cells appears to minimize the contribution of other TKs (no detection of Fes; data not shown) in IL-6 mediated STAT3 activation. This assumption is based on the non detection of STAT3 among tyrosine phosphorylated proteins in PC-3 cells overexpressing DN-Fer as well as particularly elevated nuclear pY-STAT3 in Fer complexes after IL-6 stimulation. With Fer/pY-STAT3 complexes present in the chromatin and both proteins found in the DNA, it is conceivable that Fer activity may be determinant for IL-6 mediated STAT3 activation and function in the PC-3 nucleus, as suggested by findings on activated STAT3 binding to DNA regulatory sequences in COS cells overexpressing Fer (Priel-Halachmi *et al.*, 2000). Based on the literature and our findings on Fer in IL-6 stimulated prostate cancer cells, we adapted the model of Hackenmiller *et al.* (2000) (Fig. 8). We are proposing that Fer is determinant for the activation of transcription factors such as STAT3 for its action at the gene level in cancer cells.

The physiological role of Fer and its implication in diseases is still elusive. For instance, data in transgenic mice expressing an inactive Fer protein indicate that Fer activity is not critical for embryogenesis and post-natal development (Craig *et al.*, 2001). However and although Fer transcripts are apparently ubiquitously expressed (Pawson *et al.*, 1989), some regulation of Fer protein expression likely takes place in organs. For instance in the normal human and dog prostate, Fer is barely detectable or expressed at very low level when the differentiated luminal epithelium predominates (Allard *et al.*, 2000). On the other hand in the dog model, high Fer levels are associated with basal cell metaplasia *in vivo* and basal/stem cell growth in primary culture (Allard *et al.*, 2000). Therefore, a more generalized relationship between Fer and growth may exist *in vivo* and possibly depends on hormones and cell phenotypes in certain organs. Fer protein levels are also up-regulated in human prostate cancer tissues. Moreover, reducing Fer levels in PC-3 cells drastically slows down growth *in vitro* and no null clones were recovered (Allard *et al.*, 2000). This may be explained by effects of Fer on levels of tyrosine

phosphorylated transcription factors, such as STAT3 in the cell nucleus. Whether nuclear Fer exerts a similar role in normal vs malignant cells is unknown but there are supporting observations: 1) Fer binding to the chromatin (Hao *et al.*, 1991); 2) Fer interactions and action on other transcription factors, such as TMF (Schwartz *et al.*, 1998); and 3) Fer translocation in the nucleus with the onset of DNA synthesis (in G1/S) (Ben-Dor *et al.*, 1999). On the other hand, while the issue of the uniqueness of Fer subcellular distribution in certain cell types, exclusively seen in the nucleus or in cytoplasm, remains a matter of controversy (Ben-Dor *et al.*, 1999; Zirngibl *et al.*, 2001; Greer, 2002), Fer was found in the two cell compartments in prostate cancer, in both cell lines and tissue sections (Allard *et al.*, 2000; and present study). These findings are thus compatible with Fer functional changes according to its intracellular localization and interactions with different partners.

In the context of prostate cancer, the IL-6 autocrine growth-stimulatory loop is apparently characteristic of more advanced or androgen-refractory stage of the disease (Simard and Gingras 2001; Smith *et al.*, 2001). The PC-3 model is regarded as being representative (Chung *et al.*, 1999). Based on *in vitro* findings, Fer may figure as a missing effector acting downstream in the IL-6 pathway and needed for progression. A dysregulated Fer expression in prostate cancer was suggested by Western blotting experiments (Allard *et al.*, 2000) and further demonstrated by immunohistochemistry on prostate cancer specimens. Fer staining was high in tumour cells and low in cells of nearby non malignant areas within the same sections. Of interest was Fer distribution in the cytoplasm and the nucleus of malignant cells, resembling PC-3, as well as STAT3 staining often seen in the same tumour cell subpopulations in adjacent sections. Our findings on Fer are thus in line with reports on the up-regulation of diverse components of the IL-6 signaling pathway (IL-6, gp130, STAT3 and pY-STAT3) in human prostate cancer (Mori *et al.*, 1999; Lou *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). An ongoing study on a larger cohort of patients will establish whether Fer expression levels and nuclear distribution reflect its activation correlate with progression and poor prognosis.

Overall, the present investigation confirms and extends reported findings on the role of Fer in diverse cell models in general and in the cytokine signaling pathway in particular. Our findings support the concept that Fer expression, function, and regulated activation likely depend on phenotypes, subcellular distribution, and partners. We identified gp130 and STAT3 as constitutively

associated Fer partners in prostate cancer cells and demonstrated that levels of complexes were modulated by IL-6 in parallel with Fer activation. Furthermore, since Fer was essential for the activation of STAT3, this implies that Fer acts as the major tyrosine kinase upstream of STAT3 in PC-3 cells. Based on nuclear Fer/STAT3 complexes, including in prostate cancer, and more importantly, nuclear Fer/pY-STAT3 complexes, activated Fer in the chromatin, and the two proteins in the DNA, we propose that Fer maintains elevated levels of activated transcription factors in the nucleus for the regulation of gene expression.

### **Acknowledgements**

The research was supported by funds from the Cancer Research Society Inc. and the Dept of Urology, McGill University Health Center. This work was presented at the 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, DC, July 2003. Ms Zoubeidi received a studentship from the Dept of Biochemistry, Faculty of Graduate Studies, University of Montreal, and Dr Aprikian was a recipient of a Chercheur Boursier Scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## Legends

### Figure 1: Fer antibodies

Immunoglobulins purified from pre-immune (IgG) and immune (Fer) rabbit sera were tested for their ability to detect Fer in PC-3 cells. Upper left panels: Western blotting with Fer antibodies (1:3000, 1hr) and pre-immune IgGs (1:3000, 1hr) showing the 94 kDa Fer protein relative to the position of molecular markers in whole cell lysates. To assess specificity, Fer antibodies were pre-incubated in the presence of 0, 2, 5, and 10  $\mu$ g of GST-Fer fusion protein for 15 min at room temperature prior Western blotting. Upper right panels: Fer immunoprecipitation (IP). Pre-immune IgG and Fer antibodies were used for IPs, as described in Methods. Fer kinase activity was next tested by *in vitro* phosphorylation in the presence of radiolabelled ATP, resolved by SDS-PAGE and submitted to autoradiography after alkali treatment (see Methods). The recombinant Fer protein was obtained from PC-3 cells transfected with WT-*fer* cDNA tagged with a myc-his epitope, using 4 and 8  $\mu$ g of Fer antibodies for IP, followed by Western blotting using myc antibodies (1:5000; 1hr).

Lower panels: Photomicrographs showing Fer distribution in PC-3 cells by immunofluorescence staining. Cells were fixed and stained with Fer antibodies (a), and competed for using 10  $\mu$ g of purified GST-Fer protein (b) Control pre-immune IgG are shown (c). PC-3 cells were stained with myc antibodies. Parental (d) and transfected with myc-*fer* cDNA (WT) (e). Magnification: 400X

### Figure 2. IL-6 modulation of PC-3 growth and Fer tyrosine phosphorylation.

(A) PC-3 cells were serum starved for 48 hours and treated with or without 100ng/ml of IL-6 in serum-free medium as described in Methods. Growth was monitored by MTT assays (n=3; p<0.001).

(B) Serum-starved PC-3 cells were stimulated with IL-6 as above for indicated time. Whole cell lysates (30 $\mu$ g proteins) were resolved in SDS-PAGE, transferred on

membranes and probed with Fer antibodies (upper left panel) for Western blot analysis. IP (750 $\mu$ g proteins) was carried out with Fer antibodies and followed by Western blotting with pY antibody (1:3000 for 1h) (middle left panel). The membrane was stripped and reprobed with Fer antibodies (lower left panel), as above. Representative IP/blots from four independent experiments are shown. Average Fer activation was determined by densitometric scanning of pY-Fer blots and reported relatively to IP Fer protein levels. Arbitrary units were plotted over time of exposure to IL-6 (right panel) and analyzed for statistical significance, as described in Methods. (\*) indicates maximal effects of IL-6 over basal levels at time 0.

**Figure 3:** Constitutive association of Fer with gp130 and regulation by IL-6 in PC-3 cells.

(A) PC-3 cell lysates were IP using either control pre-immune IgG, gp130, or Fer antibodies. Blots were probed with antibodies to detect Fer as above (left upper panel) and gp130 (1:2000; 1h)(right upper panel). Fer and gp130 in PC-3 whole cell lysates (WL; 30  $\mu$ g proteins) are shown in lanes 1 and molecular weight markers.

(B) Serum-starved PC-3 cells were stimulated with IL-6 as above for indicated time. Whole cell lysates (30 $\mu$ g proteins) were resolved in SDS-PAGE, transferred on membranes and probed with gp130 and Fer antibodies (upper left panel) for Western blot analysis. IP was carried out (750 $\mu$ g proteins) with gp130 antibodies and blots were probed with Fer and pY antibodies, respectively. The lower left panel shows equal levels of gp130 in IPs. Representative blots from four independent experiments are shown. Right panels. Average levels of gp130/Fer complexes (upper) and pY-gp130 (lower) reported relatively to gp130 levels were obtained after densitometric scanning. Arbitrary units over time of exposure to IL-6 are shown. (\*) indicates maximal effects of IL-6 over basal levels at time 0.

**Figure 4:** Fer constitutively interacts with and phosphorylates STAT3 in PC-3 cells.

(A) Whole PC-3 cell lysates (750 $\mu$ g proteins) were IP with control IgG, Fer, and STAT3 antibodies (2 $\mu$ g) and blotted to detect Fer (left), as above, and STAT3

(1:1000 overnight; right). Fer and STAT3 in whole cell lysates (WL; 30  $\mu$ g proteins) are shown and molecular markers.

(B) Ectopic Fer proteins. PC-3 cells were transfected with 5  $\mu$ g of plasmids expressing myc-Fer wild type (WT), myc-Fer<sub>K592R-Y719P</sub> double negative (DN), or empty vector/Mock (Mk). Cell lysates were afterwards analyzed by Western blotting with myc and Fer antibodies to detect endogenous and ectopic Fer. Whole cell lysates were subjected to IP with myc and Fer antibodies to detect myc-Fer and Fer, respectively. Fer activity was determined using myc-IPs, as tested by *in vitro* phosphorylation in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, followed by SDS-PAGE, alkali treatment of gels and autoradiography. In-gel kinase assays of myc-Fer IPs are shown after *in situ* renaturation. Western blotting with pY-antibodies of myc and Fer IPs were performed in parallel to show activation of myc-Fer and Fer, respectively.

(C) Whole lysates from transfected PC-3 cells (WT vs DN-fer constructs) were resolved by SDS-PAGE and probed with STAT3 and pY-STAT3 antibodies in Western blot analysis. The extent of STAT3 activation was also assessed using myc, STAT3, and pY- IPs probed to detect STAT3 or pY, by Western blotting as indicated.

**Figure 5:** IL-6 modulates levels of Fer/STAT3 complexes and STAT3 activation in PC-3 cells.

Serum-starved PC-3 cells were stimulated with IL-6 as above for indicated time. Whole cell lysates (30  $\mu$ g proteins) were resolved in SDS-PAGE, transferred on membranes and probed with STAT3 and Fer antibodies (upper left panel) for Western blot analysis. IP was carried out (750  $\mu$ g proteins) with Fer antibodies and blots were probed with STAT3 and pY-STAT3 (1:1000 dilution of antibody, overnight) antibodies, respectively. Each membrane was stripped and reprobed to ensure equal IP Fer levels. Right panels. The average levels of Fer/STAT3 and Fer/pY-STAT3 complexes over time of IL-6 exposure from three independent experiments were reported to Fer levels in IPs after scanning, as above (right panels). (\*) indicates maximal effects of IL-6 over basal levels at time 0.

**Figure 6:** IL-6 and the intracellular distribution of Fer in PC-3 cells.

PC-3 cells were exposed to IL-6 for 0, 10 and 30 min. The 10- and 30-min time periods were selected as they corresponded to highest phosphorylation states of Fer and maximal levels of Fer/STAT3 complexes. Cells were fixed and stained with Fer (left) and STAT3 (right) antibodies and revealed by fluorescence (green), as described in Methods. In some instances, cells were double-stained with phalloidin to visualize the actin cytoskeleton (red). Merged images (green/red) are shown for each series at 30 min, including for pY-STAT3. Experiments were repeated at least 5 times and yielded similar staining patterns in a majority of cells (representative photomicrographs are shown). Controls (untreated) and IL-6 stimulated (30min) PC-3 cells overexpressing ectopic myc-Fer were stained with myc antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Magnification (400X).

(B) Distribution of Fer and STAT3 complexes in IL-6 stimulated PC-3 cells.

Cytoplasmic and nuclear protein fractions from whole PC-3 cell lysates after IL-6 stimulation for 0, 10, and 30 min were processed as above and probed to detect Fer, STAT3 and pY-STAT3. Fer was then IP and tested by Western blotting to detect STAT3 and pY-STAT3.

(C) PC-3 cell nuclei were further fractionated according to Kreitz et al. (2001) to obtain the nucleosolic (Nuc) and chromatin (Chr) fractions in addition to the cytoplasmic (Cyt) proteins. Fer was IP and probed with antibodies to detect STAT3 and the extent of Fer activation using pY antibodies (left panels). The chromatin fraction was digested with micrococcal nuclease to obtain a S1 supernatant, an histone-enriched S2 fraction, and a final nuclear matrix fraction or DNA pellet (P). Fractions were analyzed to detect Fer and STAT3 by Western blotting as indicated (right panels). Each experiment was reproduced at least three times. Representative results are presented. The relative enrichment of subcellular fractions is shown in lower panels, using nucleolin (1:2000) and cortactin (1:3000) antibodies as nuclear (N) and cytoplasmic (Cyt) markers, respectively. The histone pattern with molecular markers (MW) and relative enrichment in DNA were examined by Coomassie staining (middle panel) and agarose gel electrophoresis after deproteinization (right panel), respectively.

**Figure 7:** Photomicrographs of human prostate tissue sections stained for Fer and STAT3 expression.



Fer (left) and STAT3 (right) staining in non malignant (upper) and malignant (lower panels) areas of adjacent prostate tissue sections. Magnification 100X.

**Figure 8.** Schematic representation of IL-6 signaling through Fer in prostate cancer cells, as adapted from Hackenmiller *et al.* (2000).

## References

- Allard P, Atfi A, Landry F, Chapdelaine A and Chevalier S. (1997). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **126**, 25-34.
- Allard P, Zoubeidi A, Nguyen LT, Tessier S, Tanguay S, Chevrette M, Aprikian A and Chevalier S. (2000). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **159**, 63-77.
- Arzt E. (2001). *J. Clin. Invest.*, **108**, 1729-33.
- Ben-Dor I, Bern O, Tennenbaum T and Nir U. (1999). *Cell. Growth. Differ.*, **10**, 113-29.
- Bradford MM. (1976). *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54.
- Chen T, Wang LH and Farrar WL. (2000). *Cancer Res.*, **60**, 2132-5.
- Chott A, Sun Z, Morganstern D, Pan J, Li T, Susani M, Mosberger I, Upton MP, Bublej GJ, Balk SP. (1999). *Am J Pathol.*, **155**, 1271-9.
- Chung TD, Yu JJ, Spiotto MT, Bartkowski M and Simons JW. (1999). *Prostate*, **38**, 199-207.
- Chyczewska E and Mroz RM. (1997). *Rocz. Akad. Med. Bialymst.*, **42 Suppl 1**, 8-22.
- Craig AW and Greer PA. (2002). *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 6363-74.
- Craig AW, Zirngibl R, Williams K, Cole LA and Greer PA. (2001). *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 603-13.
- Durocher Y, Chapdelaine A and Chevalier S. (1992). *Biochem. J.*, **284 ( Pt 3)**, 653-8.

- Ernst M, Oates A, Dunn AR. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 30136-43.
- Gado K, Domjan G, Hegyesi H and Falus A. (2000). *Cell. Biol. Int.*, **24**, 195-209.
- Greer P. (2002). *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 278-89.
- Hackenmiller R, Kim J, Feldman RA and Simon MC. (2000). *Immunity*, **13**, 397-407.
- Hao QL, Ferris DK, White G, Heisterkamp N and Groffen J. (1991). *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1180-3.
- Harre EM, Roth J, Pehl U, Kueth M, Gerstberger R, Hubschle T. (2002), *J. Appl. Physiol.*, **92**, 2657-66.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Grave L. (1998) *Biochem. J.* **334**; 297-314
- Hirano T, Ishihara K and Hibi M. (2000). *Oncogene*, **19**, 2548-56.
- Horn F, Henze C and Heidrich K. (2000). *Immunobiology*, **202**, 151-67.
- Ihle JN. (1996) *Cell*, **84**, 331-4
- Iwanishi M, Czech MP and Cherniack AD. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 38995-9000.
- Kim L and Wong TW. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4553-61.
- Kim L and Wong TW. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 23542-8.
- Kreitz S, Ritzi M, Baack M and Knippers R. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 6337-42.
- Kurebayashi J. (2000). *Breast Cancer*, **7**, 124-9.

- Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S and Falus A. (2000). *Cytokine*, **12**, 547-54.
- Lin DL, Whitney MC, Yao Z and Keller ET. (2001). *Clin. Cancer Res.*, **7**, 1773-81.
- Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Klausner A, Preston C, Holland JF and Levine AC. (2002). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 249-55.
- Lokeshwar BL and Block NL. (1992). *Cancer Res.*, **52**, 5821-5.
- Lou W, Ni Z, Dyer K, Tweardy DJ and Gao AC. (2000). *Prostate*, **42**, 239-42.
- Lunter PC and Wiche G. (2002). *Biochem. Biophys. Re. Commun.*, **296**, 904-10.
- Matsuda T, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Okuyama Y, Fujitani Y, Hanazono Y, Hirai H, Hirano T. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 11037-9
- Matsuda T, Junicho A, Yamamoto T, Kishi H, Korkmaz K, Saatcioglu F, Fuse H and Muraguchi A. (2001). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 179-87.
- Mora LB, Buettner R, Seigne J, Diaz J, Ahmad N, Garcia R, Bowman T, Falcone R, Fairclough R, Cantor A, Muro-Cacho C, Livingston S, Karras J, Pow-Sang J and Jove R. (2002). *Cancer Res.*, **62**, 6659-66.
- Mori S, Murakami-Mori K and Bonavida B. (1999). *Anticancer Res.*, **19**, 1011-5.
- Okamoto M, Lee C and Oyasu R. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 141-6.
- Orlovsky K, Theodor L, Malovani H, Chowers Y and Nir U. (2002). *Oncogene*, **21**, 4997-5001.
- Owens LV, Xu L, Marston WA, Yang X, Farber MA, Iacocca MV, Cance WG and Keagy BA. (2001). *J. Vasc. Surg.*, **34**, 344-9.

- Pawson T, Letwin K, Lee T, Hao QL, Heisterkamp N and Groffen J. (1989). *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5722-5.
- Priel-Halachmi S, Ben-Dor I, Shpungin S, Tennenbaum T, Molavani H, Bachrach M, Salzberg S and Nir U. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 28902-10.
- Rosato R, Veltmaat JM, Groffen J and Heisterkamp N. (1998). *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5762-70.
- Schaper F, Gendo C, Eck M, Schmitz J, Grimm C, Anhuf D, Kerr IM, Heinrich PC. (1998) *Biochem. J.*, **335** ( Pt 3):557-65.
- Schwartz Y, Ben-Dor I, Navon A, Motro B and Nir U. (1998). *FEBS Lett.*, **434**, 339-45.
- Simard J and Gingras S. (2001). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **171**, 25-40.
- Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z and Keller ET. (2001). *Cytokine Growth Factor Rev.*, **12**, 33-40.
- Taga T. (1996). *J. Neurochem.*, **67**, 1-10.
- Taler M, Shpungin S, Salem Y, Malovani H, Pader O, Nir U. (2003). *Mol Endocrinol.* May 8 [Epub ahead of print].
- Ueda T, Bruchovsky N and Sadar MD. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 7076-85.
- Wilding G, Zugmeier G, Knabbe C, Flanders K and Gelmann E. (1989). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **62**, 79-87.
- Zirngibl R, Schulze D, Mirski SE, Cole SP, Greer PA. (2001). *Exp. Cell. Res.*, **266**, 87-94

Figure 1

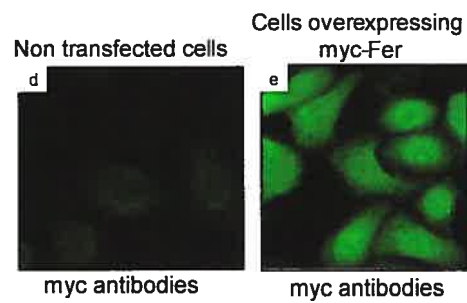
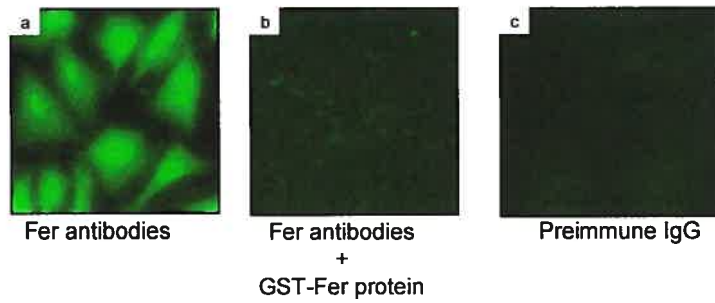
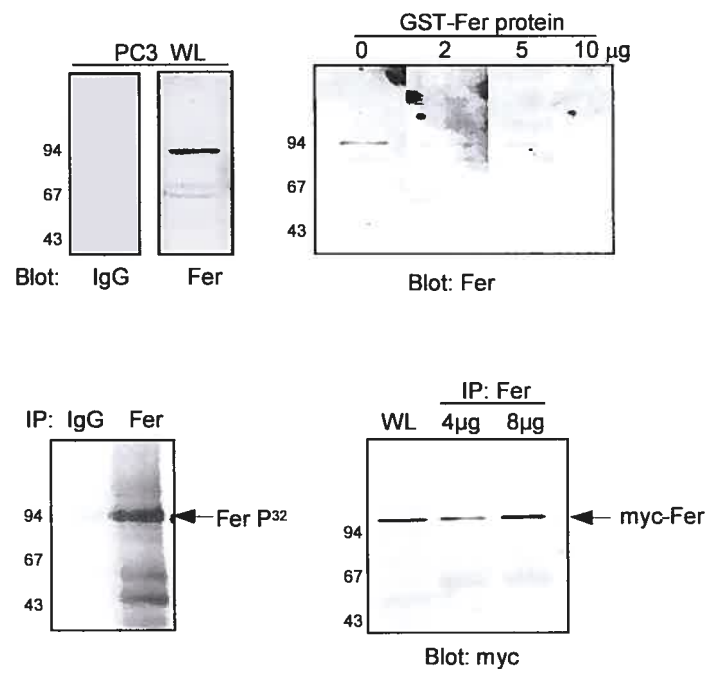
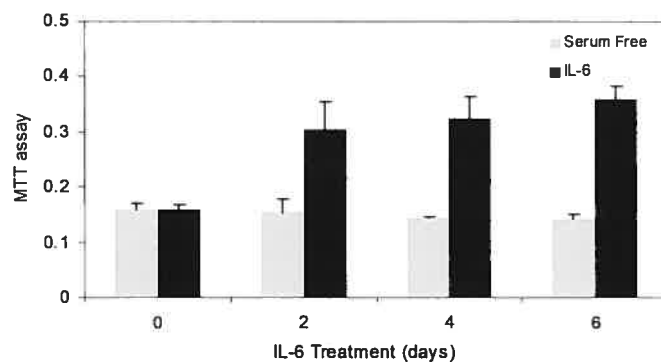
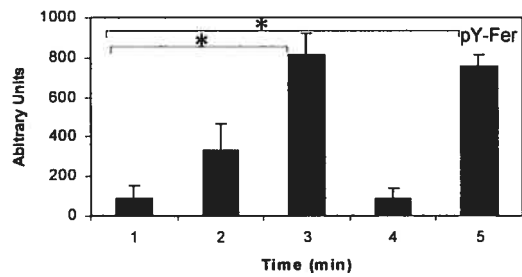
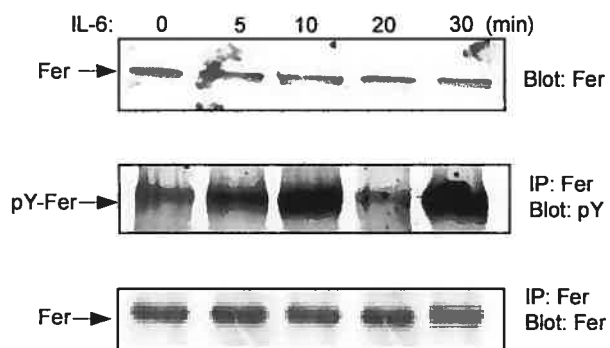


Figure 2

A



B



**Figure 3**

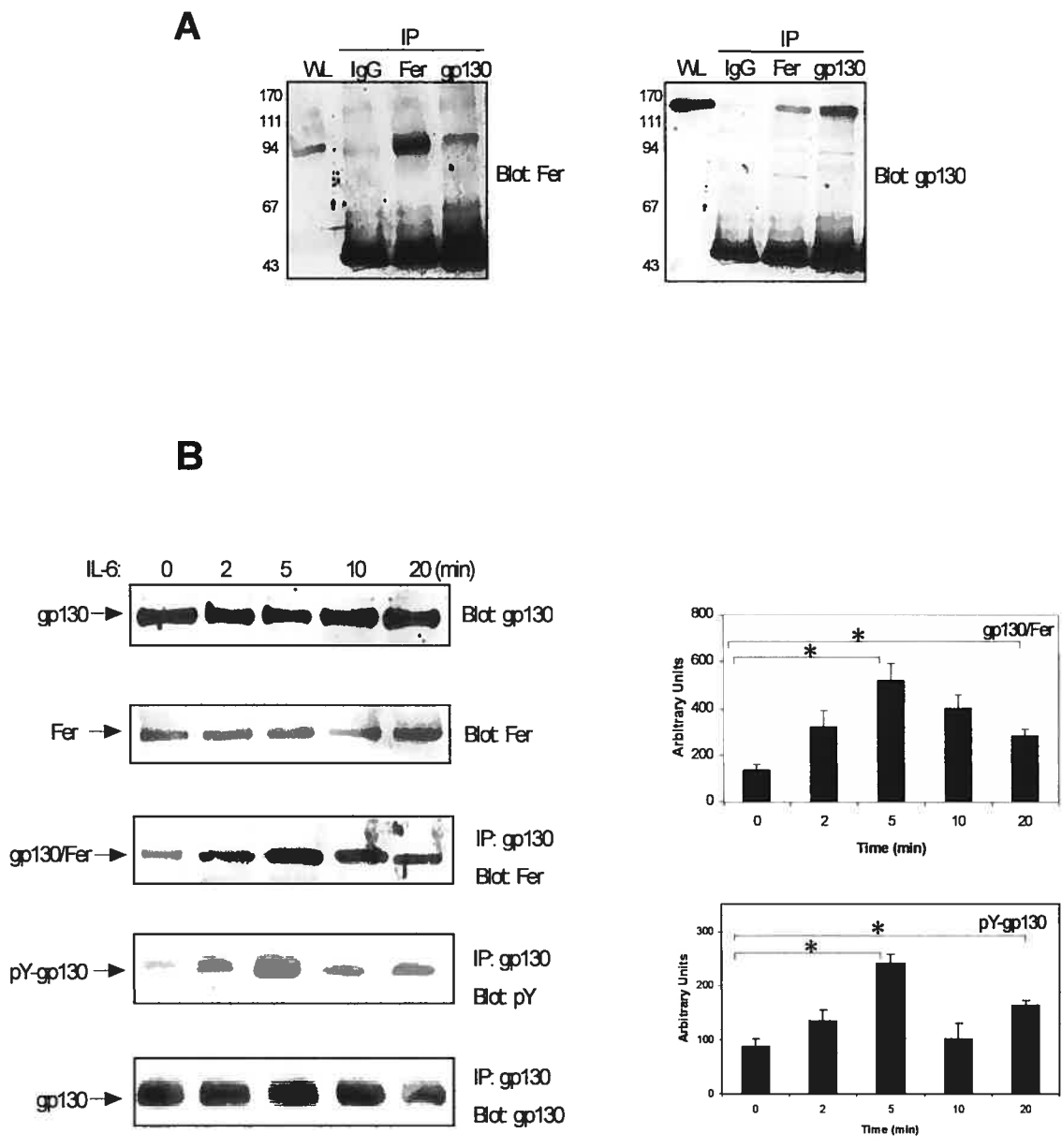




Figure 4

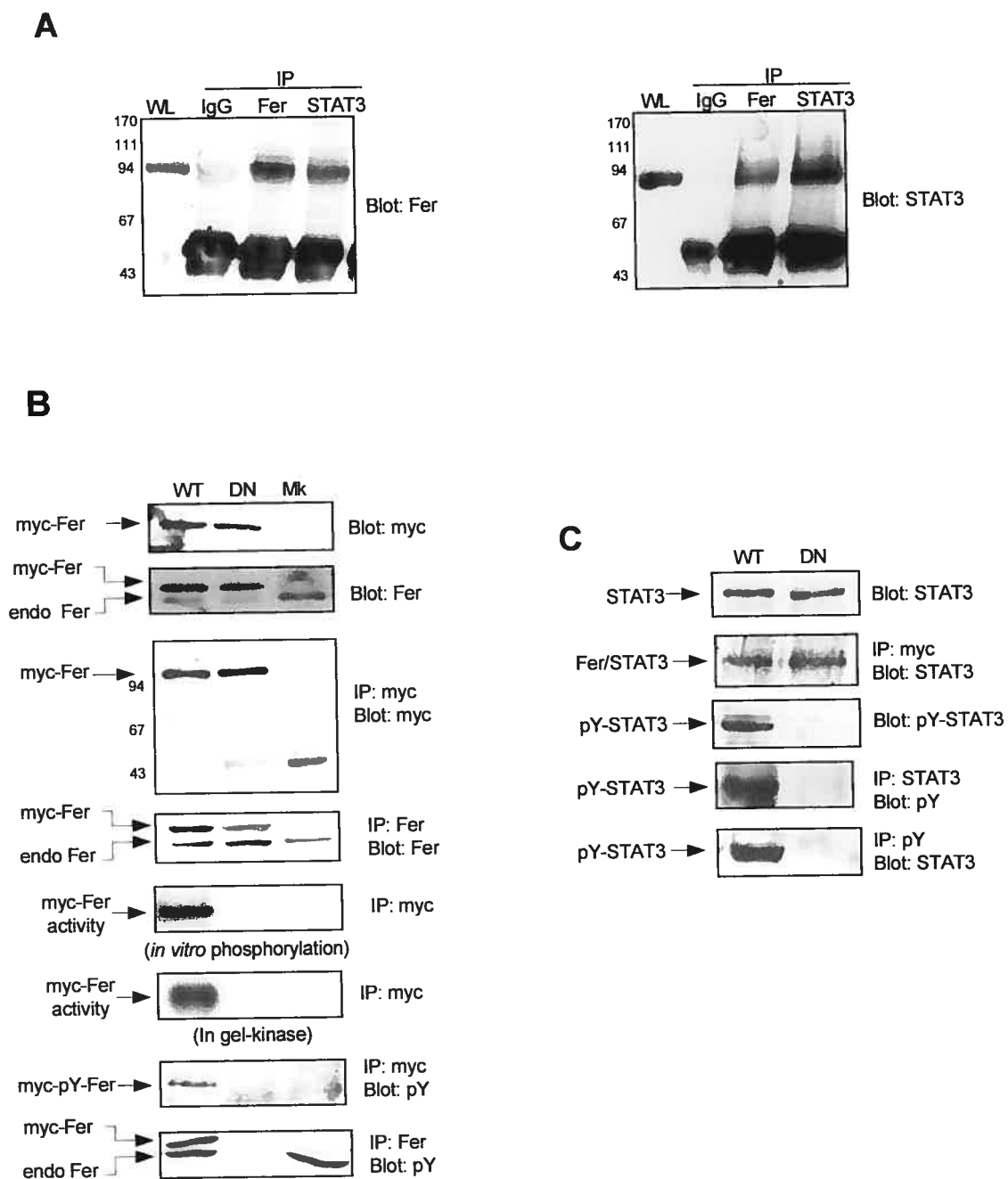
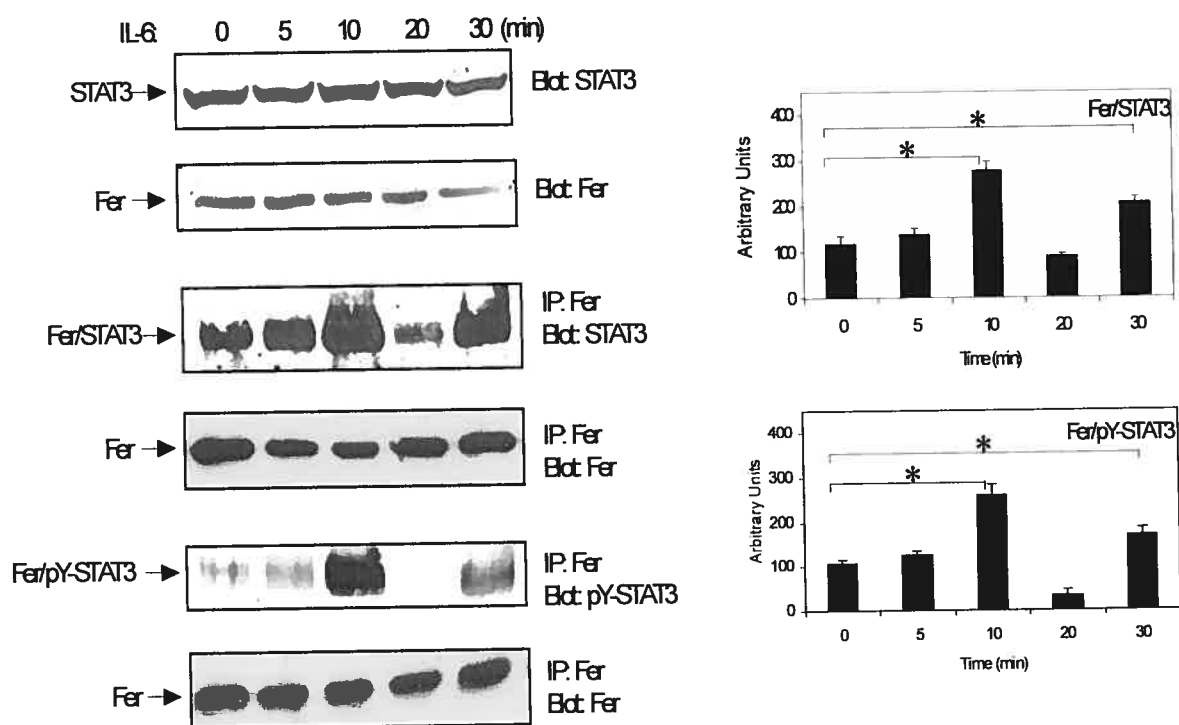
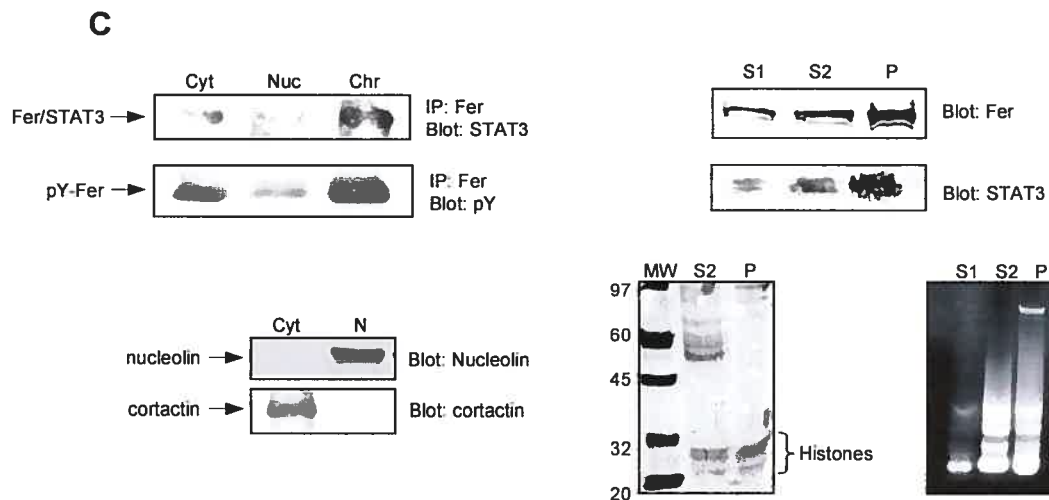
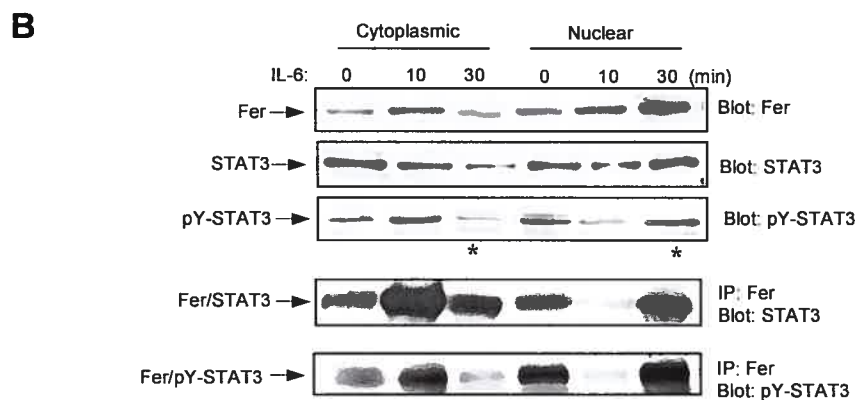
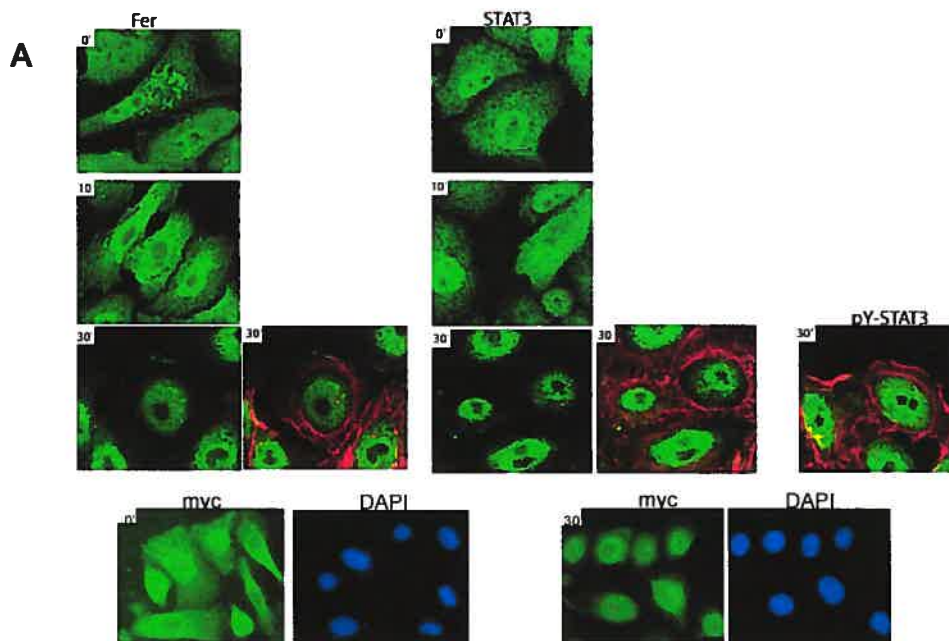


Figure 5



**Figure 6**



**Figure 7**

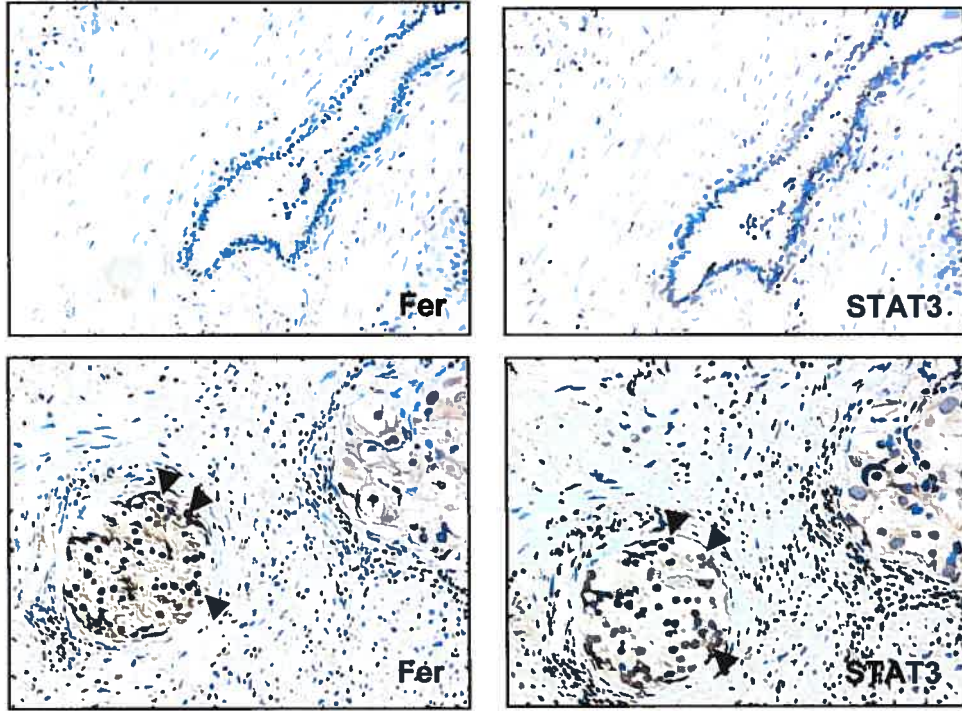
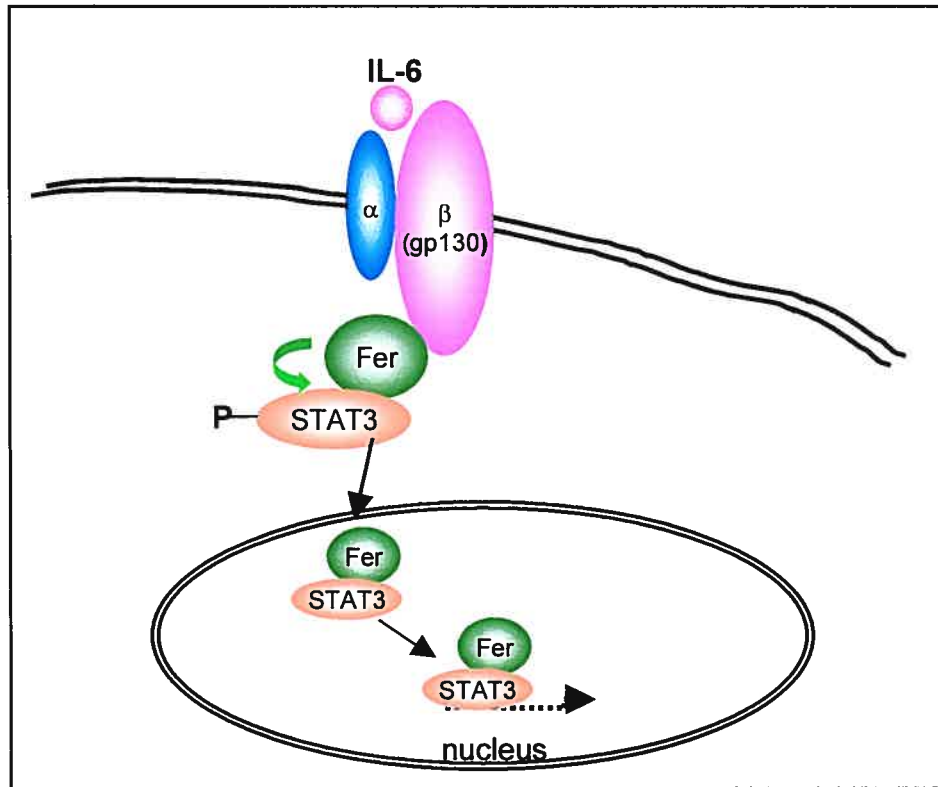


Figure 8



**Préambule à l'annexe I:** La glycoprotéine gp130 et le facteur de transcription STAT3 ont été identifiées comme étant des partenaires de Fer dans la voie de signalisation de l'IL-6 dans les cellules PC3. De plus, nous avons montré que l'IL-6 mène à la translocation nucléaire de Fer et de STAT3 et que ce complexe se trouve au niveau de la chromatine. Dans ces cellules, et tel que montré en utilisant un dominant négatif de Fer, la protéine Fer s'avère être une tyrosine kinase majeure pour la phosphorylation de STAT3, une étape essentielle à la trans-activation des gènes dépendants de l'IL-6.

D'autre part, des études récentes illustrent que STAT3 forme un complexe avec le récepteur des androgènes dans les cellules LNCaP. De plus, il a été rapporté que le dominant négatif de STAT3 inhibe l'activation du récepteur des androgènes (Matsuda *et al.*, 2001). En outre, ce récepteur est aussi soumis à l'action de l'IL-6. Ceci entraîne la transactivation des gènes dépendants des androgènes (APS) et ceci indépendamment du ligand (androgènes). Étant donné le rôle prépondérant de Fer dans l'activation de STAT3 démontré dans les cellules PC3, nous proposons que :

- **Hypothèse :** Fer pourrait être un partenaire du récepteur des androgènes dans les cellules prostatiques hormono-dépendantes et participer aux mécanismes d'adaptation contribuant au développement de l'hormono-indépendance.

### 3 Annexe I

#### 3.1 Récepteur des androgènes: un partenaire de Fer

- **Matériel et méthodes** : Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons obtenu des cellules PC3 transfectées avec le gène sauvage codant pour le récepteur des androgènes (Dr Brown, Toronto). Ceci permettait de conserver le même pool génétique que les cellules utilisées pour nos études de Fer/STAT3 dans la voie de l'IL-6. Nous avons aussi utilisé les cellules LNCaP exprimant un RA muté mais fonctionnel (Suzuki *et al.*, 1993) et les cellules PC3 comme contrôle.

- **Résultats** :

**Expression** : La présence de Fer, STAT3 et du RA a d'abord été vérifiée par immunobuvardage (figure 14) et par immunofluorescence (figures 15B et 16B). Les résultats montrent que Fer et STAT3 sont exprimés aussi bien dans les cellules PC3 que PC3-RA et LNCaP. Cependant et tel qu'attendu nous confirmons que le RA est exprimé dans les PC3-RA et les LNCaP et non dans les PC3.

**Complexes STAT3/RA** : Les complexes ont été analysés par immunobuvardage avec l'anti-RA après immunoprécipitation avec l'anti-STAT3 dans les PC3-RA. Nous observons leur présence uniquement dans les préparations immunoprécipitées avec STAT3 et non avec les IgG (Figure 15A). De plus, des études d'immunofluorescence révèlent que STAT3 et RA co-localisent dans le noyau (figure 15B). Ces observations concordent avec celles rapportées dans les cellules LNCaP (Matsuda *et al.*, 2001).

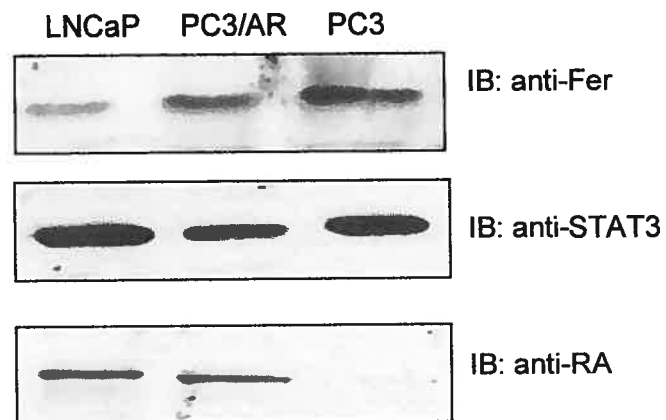
**Complexes Fer/RA** : D'autre part, l'immunoprécipitation des extraits protéiques totaux de PC3-RA avec l'anti-Fer et l'immunobuvardage avec l'anti-RA révèle que Fer et RA forment aussi un complexe dans ces cellules (figure 16A). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules LNCaP (non montrés). De plus, les études d'immunofluorescence avec l'anti-Fer et l'anti-RA montrent que les deux protéines localisent au niveau de la membrane périmoléculaire et le noyau des cellules PC3-AR (figure 16B). Ces données démontrent que Fer forme un complexe avec le RA de même que STAT3 dans les cellules cancéreuses qui expriment le RA.

**Phosphorylation du RA :** Étant donné que Fer est une tyrosine kinase, nous avons voulu vérifier si le RA humain est phosphorylé au niveau tyrosine (pY), phénomène qui n'a jamais été vérifié directement auparavant. En effet, les seules phosphorylations du RA humain rapportées, touchaient uniquement la sérine et la thréonine. Afin de répondre à cette question, les extraits protéiques totaux de cellules PC3-RA ont été immunoprécipités aussi bien avec l'anti-RA et l'anti-pY. L'immunobuvardage a été réalisé avec l'anti-pY et l'anti-RA, respectivement. Les résultats montrent que le RA de type sauvage est phosphorylé au niveau tyrosine (figure 17A). Nous avons donc voulu vérifier la phosphorylation sur tyrosine du RA muté dans les cellules LNCaP, en utilisant les cellules PC3-RA et PC3 comme contrôles positif et négatif, respectivement. Les résultats montrent que le RA muté est aussi bien phosphorylé sur tyrosine que le RA sauvage (Figure 17B).

Comme l'IL-6 active aussi bien Fer, STAT3 que le RA, nous avons cherché à savoir si l'IL-6 module la phosphorylation de RA au niveau tyrosine. Les résultats montrent que l'IL-6 induit une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine de RA dans une cinétique allant de 0 à 30 minutes (Figure 17C).

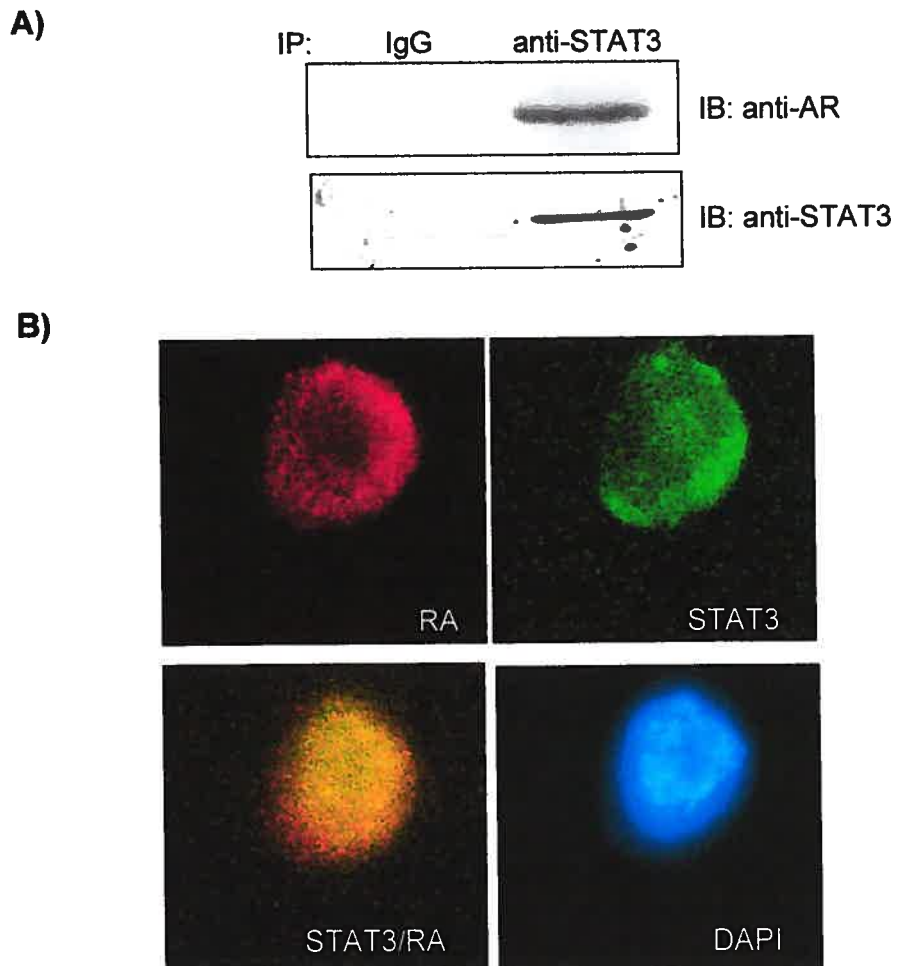
- **Conclusion :** Ces résultats illustrent que Fer forme un complexe avec STAT3 et le RA et que celui-ci est phosphorylé au niveau tyrosine. Cette phosphorylation est modulée par l'IL-6. Ces données suggèrent qu'en plus d'être impliquée dans la voie de l'IL-6 des cellules androgéno-indépendantes, Fer pourrait aussi jouer un rôle important dans l'activation des gènes médiés par le RA, lorsqu'ils sont activés de manière androgéno-indépendante dans la progression du CaP.





**Figure 14 : Expression de Fer, STAT3 et RA dans les lignées de cellules prostatique cancéreuses.**

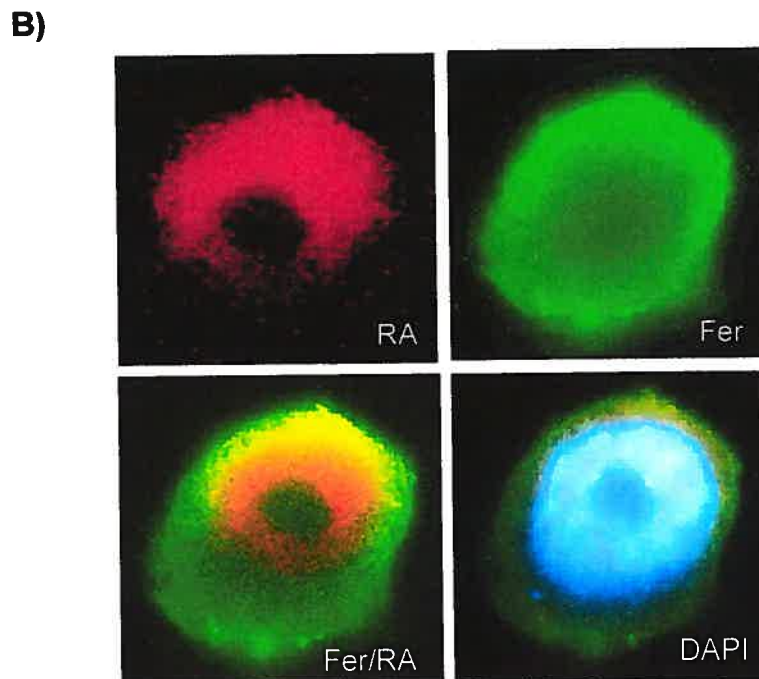
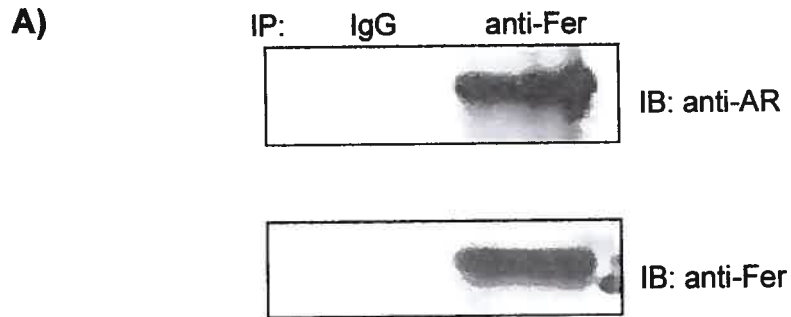
A) Les extraits protéiques (30  $\mu$ g) séparée sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage (IB) a été effectué avec l'anti-Fer (1/3000) pendant 1 heure et l'anti-STAT3 (1/1500) pendant 14 heures, tel que décrit dans le manuscrit II, et avec un anti-RA (1/3000) (Santa Cruz, San Diego, CA ) pendant 1 heure.



**Figure 15 : STAT3 est un partenaire du RA.**

A) Les extraits protéiques (750  $\mu$ g) de cellules PC3-RA ont été immunoprécipités (IP) avec 2  $\mu$ g d'anti-STAT3 et d'IgG de lapin comme contrôle, tel que décrit dans le manuscrit II. Les protéines ont été séparées sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-RA et l'anti-STAT3.

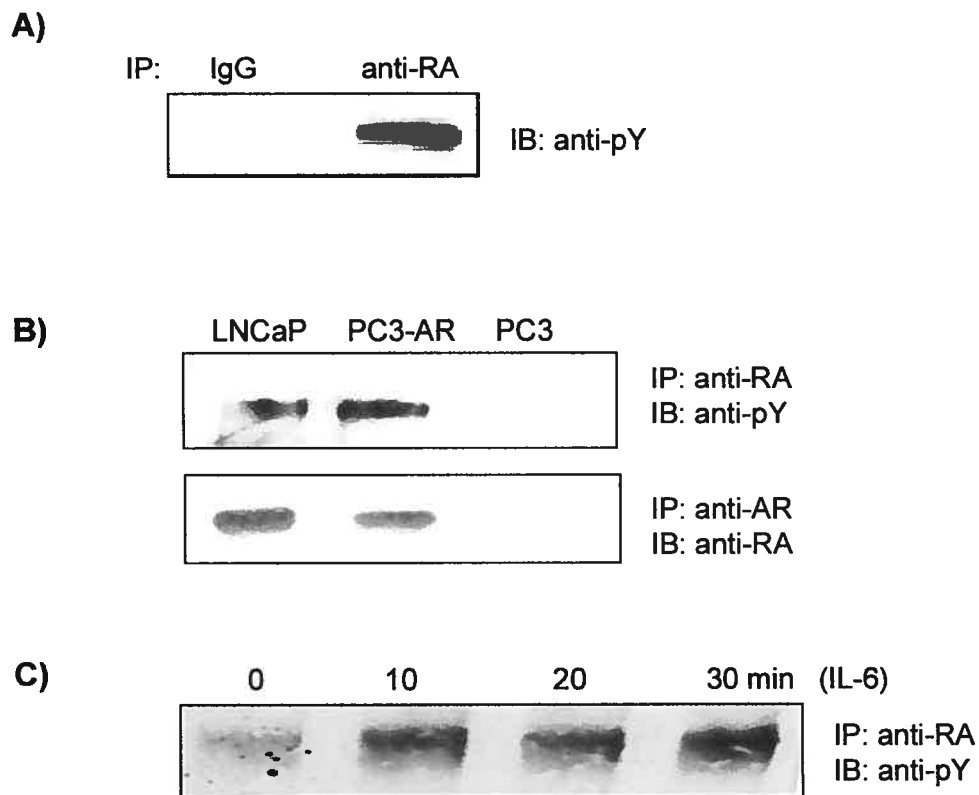
B) Les cellules PC3-RA ont été fixées avec 3.7% de paraformaldéhyde et incubées pendant 14 heures avec les anticorps primaires, anti-RA (1/150) ou anti-STAT3 (1/150). L'immunoréactivité a été visualisée par des anticorps secondaires couplés à la fluorescéine (vert) et la rhodamine (rouge). Les noyaux ont été visualisés par le DAPI. Les images ont été superposées afin de déterminer la co-localisation de STAT3 et du RA.



**Figure 16 : RA est un partenaire de Fer.**

A) Les extraits protéiques (750  $\mu$ g) de cellules PC3-RA ont été immunoprécipités avec 2  $\mu$ g de l'anti-Fer et d'IgG de lapin comme contrôle, tel que décrit dans le manuscrit II. Les protéines ont été séparées sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-RA et l'anti-Fer.

B) Les cellules PC3-RA ont été fixées avec 3.7% de paraformaldéhyde et incubées pendant 14 heures avec les anticorps primaires, anti-RA (1/150) ou anti-Fer (1/150). L'immunoréactivité a été visualisée par des anticorps secondaires couplés à la fluorescéine (vert) et la rhodamine (rouge). Les noyaux ont été visualisés par le DAPI. Les images ont été superposées afin de déterminer la co-localisation de Fer et du RA.



**Figure 17: Phosphorylation du RA sur tyrosine dans les cellules LNCaP et PC3-RA.**

Les extraits protéiques (750  $\mu\text{g}$ ) ont été immunoprécipités avec 2  $\mu\text{g}$  d'anti-RA et d'IgG de souris comme contrôle. Les protéines ont été séparées sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-pY, tel que décrit dans le manuscrit II.

A) montre que le RA est phosphorylé sur tyrosine dans les cellules PC3-RA.

B) montre que le RA est aussi bien phosphorylé dans les cellules LNCaP que les PC3-RA alors qu'aucune protéine n'est détectée dans les cellules PC3.

C) Les cellules PC3-RA ont été privées de sérum pendant 48h et traitées à l'IL-6 pendant différents temps, tel que décrit dans le manuscrit II. L'immunoprécipitation et l'immunobuvardage ont été effectués comme ci-haut.

### 3.2 Tyrosine kinase Lyn: un partenaire de Fer

**Préambule :** Dans le but de comprendre le rôle de Fer dans le CaP, nous avons poursuivi la recherche de ses partenaires dans les cellules PC3. À cet égard, nous voulions nous baser sur sa structure, notamment la tyrosine phosphorylée à la position 715, son site présumé d'autophosphorylation. À ce jour, aucune protéine n'a été identifiée comme partenaire interagissant avec ce résidu phosphotyrosine de Fer. Théoriquement, Fer pourrait se lier à différentes protéines qui contiennent des domaines SH2, connus pour leurs propriétés de lier spécifiquement les résidus de phosphotyrosine dans une séquence spécifique (Schlessinger 1994; van der Geer et al., 1995). Comme Fer est impliquée dans plusieurs voies de signalisation régulées par les facteurs de croissance et les cytokines et que plusieurs protéines contenant des domaines SH2, tels les membres de la famille de Src et les protéines adaptatrices Grb2 et Shc, sont communes à ces voies, nous proposons que :

- **Hypothèse :** Fer pourrait être un partenaire de ces ou l'une de ces protéines dans les cellules PC3.
- **Matériel et méthodes :** Les domaines SH2 de Src, Shc et Grb2 (courtoisie du Dr G. Pelletier, Université McGill) fusionnés à la glutathione-S-transférase ont été induits dans les bactéries et purifiés sur des billes de Glutathione Sepharose. Les extraits de protéines de PC3 ont été précipités avec ces domaines SH2 purifiés. La GST a été utilisée comme contrôle négatif. L'immunobuvardage a été réalisé avec l'anticorps anti-Fer.
- **Résultats :**

**Identification d'un domaine spécifique :** La figure 18A montrent que Fer est présente uniquement dans les extraits précipités avec le domaine SH2 de Src et non avec ceux de Shc et Grb2 et la GST. Ces résultats suggèrent donc que Fer forme un complexe avec la tyrosine kinase Src

**Étude du complexe Fer/Src :** Nous avons voulu confirmer cette donnée dans le contexte des cellules prostatiques cancéreuses en immunoprécipitant les extraits protéiques de PC3 avec l'anti-Src (Allard *et al.*, 1997) ou l'anti-Fer, puis en révélant avec l'anti-Fer et l'anti-Src, respectivement. Nous avons détecté aucune bande

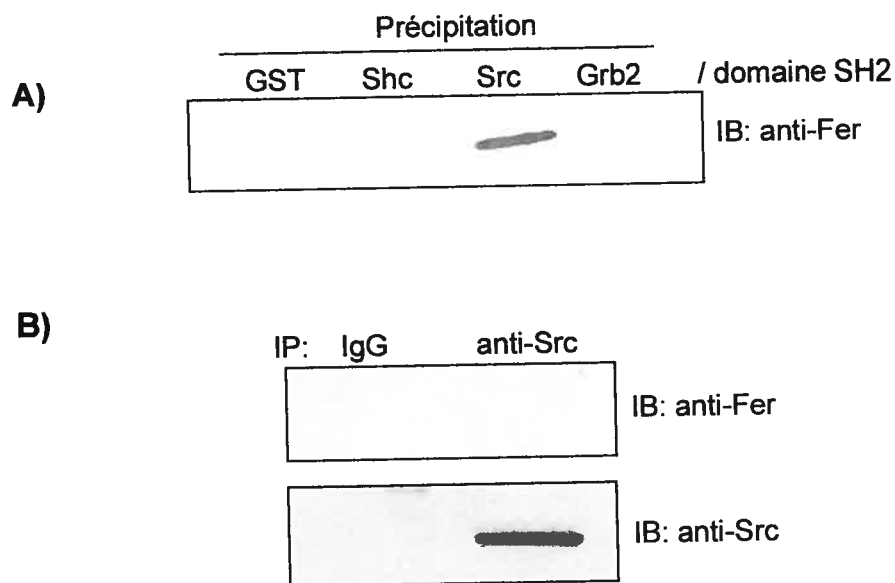
(figure 18B). Ceci indique que Fer ne s'associe pas avec Src dans ces cellules. Néanmoins, il est probable que Fer interagisse avec une autre protéine dont le domaine SH2 est similaire à celui de Src.

**Étude du complexe Fer/Lyn**: Les membres de la famille de Src ont tous la particularité de posséder des domaines SH2. L'analyse comparative des séquences des différents domaines SH2 de la famille Src a révélé que seuls les domaines SH2 de Src et Lyn sont identiques. Or notre laboratoire a déjà rapporté la présence de Lyn dans ces cellules (Atfi *et al.*, 1994). Suite à cette observation, des extraits protéiques de cellules PC3 ont été immunoprécipités avec un anti-Lyn et avec les IgG comme contrôle négatif. Les résultats montrent que Fer se trouve uniquement dans les extraits immunoprécipités avec l'anti-Lyn et non dans les extraits contrôles obtenus avec les IgG (figure 18A). Fer forme donc un complexe avec Lyn dans les cellules PC3 et ce complexe est spécifique.

**Rôle de pY Fer dans l'interaction Fer/Lyn**: Comme le domaine SH2 de Src/Lyn lie Fer, nous avons voulu vérifier l'importance de la phosphotyrosine 715 de Fer dans cette interaction. Ceci est confirmé dans les cellules transfectées avec l'ADNc de *fer* étiqueté avec l'épitope myc (manuscrit II). Les expériences ont été réalisées aussi bien avec la forme sauvage de Fer qu'avec la forme mutée à la tyrosine 715. Les complexes ont été analysés après l'immunoprécipitation avec l'anti-Lyn, suivie de l'immunobuvardage avec l'anti-myc. Les résultats montrent que Fer s'associe avec Lyn dans les cellules transfectées avec la forme sauvage de Fer. Cependant aucun complexe n'est détecté dans les cellules transfectées avec la forme mutée (figure 19B). Ceci permet de conclure que l'interaction Fer/Lyn est possiblement directe et favorisée par le domaine SH2 de Lyn et la phosphotyrosine 715 de Fer.

**Régulation du complexe Fer/Lyn par l'IL-6**: Comme l'IL-6 induit une augmentation de la phosphorylation de Lyn dans les lignées cellulaires lymphoblastiques (Hallek *et al.*, 1997) et qu'elle module la phosphorylation de Fer dans les PC3 (manuscrit II), nous avons vérifié si le complexe Fer/Lyn est également modulé par l'IL-6. Les cellules PC3 ont été privées de sérum pendant 48 heures et ont été stimulées avec 100ng/ml de l'IL-6 (manuscrit II). Les résultats préliminaires montrent que les complexes Fer/Lyn sont rapidement modulés par l'addition de l'IL-6 et maximaux après 10 min (figure 20).

- **Conclusion :** Fer forme un complexe avec Lyn dans les cellules prostatiques cancéreuses et ces complexes sont modulés par l'IL-6.



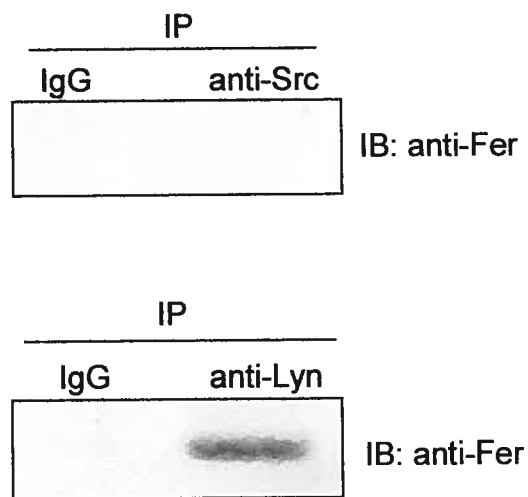
**Figure 18: Interaction du domaine SH2 de Src avec Fer dans les cellules PC3.**

Les extraits protéiques (750  $\mu$ g) ont été précipités (pull down) avec 5  $\mu$ g de protéines purifiées, correspondant aux domaines SH2 de Src, Grb2 et Shc, et 5 $\mu$ g de GST comme contrôle. Les protéines ont été séparées sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-Fer.

A) montre que Fer interagit spécifiquement avec le domaine SH2 de Src.

B) montre qu'après immunoprécipitation des extraits protéiques totaux avec 2  $\mu$ g d'anti-Src (Allard *et al.*, 1997) et l'immunobuvardage avec l'anti Fer, il n'y a pas de complexe Fer/Src endogène dans les cellules PC3.



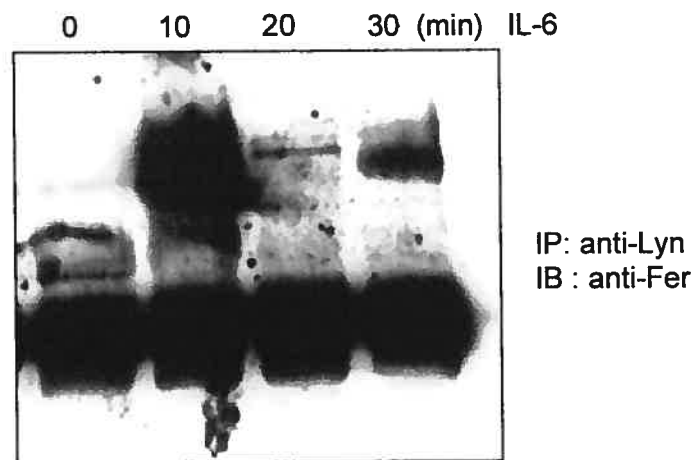


**Figure 19: Fer forme un complexe avec Lyn dans les cellules PC3.**

Les extraits de protéines (750  $\mu$ g) ont été immunoprécipités avec 2 $\mu$ g d'anti-Lyn (Allard *et al.*, 1997) et d'IgG comme contrôle. Les protéines ont été séparées sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-Fer.

A) montre que Lyn s'associe avec Fer.

B) Les cellules PC3 ont été transfectées avec l'ADNc de Fer étiqueté avec myc, formes sauvage (WT) et mutée au site d'autophosphorylation Y715(Y\*). 48h après la transfection, les cellules ont été lysées et les extraits de protéines ont été immunoprécipités avec 2  $\mu$ g de l'anti-Lyn. Les protéines ont été séparées sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-myc (manuscrit II).



**Figure 20: Modulation du complexe Fer/Lyn par l'IL-6.**

Les cellules PC3 ont été privées de sérum pendant 48 heures et ont été stimulées avec 100 ng/ml de l'IL-6 pendant différentes périodes. Les extraits de protéines (750  $\mu$ g) ont été immunoprécipités avec 2  $\mu$ g d'anti-Lyn et séparés sur SDS-PAGE. L'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-Fer. La figure montre que l'IL-6 stimule les niveaux de complexes Fer/Lyn.

**4      Manuscrit III: F-actin as a Partner and a Substrate of the Fer Tyrosine Kinase in Human Prostate Cancer Cells**

**Amina Zoubeidi and Simone Chevalier.**

(2003)

**Contribution des auteurs:**

Amina Zoubeidi: A réalisé toutes les expériences.

Simone Chevalier: Directrice de recherche


## **F-actin as a Partner and a Substrate of the Fer Tyrosine Kinase in Human Prostate Cancer Cells**

Amina Zoubeidi,<sup>1</sup> and Simone Chevalier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Biochemistry, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7*

<sup>2</sup> *Urologic Oncology Research Group, Departments of Surgery (Urology Division), Medicine, and Oncology, McGill University Health Centre and Research Institute, 1650, Cedar Avenue, Montreal, Quebec, Canada , H3G 1A4*

\* *Correspondence: Dr S. Chevalier, McGill University Health Centre, Research Institute, 1650 Cedar Avenue, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1A4*

  
Phone: (514) 934-1934 ext. 44616

Fax: (514) 934-8261

*Running head: Fer/actin complexes in prostate cancer cells*

*Key Words: Fer, tyrosine kinase, actin, cytoskeleton, prostate cancer, cell survival*

### Abstract

In North American men, prostate cancer (Pca) ranks 2<sup>nd</sup> as a cause of death by cancer. The lethal component of the disease is attributed to androgen-independent cells. We previously reported on elevated expression of the non-receptor tyrosine kinase (TK) Fer (*Eps/fes* related) in human Pca tissue extracts and linked Fer up-regulated expression in the dog model to the growth of androgen-independent basal cells surviving androgen suppression. Moreover, Fer appeared critical for the survival and growth of human Pca cells but unrelated to cell-cell interactions, adhesions to matrix proteins, and cell shape. As Fer did not form specific signaling complexes with p120Cas, cortactin, and  $\beta$ -catenin, the objective of this study was to identify putative Fer signalling partners in the context of Pca. Based on the TK activity of Fer and immunoprecipitation (IP) techniques, we identified actin as the major tyrosine phosphorylated protein (pY-actin) found in Fer IP. The Fer/pY-actin interaction was mediated *via* the SH2 domain of Fer. We showed the preferential binding of Fer to filamentous actin, also tyrosine phosphorylated, but not globular actin. As substantiated using Fer mutants, the Fer/actin interaction did not require Fer activity but levels of pY-actin largely depended on Fer activity, thereby suggesting that actin is most likely a direct Fer substrate and implying that Fer is the main kinase responsible of actin tyrosine phosphorylation in Pca cells. *In situ*, Fer was detected in the cytoplasm and in the nucleus of Pca cells. Phalloidin stained the cytoplasmic actin cytoskeleton. However, Fer/actin complexes appeared primarily located in the nucleus. Furthermore, Cytochalasin D treatment drove more actin and Fer/actin complexes in the nucleus. A concomitant reduction of Fer activation was observed but paradoxically, levels of pY-actin levels were increased. Fer/actin complexes and pY-actin were found in the chromatin and both proteins were detected in the DNA matrix. Therefore, the cytoskeletal protein actin appears to be part of a Fer signaling pathway taking place in the nucleus of Pca cells. Based on current knowledge on Fer, nuclear actin, pY-actin, and relationships established with cell response to various types of stress, we propose that Fer regulates the threshold of pY-actin, which is related to survival and cell recovery to stress. Moreover, when Fer function is hampered, this mechanism becomes counterbalanced by compensatory mechanisms to further increase pY-actin levels. Since Fer ultimately fulfill a survival function in Pca cells, the understanding of these mechanisms may lead to novel avenues to impact on advanced disease.

### Abstract

In North American men, prostate cancer (Pca) ranks 2<sup>nd</sup> as a cause of death by cancer. The lethal component of the disease is attributed to androgen-independent cells. We previously reported on elevated expression of the non-receptor tyrosine kinase (TK) Fer (*Eps/fes* related) in human Pca tissue extracts and linked Fer up-regulated expression in the dog model to the growth of androgen-independent basal cells surviving androgen suppression. Moreover, Fer appeared critical for the survival and growth of human Pca cells but unrelated to cell-cell interactions, adhesions to matrix proteins, and cell shape. As Fer did not form specific signaling complexes with p120Cas, cortactin, and  $\beta$ -catenin, the objective of this study was to identify putative Fer signalling partners in the context of Pca. Based on the TK activity of Fer and immunoprecipitation (IP) techniques, we identified actin as the major tyrosine phosphorylated protein (pY-actin) found in Fer IP. The Fer/pY-actin interaction was mediated *via* the SH2 domain of Fer. We showed the preferential binding of Fer to filamentous actin, also tyrosine phosphorylated, but not globular actin. As substantiated using Fer mutants, the Fer/actin interaction did not require Fer activity but levels of pY-actin largely depended on Fer activity, thereby suggesting that actin is most likely a direct Fer substrate and implying that Fer is the main kinase responsible of actin tyrosine phosphorylation in Pca cells. *In situ*, Fer was detected in the cytoplasm and in the nucleus of Pca cells. Phalloidin stained the cytoplasmic actin cytoskeleton. However, Fer/actin complexes appeared primarily located in the nucleus. Furthermore, Cytochalasin D treatment drove more actin and Fer/actin complexes in the nucleus. A concomitant reduction of Fer activation was observed but paradoxically, levels of pY-actin levels were increased. Fer/actin complexes and pY-actin were found in the chromatin and both proteins were detected in the DNA matrix. Therefore, the cytoskeletal protein actin appears to be part of a Fer signaling pathway taking place in the nucleus of Pca cells. Based on current knowledge on Fer, nuclear actin, pY-actin, and relationships established with cell response to various types of stress, we propose that Fer regulates the threshold of pY-actin, which is related to survival and cell recovery to stress. Moreover, when Fer function is hampered, this mechanism becomes counterbalanced by compensatory mechanisms to further increase pY-actin levels. Since Fer ultimately fulfill a survival function in Pca cells, the understanding of these mechanisms may lead to novel avenues to impact on advanced disease.

## Introduction

The mouse *fer* gene was originally identified through its homology with *v-abl* (Hao *et al.*, 1989). The gene is evolutionarily conserved and present in most mammalian cell lines (Letwin *et al.*, 1988; Pawson *et al.*, 1989). The protein belongs to a small family of non-receptor tyrosine kinases (TK) composed of Fps and Fes (Pawson *et al.*, 1989). Valuable information on the implication of Fer in pathways regulating a wide variety of cell functions has emerged from numerous *in vitro* studies in diverse cell systems (Greer, 2002). Briefly, Fer functions range from its interaction and action with proteins regulating the cytoskeleton (Kim and Wong 1995; Kim and Wong 1998; Lunter and Wiche 2002), cell-cell interactions (Kim and Wong 1995), adhesion (Rosato *et al.*, 1998), motility (Craig and Greer 2002), proliferation (Ben-Dor *et al.*, 1999) and survival (Iwanishi *et al.*, 2000). Observations in transgenic mice expressing an inactive Fer protein (dominant negative) have confirmed the role of Fer in the cytoskeleton, by controlling the phosphorylation of cortactin in fibroblasts (Craig *et al.*, 2001). Animals did not present detectable growth defects, thereby implying that Fer activity is not determinant for embryogenesis and subsequent post-natal development. Redundancy was proposed (Craig *et al.*, 2001).

Still very little is known on Fer function in disease. We reported that Fer protein expression in tissue extracts from adult human and dog prostate differs appreciably as a consequence of phenotypical changes taking place according to the hormonal host status or as a result of malignant transformation (Allard *et al.*, 2000). Indeed, the 94 kDa Fer protein is barely detectable in normal prostate but expressed at significantly elevated levels when inducing basal cell metaplasia in the dog model and in prostate cancer in man (Allard *et al.*, 2000). In addition, Fer is constitutively activated in human prostate carcinoma cell lines, with highest levels observed in the most aggressive and androgen-independent PC-3 cell line (Allard *et al.*, 2000) and derived sublines (unpublished).

A role for Fer in the regulation of prostate cancer cell growth was demonstrated using an antisense *fer* cDNA construct (Allard *et al.*, 2000). This strategy did not result in null *fer* clones but reducing Fer levels had significant effects on PC-3 cell proliferation rate and abolished their tumorigenicity *in vitro*. This was

without significant consequences on cell interactions/adhesions and only marginal changes in cell shape were noticed. In agreement with these findings, our attempts to demonstrate Fer complexes with identified partners in the cytoskeleton (cortactin), cell junctions looking at members of the catenin family ( $\beta$ -catenin and p120Cas) and adhesions (paxillin) revealed no specific complexes (Allard *et al.*, 2000).

Based on these findings, we postulated that the cellular context may be determinant and hypothesize that Fer likely uses other key signalling molecules to fulfill its functions in survival and growth of prostate cancer cells. The Fer protein and its various domains have been the basis of several co-precipitation approaches to identify Fer partners in different cell types. For instance, this has led to the demonstration that Fer is associated with cortactin and p120Cas (Kim and Wong 1995; Kim and Wong 1998; Rosato *et al.*, 1998; Kapus *et al.*, 2000). In present study on Pca cells, we sought for putative Fer proteins interacting, based on Fer ability to phosphorylate potential substrates on tyrosine. Briefly, Fer has a unique N-terminal Fps/Fes/Fer-CIP4 homology (FCH) domain (Aspenstrom 1997), two regions of predicted coiled coil (CC) domains, a central Src Homology 2 (SH2) domain, and a C-terminal catalytic domain containing the tyrosine kinase subdomain, a nuclear localization signal (NLS), and a regulatory tyrosine residue located at position 714 that reflects Fer activation when phosphorylated (Greer 2002). We now report that F-actin interacts with Fer in Pca cells and that actin is tyrosine phosphorylated, a process that largely depends on Fer activity. The Fer/pY-actin interaction is modulated *via* the Fer-SH2 domain but levels of Fer/actin complexes, mainly detected *in situ* in the cell nucleus, are independent of Fer activity. On the other hand, the disorganisation of the actin cytoskeleton using Cytochalasin D shifts more Fer protein in the nucleus. An important network of nuclear actin is detected in parallel. In these cells, both proteins are detected as complexes in the chromatin fraction and at the level of DNA. This is accompanied by reduced Fer activity but increase Fer/actin complexes and pY-actin levels. We propose that Fer normally regulates the threshold of pY-actin in Pca cells. Since perturbations of Fer function in response to stress induce other mechanisms resulting in enhanced pY-actin levels, this regulatory mechanism may be critical for the remodelling of the chromatin and nuclear function in Pca cells.



## Material and Methods

### Fer antibodies

A N-terminal portion of Fer (position 9-146) was engineered from the *fer* cDNA ((Allard *et al.*, 2000) and fused as a 420pb EcorI-EcorI fragment to a *Glutathione S Transferase* (GST) construct, subcloned in a pGEX vector (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Baie d'Urfée, QC, Canada) and induced in *Escherichia Coli* (5DHTa) for 6hrs using 0.4 mM isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The fusion protein was solubilized with urea, purified on a Glutathione-Sepharose beads, and used to immunize rabbits. The immune response was followed periodically by ELISA to harvest the antiserum when reaching a high titer (a million-fold). Immunoglobulins (IgG) were purified on protein-A sepharose beads (Life Technologies) using both pre-immune and immune sera. Specificity was assessed by different means (Western blotting after SDS-PAGE, immunoprecipitations followed by Western blots and kinase assays, immunofluorescence) as described below, and using either human Pca cells (parental and/or transfected to overexpress Wild-Type Fer recombinant protein, as outlined below) and/or protein extracts. The antiserum was also pre-incubated with varying concentrations of the antigen (Fer-GST fusion protein) and tested for the loss of immunoreactive Fer, both in gels and by fluorescence in Pca cells. Pre-immune rabbits IgG were also used for comparison.

### Cell culture and transfection

The androgen-independent and rapidly growing human prostatic carcinoma cell lines, PC-3 and its derived PRO4 subline (Pettaway, 1996), were used as models of advanced prostate cancer. The PRO4 cell line was gift from Dr I. J. Fidler (Huston, Texas, USA). Cells were routinely grown and passaged at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> environment in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic/antimycotic solution (all from Life Technologies). In some instances, Pca cells (75 % confluency) were incubated with Cytochalasin D (Sigma; 10µg/ml for 2 hrs) in serum-free medium and harvested immediately to extract proteins or else, fixed for fluorescence studies, as described below.

For constructs and transfections, we used the full length *fer* cDNA already tagged with a myc-6His epitope in C-terminal (Allard *et al.*, 2000) and the Quick

Change *in vitro* mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Briefly, a kinase dead (KD) *fer* construct was obtained by substitution of lysine 591 by arginine. The autophosphorylation site (Y\*) was also mutated by substitution of tyrosine 715 by phenylalanine. Finally, a dominant negative (DN) construct was obtained by substitution of both residues, lysine 591/arginine and tyrosine 714/phenylalanine. Pca cells (at 75 % confluency in 60 mm dishes) were transiently transfected with 5  $\mu$ g DNA using SuperFect (30  $\mu$ l; Qiagen, Mississauga, Ont, Canada) and lysed 48 hours later in RIPA buffer (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM sodium vanadate, 1% Nonidet P-40, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin). Recombinant Fer proteins were analyzed by Western blotting and kinase assays (as described below).

#### **Cell fractionation and protein extraction**

For whole cell lysates, monolayers were rapidly washed 5 min with ice-cold PBS containing 1% sodium vanadate, scraped in RIPA buffer, left on ice for 20 min, and clarified by centrifugation (14,000  $\times$  g for 5 min). Cytoplasmic and nuclear proteins were fractionated using the NE-PER kit (Pierce, Rockford, Il), as recommended by the manufacturer. The chromatin was obtained essentially as reported (Kreitz *et al.*, 2001). Briefly, Pca cells were first swollen in hypotonic buffer A (20 mM HEPES, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, pH 7.5) and broken by Dounce homogenization to obtain nuclei by low speed centrifugation. The nuclear pellet was resuspended in buffer A containing 0.5% Nonidet P40 to separate the free nucleosolic proteins from the chromatin by centrifugation. The chromatin fraction was digested with micrococcal nuclease (Fermentas, Canada; 30 Units; 10 min at 14°C) in 20 mM HEPES, pH 7.5, containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM ATP, and 0.3 mM sucrose. This was followed by deproteinization of all fractions using proteinase K (Life Technologies; 200  $\mu$ g/ml) in 0.5% SDS for 30 min at 37°C. The relative enrichment of fractions in nuclear vs cytoplasmic proteins was ascertained by Western blotting for proteins (Cytoplasmic: raf, paxillin; Nuclear: nucleolin, histones) and agarose gels for DNA.

To obtain proteins enriched in filamentous (F-) and globular (G-) actin, the F-actin lysis and stabilization buffer was added to Pca cells in suspension and cells were essentially processed according to the manufacturer's specifications (Cytoskeleton, Denver, CO), i.e. gentle homogenization followed by centrifugation at

100,000g during 1h at 37°C to separate F-actin (pellet) from G-actin (in the supernatant).

### **Immunoprecipitation and Western blotting**

Proteins of interest (750µg, unless otherwise stated) were immunoprecipitated overnight at 4°C on a rocking platform after the addition of 2µg of antibodies, against Fer (as obtained above), myc (Life Technologies), phosphotyrosine (pY; polyclonal from Upstate Biotechnology) and actin (Chemicon, Temecula, CA). Immune complexes were recovered with protein-G sepharose (Life Technologies; 20µl; 40 min at 4°C), washed with RIPA buffer three times, centrifuged, and submitted to SDS-PAGE, as described (Allard *et al.*, 2000). Proteins were transferred on nitrocellulose membranes and probed using antibodies against Fer, actin, pY, and myc. Detection was achieved after incubation with goat anti-rabbit or mouse antibodies (according to primary antibodies), coupled to horseradish peroxidase (Pierce; 1:2000) using the enhanced chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia Biotech.), according to the manufacturer's specifications.

### **Fer SH2 domain and pull down**

The Fer SH2 domain (residues 451 to 564) was obtained as a fusion protein with GST by subcloning the corresponding *fer* cDNA fragment into the pGEX-3Z vector (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Baie d'Urfée, QC, Canada), as described above in the section on Fer antibodies, and induced in bacteria with 0.4 mM IPTG for an additional 4hrs. Bacteria were resuspended in PBS and lysed by sonication, followed by a 30 min incubation with 0.1% of Triton X-100 at 37°C and centrifugation (14,000 g, 10 min). Proteins in the supernatant were purified on Glutathione-Sepharose beads (Pharmacia), as recommended by the manufacturer. Purity was assessed by Coomassie Blue staining after SDS-PAGE.

For pull down experiments, purified fusion proteins (Fer SH2 domain and GST as a control) were incubated overnight at 4°C with protein extracts (700 µg) from PRO4 cells. Complexes were recovered by adding Glutathione-Sepharose beads, washed three times with lysis buffer, and boiled in Laemmli sample buffer. Bound proteins were analyzed by Western blotting, as described above.

### **In vitro phosphorylation kinase assay**

Fer immunoprecipitates were submitted to *in vitro* phosphorylation assays for 30 min at 37°C in 50 mM Tris-HCl pH 7.7, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol containing 0.1 μM [ $\gamma$  <sup>32</sup>P] ATP. Reactions were stopped by addition of Laemmli buffer (1X) and Fer activity was determined after SDS-PAGE by submitting dried gels to autoradiography (X-Ray films), as reported (Allard *et al.*, 1997).

### **Immunofluorescence**

Pca cells growing in eight well plastic chambers were fixed in 3.7% paraformaldehyde (10 min), incubated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl (10 min), 0.5 % Triton X-100 (5 min), and 0.5 % BSA/PBS (10 min) prior addition of antibodies for 4hrs to detect Fer (1:150) and/or myc (1:150). Antigens were visualized using anti-rabbit Alexa antibodies coupled to FITC (Molecular Probes, Eugene, OR; 1:3000; 30 min). F-actin was visualized by TRITC phalloidin (Sigma Aldrich Canada Ltd; 1:3000; 30 min). The nucleus was stained with DAPI (Santa Cruz; 1:3000; 30 min). Photomicrographs were taken at a 200X magnification using a MIKON ECLIPSE E600 fluorescence microscope.

## Results

### Specificity of Fer antibodies

We previously reported on polyclonal antibodies raised in rabbits against a C-terminal Fer peptide that allowed a study on Fer in prostate cells and tissues using Western blotting (Allard *et al.*, 2000). However, a few other proteins were also detected (Allard *et al.*, 2000). To alleviate this problem and increase specificity, novel antibodies were raised against a Fer fusion protein (420bp fragment; amino acid residues: 9-146) corresponding to the N-terminal portion of the protein. The characteristics of purified Fer antibodies are depicted in Figure 1. Fer antibodies recognized a single 94 kDa protein in Pca cell extracts, not detected by pre-immune IgG (upper left panel). Specificity was further ascertained by competition of Fer antibodies with increasing concentrations (from 2 to 10  $\mu\text{g/ml}$ ) of the Fer antigen, which led to a loss of the immunoreactive 94 kDa protein (second from left). Moreover, as shown by *in vitro* phosphorylation assays, Fer antibodies but not pre-immune IgGs, immunoprecipitated a major active 94 kDa kinase in Pca cells, as revealed by *in vitro* kinase assays (third from left). Similarly, Fer antibodies recognized and immunoprecipitated the myc-his-tagged Fer protein (transfection of *fer* cDNA construct in Pca cells), as detected with myc antibodies and according to the quantity of immunoglobulins used for immunoprecipitation (right of top panel). Fer antibodies did not specifically immunoprecipitate cortactin,  $\beta$ -catenin, and p120Cas (data not shown), in agreement with earlier data with the C-terminal Fer peptide antibody (Allard *et al.* 2000). Immunofluorescence studies with Fer antibodies are shown in Figure 1 (lower panels). Positive reactivity was observed in the cytoplasm and the nucleus of Pca cells (panel a), in support of fractionation studies (Allard *et al.*, 2000). The pre-incubation of Fer antibodies with the purified antigen (Fer fusion protein) largely decreased immunostaining (panel b) and no reactivity was detected using purified pre-immune IgG (panel c). This confirmed specificity of the immunofluorescence Fer staining. Moreover, Fer distribution in cytoplasm and nucleus was confirmed by myc antibodies in Pca cells overexpressing the myc-Fer protein (panel e). This also shows high efficiency of transfection. In comparison, the immunofluorescence of endogenous myc in parental cells was relatively weak (panel d). Taken together, these results indicate that Fer antibodies are suitable for studies on Fer at the protein and cellular levels.

### Actin is found in Fer complexes in prostate cancer cells

To identify putative Fer partners in the context of prostate cancer, Pca cells (PRO4 subline) expressing high levels of endogenously activated Fer were used. Based on the fact that Fer is a tyrosine kinase, Fer-enriched protein preparations were obtained by immunoprecipitation with anti-Fer antibodies and next probed by Western blotting with anti-pY to detect phosphotyrosine containing proteins migrating along with Fer in gels. Figure 2A shows results of a typical experiment and reveals mainly two predominant molecular species, migrating at 94 and 42 kDa. Another less intense pY-protein of higher molecular weight was also detected. These bands were not present in control immunoprecipitates obtained with rabbits IgG. Based on results presented in Figure 1, the 94 kDa pY-protein represented Fer. We focused on the major 42 kDa band and tested the possibility that it may be actin. The rationale stemmed from earlier observations on actin tyrosine phosphorylation (pY-actin) in protozoan (*Dictyostelium*) (Jungbluth *et al.*, 1995), and more lately, in hematopoietic cells (Baba *et al.*, 2003). Moreover, a recent report has demonstrated that actin figures together with other cytoskeletal proteins as a Fer partner in Sertoli and germ cells (Chen *et al.*, 2003). Therefore, whole Pca cell lysates were immunoprecipitated with anti-pY and probed with actin. As illustrated in Figure 2B, the phosphorylation of actin was specifically detected in immunoprecipitates obtained with anti-pY antibodies but not in the negative IgG control. To confirm this result, the converse experiment was performed. Whole cell lysates from Pca cells were immunoprecipitated with anti-actin antibodies and probed with anti-pY antibodies. The same results were observed, i.e. the detection of actin phosphorylation only in pY immunoprecipitates but not in controls with IgG (Fig. 2 B). We thus tested whether actin was present in Fer immunoprecipitates using anti-actin antibodies. Figure 3A reveals actin at 42 kDa as a specific Fer-interacting protein. Similar results were obtained with PC-3 cells. Taken together, these results indicate that actin is a 42 kDa phosphotyrosine protein associated with Fer in prostate cancer cells. Experiments were pursued on the PRO cell line.

To further ascertain this Fer/actin association *in situ*, the two proteins were analyzed in Pca cells by immunofluorescence staining, using anti-Fer and phalloidin as a marker of polymerized actin. As shown in Figure 3B, Fer antibodies strongly

stained cytoplasmic and nuclear structure in PRO4 cells, in agreement with Figure 1 and earlier subcellular fractionation studies in PC3 cells (Allard *et al.*, 2000). As expected, phalloidin staining was observed in the cell cytoplasm with very faint staining over nuclei. Similar results were obtained using anti-actin antibodies (data not shown). After merging, the fluorescence became intense and detected primarily in the nucleus (Fig. 3B), thereby implying that a mostly nuclear Fer and actin co-localization. Collectively, these findings support that Fer and actin interact with each other, *in vitro* and *in vivo* in Pca cells.

### **Actin binds the SH2 domain of Fer**

Since actin is tyrosine phosphorylated in Pca cells, that Fer contains a SH2 domain (Greer 2002), and that SH2 domains are known to recruit protein phosphorylated on tyrosine (Sudol 1998), we further dissected out the molecular basis of Fer/actin interaction by *in vitro* binding assays (pull down). For this purpose, we first produced and purified the SH2 domain of Fer as a GST fusion protein, as described in Methods. Figure 3 C (left panel) shows the purity of the preparation, once analysed by SDS-PAGE and stained by Coomassie Blue. Given that the Fer SH2 fusion protein was also obtained in high quantity, it was used together with the corresponding GST protein as a negative control to precipitate (pull down) total protein extracts from Pca cells. Proteins were recovered and next probed with ant-pY. Figure 3 C shows that the SH2 domain of Fer was able to pull down a few tyrosine phosphorylated proteins. The major one migrated at the position expected for actin, 42 kDa (also shown in Figure 3A). Therefore the ability of the SH2 domain of Fer to interact directly with actin was tested by pull down, i.e. precipitating proteins with the Fer SH2 domain (or GST as a negative control) followed by actin immunoblots. Figure 3C confirms that the fusion protein consisting in the SH2 domain of Fer specifically precipitated actin. These results indicate that pY-actin interacts with Fer in Pca cells and most likely *via* the Fer SH2 sequence.

### **Actin is a substrate of the Fer kinase**

To analyse the functional implication of Fer activity on actin phosphorylation and Fer/actin interaction, we used our tagged *fer* cDNA, carrying the myc epitope at

the C-terminus, as reported (Allard *et al.*, 2000). Three mutants were prepared, as described in Methods: an enzymatically inactive kinase dead (KD), a mutated Y 714, the autophosphorylated site (Y\*), and a dominant negative (DN) mutated in both the catalytic domain and lacking the autophosphorylation site. Pca (PRO) cells were transiently transfected with the KD-, Y\*-, and DN-*fer* cDNA as well as the wild type (WT) construct. The expression of recombinant proteins was confirmed using myc and Fer antibodies. Figure 4 (two upper lanes) reveal the ectopic and endogenous expression of Fer proteins, and as expected, the size of myc-Fer proteins (upper band of Fer blots, second lane) was slightly larger in size than endogenous Fer.

To investigate whether actin may be a substrate of Fer in Pca cells, *in vitro* kinase reactions were carried out, using myc immunoprecipitates of transfected Pca cells overexpressing WT-, KD-, Y\*-, and DN-Fer proteins. Results showing radiolabeled phosphoproteins are illustrated in Figure 4 (third panel). Interestingly, a prominent radiolabeled 42 kDa band was detected in gels showing Fer-myc in cells expressing WT- Fer. The 42 kDa phosphorylated band was detected in cells expressing Y\*-Fer but at lesser intensity. This is in agreement with the fact that the mutated Y residue, located at position 714, reflects Fer activation when phosphorylated (Greer 2002). Accordingly, the 42 kDa radiolabeled band was absent from myc immunoprecipitates from cells over-expressing inactive Fer proteins (KD- and DN-). Parallel myc blots were performed to demonstrate the presence of equivalent levels of ectopic Fer proteins in immunoprecipitates (Fig. 4; fourth panel). Results from these experiments indicate that the activity/activation of ectopic WT- Fer is necessary for the *in vitro* tyrosine phosphorylation of the 42 kDa protein interacting with Fer.

Based on the above observations on actin/pY-actin in Pca cells, we assessed whether Fer mutants (transfection of Pca cells with KD-, Y\*-, DN- *fer* cDNA) affect the levels of actin phosphorylated on tyrosine in comparison to WT-Fer. Immunoprecipitates were obtained with the anti-pY and probed for actin. Results in Figure 4 (fifth panel) illustrates that the actin levels detected in pY-enriched proteins varied in parallel with the extent of Fer activity and activation (comparison of *in vitro* kinase assays): WT > >Y\* >> DN and KD. A faint actin band persisted in cells overexpressing inactive Fer. These findings indicate that actin tyrosine phosphorylation largely but not exclusively depends on Fer activity in Pca cells.



To determine the extent of which Fer activity contributes to levels of Fer/actin complexes, recombinant Fer proteins were immunoprecipitated with myc antibodies and probed for the presence of actin. Results in Figure 4 (lower panel) show similar levels of myc-Fer/actin complexes, thereby implying that Fer activity/activation is not required for Fer/actin interaction in Pca cells. Taken together, these findings suggest that actin is a substrate of Fer and that the interaction between pY-actin and Fer is mediated *via* the Fer SH2 domain. However, as levels of Fer/actin complexes do not reflect Fer activity, Fer likely binds actin through other motifs, as well. In addition, these results suggest that pY-actin represents a minor portion of the actin pool found in Fer complexes. Nonetheless, the extent of actin tyrosine phosphorylation largely depends on Fer in Pca cells.

#### **Fer Is associated with filamentous actin**

The organization of cellular actin structures is governed by a variety of actin modulatory proteins. Some have a preference for binding to the globular (G) or monomeric form of actin, while others specifically target polymerized filamentous (F) actin structures. To investigate the preference of Fer for G- and/or F-actin, Pca cells were homogenized in F-actin stabilization buffer and centrifuged to separate the F-actin from G-actin pool, as described in Methods. Proteins (equivalent amounts) from F-actin or G-actin enriched fractions were next blotted to detect actin or Fer and verify their pY-status. Figure 5 illustrates the presence of actin and Fer in both F- and G- actin fractions (two lanes). In addition, when Fer was recovered by immunoprecipitation and probed with anti-pY, its activation -phosphorylation on tyrosine- was detected in both fractions (third lane). In contrast, when pY-enriched proteins were obtained from F- and G- actin fractions and probed for actin, only the F-actin fraction but not G-actin contained some pY-actin protein (fourth lane). When Fer/actin complexes were investigated (immunoprecipitation of F- and G-actin enriched proteins with anti-Fer antibodies and analysis of actin by Western blot), Fer formed a complex only with F-actin (Figure 5, fifth lane). No band was detected in G-actin, despite the presence of Fer in this fraction (last lane). These results support that Fer preferentially binds filamentous actin, including when tyrosine phosphorylated.

### Effects of Cytochalasin D on actin/Fer complexes, Fer activity, and pY-actin

To investigate on a possible relationship between Fer and actin polymerization, Pca cells were exposed to cytochalasin D (10  $\mu\text{g/ml}$ ; 2 hrs) and analyzed for consequences *in situ* by immunofluorescence using Fer antibodies and phalloidin staining for F-actin. Figure 6A shows cytochalasin D treated Pca cells. There was a net accumulation of Fer in the nucleus, with a loss of staining in the cytoplasm and in cell cortex. The phalloidin staining at the cell periphery was discontinuous and surprisingly, an intensely stained network of actin bundles was observed in the nucleus. Merged images showed an accentuated nuclear staining - co-localization of Fer/actin- in comparison to control cells, as depicted in Figure 3. These results confirm that cytochalasin D induced an important remodelling of the actin cytoskeleton, not only in the cytoplasm but in the nucleus. Of interest, similar effects of this drug on actin were reported in mouse embryos (Nguyen *et al.*, 1998). In the present situation, the perturbation of the cytoplasmic actin cytoskeleton by Cytochalasin D was drastic and its nuclear accumulation coincided with a net re-localization of the Fer tyrosine kinase in the nucleus of Pca cells.

To investigate if cytochalasin D treatment affects Fer activation, protein extracts from Pca cells exposed to the drug were immunoprecipitated with Fer antibodies and blotted with anti-pY. Figure 6 B shows that the extent of Fer tyrosine phosphorylation was strongly reduced by cytochalasin D in comparison to control cells whereas levels of immunoglobulins seen in the low molecular region were similar (Fig. 6B; left panel).

Based on the functional role of Fer activity on actin in Pca cells not exposed to the drug (Figure 4), we tested whether pY-actin levels were altered in parallel. Actin blots were carried out on immunoprecipitates obtained with anti-pY antibodies from control cells and cytochalasin D-treated cells. Surprisingly, levels of tyrosine phosphorylated actin were increased in comparison to control cells (Figure 6B, middle panel). Levels of actin associated with Fer were also increased (Fig. 6B, right panel). Results were reproducible and obtained repeatedly (n=4).

Based on immunofluorescence data (phalloidin/Fer) showing high levels of polymerized F-actin in the nucleus of Pca cells and independent reports showing that both Fer and actin reach the chromatin (Hao *et al.*, 1991; Crowley and Brasch 1987); we wondered whether Fer/actin and pY-actin may be present in such a nuclear fraction. Pca cells exposed to cytochalasin D were fractionated to obtain

nuclei and the latter were processed to obtain nuclear free and chromatin fractions. Equivalent amounts of proteins were next immunoprecipitated with Fer and anti-pY antibodies and probed to detect actin. Results shown in Figure 6C (left panels) indicate a preferential accumulation of complexes and pY-actin in the chromatin fraction. Moreover, when the histone-rich as well as nucleosomal proteins and the residual DNA matrix fractions were probed for the presence of Fer and actin, both proteins was detected (Fig. 6C, right panel). These findings suggest that Pca cells respond to cytochalasin D by an important remodelling of the actin cytoskeleton in the cytoplasm and the formation of a nuclear actin network. This greatly affects Fer activation and distribution as well as its function with regards to actin. Indeed, compensatory mechanisms involving other TKs or alternatively, phosphatases, then lead to further increase in the extent of actin tyrosine phosphorylation.

## Discussion

The ability of certain proteins to form specific but dynamic complexes with partners through protein interactions is fundamental for numerous signal transduction pathways regulating several biological processes. In this regard, the activity of tyrosine kinases and corresponding protein phosphatases is critical for the regulation of physiological functions of normal cells and anomalies in these enzymes (expression, activity, partners) often result in dysregulated growth. Our findings on Fer are suggestive of a critical molecule of the Fer tyrosine kinase in prostate cells. In the dog prostate, Fer expression correlates with the presence of activated basal cells surviving androgen suppression and growing independently of androgens *in vivo* and *in vitro* (Allard *et al.*, 2000). Moreover, Fer expression levels are elevated in tissue extracts from prostate cancer patients. In addition, the kinase is constitutively active in human Pca cell lines. Notably, the highly aggressive human PC-3 cells do not survive to the abolishment of Fer expression (Allard *et al.*, 2000; unpublished data) and the growth of PC3 clones with reduced Fer protein/transcript levels is highly impaired (Allard *et al.*, 2000). This was without significance on cell interactions, adhesions, and shape of resulting clones. Moreover, Fer did not form specific complexes with p120Cas,  $\beta$ -catenin, and cortactin in PC3 cells (Allard *et al.*, 2000). As this may reflect differences due to the cell context (malignant prostate cancer vs fibroblasts or others), we postulated, based on lack of specific Fer/cortactin complexes and minimal effects on cell shape, that Fer function was unlikely linked to the actin cytoskeleton and pursued our search of Fer partners in androgen-independent Pca cells representing the advanced stage of the disease.

Paradoxically, in the present investigation, we identified actin, the central protein of the cytoskeleton, as a Fer-associated protein and a substrate of Fer in prostate cancer cells. Several aspects of this interaction represent novel observations, namely that actin tyrosine phosphorylation largely depends on Fer activity, that the pY-actin/Fer interaction takes place *via* the Fer-SH2 domain, that the function of Fer related to actin implicates the filamentous rather than the globular form of actin, and more importantly, that Fer/actin complexes containing varying levels of pY-actin likely exert a nuclear rather than a cytoplasmic function in Pca cells. Moreover, this mechanism is apparently tightly controlled in cells and its perturbation by stress-inducing agents known to affect the actin cytoskeleton, is

associated with the activation of compensatory mechanisms, causing further increase in nuclear pY-actin. Each of these observations warrants some consideration and need to be put in perspective with current knowledge on the still highly debated issue of the role of nuclear actin in cells.

The identification of actin as a Fer partner in Pca cells was achieved by immunoprecipitation strategies, primarily based on the Fer ability to interact with proteins that are phosphorylated on tyrosine. Until recently, actin tyrosine phosphorylation was only known to occur in protozoan cells (Schweiger *et al.*, 1992; Jungbluth *et al.*, 1994; Kishi *et al.*, 1998). The actin dephosphorylation by the phosphotyrosine phosphatase, SHP-1, has lately been reported in DT40B cells (Baba *et al.*, 2003). In both instances, the active tyrosine kinase catalyzing actin phosphorylation was not identified. In line with this, it is worth mentioning that actin interacts with the TK c-abl (Van Etten *et al.*, 1994). However, to our knowledge, the activity of c-abl on pY-actin has not been reported. We provided the first evidence that the phosphorylation of actin on tyrosine largely depends on Fer activity, at least in Pca cells. In supported of this statement is the very close relationship established between Fer kinase activity/activation and the overall cellular levels of pY-actin in cells. This was achieved by the use of mutated *fer* constructs transfected in Pca cells, so as to abolish Fer activity and reduce its activation in comparison to wild-type Fer. The drastic down regulation of actin levels detected among cellular phosphotyrosine-enriched proteins strongly suggest that actin is a substrate of Fer. Moreover, these findings indicate that Fer is the main kinase that phosphorylates actin in the physiological context of Pca cells.

We obtained highly informative data on the molecular basis of Fer/actin complexes in Pca cells. More specifically, we demonstrated that pY-actin/Fer interaction occurs through the SH2 domain of Fer. Based on the current knowledge of protein-protein interactions mediated *via* SH2 domains and pY-residues in specific protein sequence (Bradshaw and Waksman 2002), we conclude that the interaction between pY-actin and the Fer/SH2 domain is most likely direct. It is worth mentioning that this domain in Fer is also responsible of Fer interaction with cortactin (Kim and Wong 1998). In addition, the recent demonstration of SHP-1 activity on pY-actin dephosphorylation in DT40B cells occurs through a pY-actin/SHP-1 interaction taking place *via* the SH2 domain of SHP-1 (Baba *et al.*,

2003). The possibility that SHP-1 and/or c-abl may be implicated in the present system to regulate pY-actin levels remains to be investigated.

Another key observation concerns the levels of actin/Fer complexes. The fact that Fer activity (use of Fer mutants) does not affect Fer/actin complexes while actin is then almost completely non tyrosine phosphorylated has three main implications. Firstly, the levels of pY-actin contributing to Fer/actin complexes likely represent a small portion of the overall actin pool in Pca cells. Secondly and although the role of pY-actin is unknown, Fer appears as the main TK that regulates the threshold of pY-actin in the physiological context of Pca cells. Although Fer is present in both F- and G-actin fractions, its action appears specific for filamentous actin where we observed a preferential distribution of both Fer/actin complexes and pY-actin. Fer may then play a role in a process related to the dynamics of actin assembly/disassembly for putative nuclear rather than cytoplasmic functions. The third aspect that follows from our findings on Fer/actin complexes is that Fer likely binds non phosphorylated actin *via* other domains or motifs. Among possibilities are: 1) the coiled coil domain of Fer, or else, 2) a F-actin binding domain. The first example (CC domain) is the actin interaction with the cytoskeletal protein, coronin, demonstrated *in vitro* to be mediated *via* the coiled coil domain of coronin (Spoerl *et al.*, 2002). The binding sequence in actin is unknown. Whether actin may contain a CC domain is also not known but CC motifs alone were reported to interact with other proteins containing similar CC domains (Reynolds *et al.*, 1992). Of interest, the interaction between Fer and p120Cas takes place through CC domains in each of these proteins (Kim and Wong 1998). The second example concerns c-abl and p53 interacting with F-actin through F-actin binding domains identified in each of these proteins (Van Etten *et al.*, 1994; Okorokov *et al.*, 2002). Given that Fer also binds F-actin preferentially, more studies on Fer/actin complexes are needed to determine which part of Fer structure mediates the Fer interaction with the non tyrosine phosphorylated form of actin.

The distribution of Fer/actin complexes in the nucleus of Pca cells *in situ*, followed primarily by phalloidin staining, the distribution of Fer/actin as well as pY-actin in the chromatin, and the presence of both proteins in the DNA matrix is intriguing. To deal with these features and try to better understand the meaning of our findings, we will briefly consider the literature on nuclear actin and Fer,

separately, in cells. Some attention will next be given to actin in cells responding to diverse types of stress.

Actin was detected in the nucleus of several different mammalian cell types, such as fibroblastes and Hela cells (Lestourgeon *et al.*, 1975), hepatocytes (Crowley and Brasch 1987), hepatoma (Bremer *et al.*, 1981), Guerin ascites tumour cells (Valkov *et al.*, 1989), lymphocytes (Nakayasu and Ueda 1983), oocytes ((Funaki *et al.*, 1995), as well as in non mammalian components of the nuclear matrix (Nakayasu and Ueda 1983; Valkov *et al.*, 1989). Among numerous biological processes taking place in the nucleus of various cell types, nuclear actin has been associated with nucleocytoplasmic transport (Schindler and Jiang, 1986), positioning of chromatin domains (Amankwah and DeBoni, 1994), chromosome condensation (Lesturgeon *et al.*, 1975; Rungger, 1979), anchoring mRNA to nuclear matrix (Pederson, 1998), and transcription (Egly *et al.*, 1984; Schweiger *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1998). The literature on Fer points to potential roles in chromatin binding (Hao *et al.*, 1991), regulation of the cell cycle (Ben-Dor *et al.*, 1999), and binding to transcription factors (Priel-Halachmi *et al.*, 2000). Additional data from our recent study on Fer in interleukin-6 mediated Pca cell growth indicate that Fer regulates STAT3 activation in this pathway (Zoubeidi *et al.*, 2003). Moreover, we demonstrated that interleukin-6 affects the Fer cytoplasmic to nuclear distribution and, more importantly, drives a nuclear translocation of Fer along with STAT3. In addition, Fer/STAT3 complexes are found in the chromatin and DNA matrix. Since this pathway is related to cell survival and growth, the possibility of a link between nuclear Fer complexes involving actin and transcription factors such as STAT3 is currently under investigation in the context of IL-6 signaling.

To date, no study deals with Fer/actin and more particularly pY-actin in the nucleus of mammalian cells. Therefore, nuclear Fer/actin (pY-actin) complexes may be implicated in any (or several) of the common processes listed above. Some clues on potential roles come from observations on a net accumulation of nuclear F-actin (phalloidin stained) related to cell response to stress as well as Fer in cell survival. For instance, in mouse embryo, cytochalasin D induces the formation of a nuclear actin network (Nguyen *et al.*, 1998), referred to as distinct actin bundles or rods in somatic cells and slime molds (Yahara *et al.*, 1982). Therefore, cytochalasin D, a drug normally known to disturb the F-actin cytoskeleton in the cell cytoplasm, greatly affects the nuclear actin network and polymerization state. Other inducers of

nuclear actin structures are heat shock (Iida *et al.*, 1986) and DMSO treatment (Osborn and Weber, 1980). Elevation of nuclear actin was also reported in hematopoietic cells responding to hyperthermia (Luchetti *et al.*, 2002). Our demonstration that such a disturbance of nuclear actin organization by a stress (cytochalasin D) affects nuclear Fer/actin complexes and pY-actin warrants consideration. Indeed, the only reported situation where the cellular pY-actin content increases is in cell response to stress, notably in protozoan cells exposed to heat and osmotic shocks, oxidative stress, DMSO, and nutrient starvation (Jungbluth *et al.*, 1994; Jungbluth *et al.*, 1995). Based on the above, it appears that pY-actin may be related to mechanisms regulating cell survival. That Fer is implicated in such mechanisms is supported by data on its overexpression in Fer-deficient hematopoietic cells (Pre-T), which were rescued from lethal stress (radiation-induced) by Fer (Penhallow *et al.*, 1995). Our findings in Pca cells may then potentially be highly significant considering our earlier data on the critical role of Fer in their survival and growth (Allard *et al.*, 2000; unpublished data). Collectively, all of these data strongly support that the threshold of pY-actin may be determinant in cell survival or recovery from stress. Based on our study, the sole to date dealing with the regulation of pY-actin by tyrosine kinases, it appears that pY-actin is under the normal control of Fer. However, this mechanism appears to be counterbalanced by compensatory mechanisms that further increase pY-actin levels when Fer function is hampered. The understanding of mechanisms and signals controlling nuclear Fer/pY-actin complexes may then be key for the development of novel interventions to impact on Pca. Indeed, the lethal component of the disease in man is attributed to androgen-independent tumor cells and, of significance, Fer appears to be part of alternate pathways that confer growth advantages to tumor cells surviving androgen suppression and growing despite lacking androgens (Allard *et al.*, 2000).



### **Acknowledgements**

The authors are most thankful to the Dept of Urology, McGill University Health Centre, for sponsoring this research. They also recognize Ms F. Zouanat and Mr. S. Tessier for technical assistance. Ms A. Zoubeidi received a studentship from the Dept of Biochemistry, Faculty of Graduate Studies, University of Montreal.

## Legends

### Figure 1: Fer antibodies

Immunoglobulins purified from pre-immune (IgG) and immune (Fer) rabbit sera were tested for their ability to detect Fer in Pca (PC3) cells. Upper left panels: Western blotting with Fer antibodies (1:3000, 1hr) and pre-immune IgGs (1:3000, 1hr) showing the 94 kDa Fer protein relative to the position of molecular markers in whole cell lysates. To assess specificity, Fer antibodies were pre-incubated in the presence of 0, 2, 5, and 10  $\mu\text{g}$  of GST-Fer fusion protein for 15 min at room temperature prior Western blotting. Upper right panels: Fer immunoprecipitation (IP). Pre-immune IgG and Fer antibodies were used for IPs, as described in Methods. Fer kinase activity was next tested by *in vitro* phosphorylation in the presence of radiolabelled ATP, resolved by SDS-PAGE and submitted to autoradiography after alkali treatment (see Methods). The recombinant Fer protein was obtained from Pca cells transfected with WT-*fer* cDNA tagged with a myc-his epitope, using 4 and 8  $\mu\text{g}$  of Fer antibodies for IP, followed by Western blotting using myc antibodies (1:5000; 1hr).

Lower panels: Photomicrographs showing Fer distribution in Pac (PC3) cells by immunofluorescence staining. Cells were fixed and stained with Fer antibodies (a), and competed for using 10  $\mu\text{g}$  of purified GST-Fer protein (b) Control pre-immune IgG are shown (c). Pca cells were stained with myc antibodies. Parental (d) and transfected with myc-*fer* cDNA (WT) (e). Magnification: 400X

**Figure 2:** Identification of a 42 kDa tyrosine phosphorylated protein interacting with Fer and demonstration that actin is tyrosine phosphorylated.

(A) Pca (PRO4) cell lysates (750 $\mu\text{g}$  proteins) were immunoprecipitated (IP) using either control pre-immune IgG or Fer antibodies. The IPs were resolved by SDS-PAGE, transferred on membranes and probed with anti-pY antibodies (1:3000; 1h) (upper panel). The membrane was stripped and reprobed with Fer antibodies (lower panel).

(B) Pca (PRO4) cell lysates (750  $\mu$ g proteins) were IP using either control pre-immune IgG , actin (upper panel) or pY- (lower panel) antibodies. The IPs were resolved by SDS-PAGE, transferred on membranes, and probed with anti-actin antibodies (1:3000; 1h)(upper panel) or anti-pY (1:3000; 1h)(lower panel). An actin blot of the immunoprecipitated actin is shown (lower panel) as well as whole cell lysates (30  $\mu$ g proteins) probed with anti-actin (upper panel).

**Figure 3:** Actin interacts with Fer in vitro and in vivo in Pca cells and binds the SH2 domain of Fer

(A) Pca (PRO4) cell lysates (750  $\mu$ g proteins) were immunoprecipitated (IP) using either control pre-immune IgG or Fer antibodies. The IPs were resolved by SDS-PAGE, transferred on membranes and probed with anti-actin antibodies (1:3000; 1h). The membrane was stripped and reprobed with Fer antibodies (lower panel). The actin blot in whole cell lysates (30  $\mu$ g proteins; WL) is also shown (left lane).

(B) Pca (PRO4) cells were fixed and stained with Fer antibodies (left top panel) and revealed by fluorescence (green) after incubation with secondary anti-rabbit antibodies coupled to FITC. The actin cytoskeleton was stained by phalloidin TRITC (red) (right top panel), as described in Methods. Nuclei were stained with DAPI (lower right). The merged image is shown (yellow) (lower left). Experiments were repeated at least 5 times and yielded similar staining patterns in a majority of cells (representative photomicrographs are shown). Magnification (400X).

(C) Tyrosine phosphorylated proteins and actin in Pca cells interact with the purified SH2 domain of Fer. The fusion protein SH2-Fer domain fused to GST was purified as described in Methods. Extracts from bacteria expressing GST, GST/SH2-Fer, and purified GST/SH2-Fer were resolved by 10% SDS-PAGE, stained with Coomassie blue, and dried (Left upper panel). Proteins (750  $\mu$ g) from Pca (PRO4) cell lysates were pulled down using either control purified GST or purified GST/SH2-Fer. Precipitates were resolved by SDS-PAGE, transferred on membranes, and probed using anti-pY antibodies (1:3000; 1h)(right top panel) or anti actin (1:3000; 1h)(lower middle panel).

**Figure 4:** Actin tyrosine phosphorylation depends on Fer activity but not levels of Fer/actin complexes

Ectopic Fer proteins. Pca (PRO4) cells were transfected with 5 $\mu$ g of plasmids expressing myc-Fer wild type (WT), myc-Fer<sub>K592R</sub> (KD), myc-Fer<sub>Y719P</sub> (Y\*), or myc-Fer<sub>K592R-Y719P</sub> double negative (DN). Cell lysates were afterwards analyzed by Western blotting with myc (top panel) and Fer (second panel) antibodies to detect ectopic Fer and endogenous Fer. Whole cell lysates were subjected to IP using myc and tested for Fer activity by *in vitro* phosphorylation in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, followed by SDS-PAGE, alkali treatment of gels and autoradiography (as described in Methods) (third panel). Myc-IPs were analyzed by Western blotting in parallel to determine levels of myc-recombinant proteins (fourth panel) and interaction with actin (last panel). The presence of tyrosine phosphorylated actin was also assessed by Western blotting using pY- IPs probed with anti-actin (fifth panel).

**Figure 5:** Actin is preferentially tyrosine phosphorylated in its filamentous state, which also binds Fer.

Protein extracts enriched in G- or F-actin (30 $\mu$ g) were obtained from Pca cells as described in Methods, resolved in SDS-PAGE, transferred on membranes, and probed with anti-actin (top panel) or anti-Fer (second panel) antibodies. Proteins fractions (750 $\mu$ g) enriched in G- or F-actin were IP using anti-Fer or anti-pY antibodies. IPs were resolved in SDS-PAGE, transferred on membranes, and probed with antibodies to detect pY (1:3000; 1h) (third panel) or actin (1:3000; 1h) (fourth panel), respectively. Levels of Fer/actin complexes were assessed after Fer IPs and actin immunoblotting (fifth panel). The presence of Fer in Fer-IPs from F- and G- actin fraction is shown (last panel).

**Figure 6** Effects of cytochalasin D on Fer/actin complexes *in vivo* and *in vitro*, Fer activation, and actin tyrosine phosphorylation

(A) Pca (PRO4) cells were exposed to Cytochalasin D, fixed, and stained to detect Fer (left top panel; Fer antibodies/green), the actin cytoskeleton (right top panel; phalloidin TRITC/red), as described in Method and legends of Figure 3. Nuclei were stained with DAPI (lower right). The merged image is shown (yellow) (lower left). Experiments were repeated at least 5 times and yielded similar staining patterns in a majority of cells (representative photomicrographs are shown). Magnification (200X).

(B) Protein extracts from whole lysates from control- and Cytochalasin D-treated Pca (PRO) cells were immunoprecipitated (IP) using either Fer or anti-pY antibodies. The IPs were resolved by SDS-PAGE, transferred on membranes, and probed with anti-pY (left panel) and actin (middle and right panels) antibodies.

(C) Pca cells were fractionated after Cytochalasin D treatment to obtain the cytosol and nuclei. This fraction was further extracted so as to obtain nuclear free and chromatin fractions. Proteins were next immunoprecipitated (IP) using either Fer or anti-pY antibodies. The IPs were resolved by SDS-PAGE, transferred on membranes, and probed with anti-actin (top left panel) and anti-pY (lower left panel), respectively. Further fractionation of the chromatin, as described in Methods, yielded nucleosomal (s1) and histone-rich (S2) proteins together with a residual DNA matrix fraction (P). Each fraction (35 $\mu$ g proteins) was probed by Western blotting to detect Fer (top right panel) and actin (lower right panel).

## References

Allard, P., A. Atfi, F. Landry, A. Chapdelaine and S. Chevalier (1997). "Estradiol activates p60src, p53/56lyn and renatured p50/55 protein tyrosine kinases in the dog prostate." Mol Cell Endocrinol **126**(1): 25-34.

Allard, P., A. Zoubeidi, L. T. Nguyen, S. Tessier, S. Tanguay, M. Chevette, A. Aprikian and S. Chevalier (2000). "Links between Fer tyrosine kinase expression levels and prostate cell proliferation." Mol Cell Endocrinol **159**(1-2): 63-77.

Aspenstrom, P. (1997). "A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton." Curr Biol **7**(7): 479-87.

Baba, T., N. Fusaki, N. Shinya, A. Iwamatsu and N. Hozumi (2003). "Actin tyrosine dephosphorylation by the Src homology 1-containing protein tyrosine phosphatase is essential for actin depolymerization after membrane IgM cross-linking." J Immunol **170**(7): 3762-8.

Ben-Dor, I., O. Bern, T. Tennenbaum and U. Nir (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 Differ **10**(2): 113-29.

Bremer, J. W., H. Busch and L. C. Yeoman (1981). "Evidence for a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and muscles actins." Biochemistry **20**(7): 2013-7.

Chen, Y. M., N. P. Lee, D. D. Mruk, W. M. Lee and C. Y. Cheng (2003). "Fer kinase/FerT and adherens junction dynamics in the testis: an in vitro and in vivo study." Biol Reprod **69**(2): 656-72.

Craig, A. W. and P. A. Greer (2002). "Fer kinase is required for sustained p38 kinase activation and maximal chemotaxis of activated mast cells." Mol Cell Biol **22**(18): 6363-74.

Craig, A. W., R. Zirngibl and P. Greer (1999). "Disruption of coiled-coil domains in Fer protein-tyrosine kinase abolishes trimerization but not kinase activation." J Biol Chem **274**(28): 19934-42.

Craig, A. W., R. Zirngibl, K. Williams, L. A. Cole and P. A. Greer (2001). "Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation." Mol Cell Biol **21**(2): 603-13.

Crowley, K. S. and K. Brasch (1987). "Does the interchromatin compartment contain actin?" Cell Biol Int Rep **11**(7): 537-46.

Egly J.M, N.G Miyamoto, V P Moncollin, Chambon (1984). "Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B?" EMBO J **3**(10):2363-71.

Funaki, K., T. Katsumoto and A. Iino (1995). "Immunocytochemical localization of actin in the nucleolus of rat oocytes." Biol Cell **84**(3): 139-46.

Greer, P. (2002). "Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(4): 278-89.

Hao, Q. L., D. K. Ferris, G. White, N. Heisterkamp and J. Groffen (1991). "Nuclear and cytoplasmic location of the FER tyrosine kinase." Mol Cell Biol **11**(2): 1180-3.

Hao, Q. L., N. Heisterkamp and J. Groffen (1989). "Isolation and sequence analysis of a novel human tyrosine kinase gene." Mol Cell Biol **9**(4): 1587-93.

Iida K, H Iida, I Yahara (1986). Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. Exp Cell Res **165**(1):207-15.

Iwanishi, M., M. P. Czech and A. D. Cherniack (2000). "The protein-tyrosine kinase fer associates with signaling complexes containing insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **275**(50): 38995-9000.

Jungbluth, A., C. Eckerskorn, G. Gerisch, F. Lottspeich, S. Stocker and A. Schweiger (1995). "Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in Dictyostelium cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop." FEBS Lett **375**(1-2): 87-90.

Jungbluth, A., V. von Arnim, E. Biegelmann, B. Humbel, A. Schweiger and G. Gerisch (1994). "Strong increase in the tyrosine phosphorylation of actin upon inhibition of oxidative phosphorylation: correlation with reversible rearrangements in the actin skeleton of Dictyostelium cells." J Cell Sci **107** ( Pt 1): 117-25.

Kapus, A., C. Di Ciano, J. Sun, X. Zhan, L. Kim, T. W. Wong and O. D. Rotstein (2000). "Cell volume-dependent phosphorylation of proteins of the cortical cytoskeleton and cell-cell contact sites. The role of Fyn and FER kinases." J Biol Chem **275**(41): 32289-98.

Kim, L. and T. W. Wong (1995). "The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors." Mol Cell Biol **15**(8): 4553-61.

Kim, L. and T. W. Wong (1998). "Growth factor-dependent phosphorylation of the actin-binding protein cortactin is mediated by the cytoplasmic tyrosine kinase FER." J Biol Chem **273**(36): 23542-8.

Kishi, Y., C. Clements, D. C. Mahadeo, D. A. Cotter and M. Sameshima (1998). "High levels of actin tyrosine phosphorylation: correlation with the dormant state of Dictyostelium spores." J Cell Sci **111** ( Pt 19): 2923-32.



Kreitz, S., M. Ritz, M. Baack and R. Knippers (2001). "The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells." J Biol Chem **276**(9): 6337-42.

Lestourgeon, W. M., A. Forer, Y. Z. Yang, J. S. Bertram and H. P. Pusch (1975). "Contractile proteins. Major components of nuclear and chromosome non-histone proteins." Biochim Biophys Acta **379**(2): 529-52.

Letwin, K., S. P. Yee and T. Pawson (1988). "Novel protein-tyrosine kinase cDNAs related to fps/fes and eph cloned using anti-phosphotyrosine antibody." Oncogene **3**(6): 621-7.

Luchetti F, S Burattini, P Ferri, S Papa, E Falcieri (2002). "Actin involvement in apoptotic chromatin changes of hemopoietic cells undergoing hyperthermia." Apoptosis **7**(2):143-52.

Lunter, P. C. and G. Wiche (2002). "Direct binding of plectin to Fer kinase and negative regulation of its catalytic activity." Biochem Biophys Res Commun **296**(4): 904-10.

Nakayasu, H. and K. Ueda (1983). "Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes." Exp Cell Res **143**(1): 55-62.

Nguyen, E., D. Besombes and P. Debey (1998). "Immunofluorescent localization of actin in relation to transcription sites in mouse pronuclei." Mol Reprod Dev **50**(3): 263-72.

Okorokov A.L, C.P Rubbi, S Metcalfe, J Milner (2002). "The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage." Oncogene **21**(3):356-67.

Osborn M, K Weber (1980). "Dimethylsulfoxide and the ionophore A23187 affect the arrangement of actin and induce nuclear actin paracrystals in PtK2 cells." Exp Cell Res **129**(1):103-14.

Pawson, T., K. Letwin, T. Lee, Q. L. Hao, N. Heisterkamp and J. Groffen (1989). "The FER gene is evolutionarily conserved and encodes a widely expressed member of the FPS/FES protein-tyrosine kinase family." Mol Cell Biol **9**(12): 5722-5.

Pederson T (1998). "Thinking about a nuclear matrix." J Mol Biol. **277**(2):147-59.

Penhallow, R. C., K. Class, H. Sonoda, J. B. Bolen and R. B. Rowley (1995). "Temporal activation of nontransmembrane protein-tyrosine kinases following mast cell Fc epsilon RI engagement." J Biol Chem **270**(40): 23362-5.

Priel-Halachmi, S., I. Ben-Dor, S. Shpungin, T. Tennenbaum, H. Molavani, M. Bachrach, S. Salzberg and U. Nir (2000). "FER kinase activation of Stat3 is determined by the N-terminal sequence." J Biol Chem **275**(37): 28902-10.

Reynolds, A. B., L. Herbert, J. L. Cleveland, S. T. Berg and J. R. Gaut (1992). "p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo." Oncogene **7**(12): 2439-45.

Rosato, R., J. M. Veltmaat, J. Groffen and N. Heisterkamp (1998). "Involvement of the tyrosine kinase fer in cell adhesion." Mol Cell Biol **18**(10): 5762-70.

Schindler M, L.W Jiang (1986). "Nuclear actin and myosin as control elements in nucleocytoplasmic transport." J Cell Biol **102**(3):859-62.

Schweiger, A., O. Mihalache, M. Ecke and G. Gerisch (1992). "Stage-specific tyrosine phosphorylation of actin in Dictyostelium discoideum cells." J Cell Sci **102** ( Pt 3): 601-9.

Spoerl Z, M Stumpf, A.A Noegel, A Hasse (2002). "Oligomerization, F-actin interaction, and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus." J Biol Chem **13**;277(50):48858-67.

Sudol, M. (1998). "From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'." Oncogene **17**(11 Reviews): 1469-74.

Valkov, N. I., M. I. Ivanova, A. A. Uscheva and C. P. Krachmarov (1989). "Association of actin with DNA and nuclear matrix from Guerin ascites tumour cells." Mol Cell Biochem **87**(1): 47-56.

Van Etten R.A, P.K Jackson, D Baltimore, M.C Sanders, P.T Matsudaira, P.A Janmey (1994). "The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity." J Cell Biol. **124**(3):325-40.

Yahara I, F Harada, S Sekita, K Yoshihira, S Natori (1982). "Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro." J Cell Biol **92**(1):69-78.

Zoubeidi A, N Tritch, F Zouanat, A. G Aprikian, S Chevalier (2003). "A Novel Tyrosine Kinase in Interleukin-6 signaling in Advanced Prostate Cancer." Oncogene under revision.

Figure 1

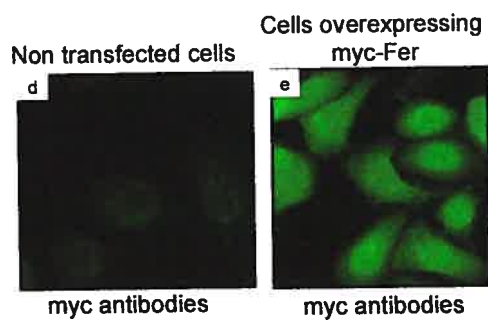
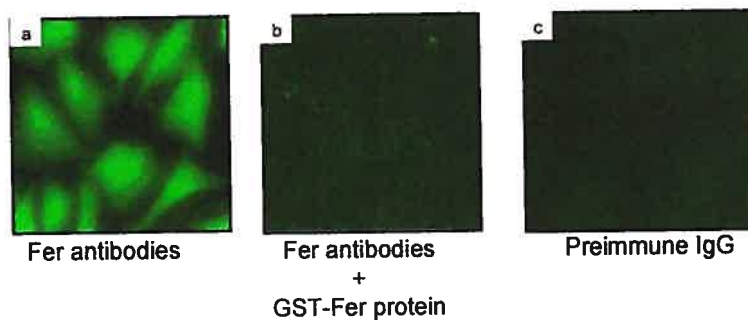
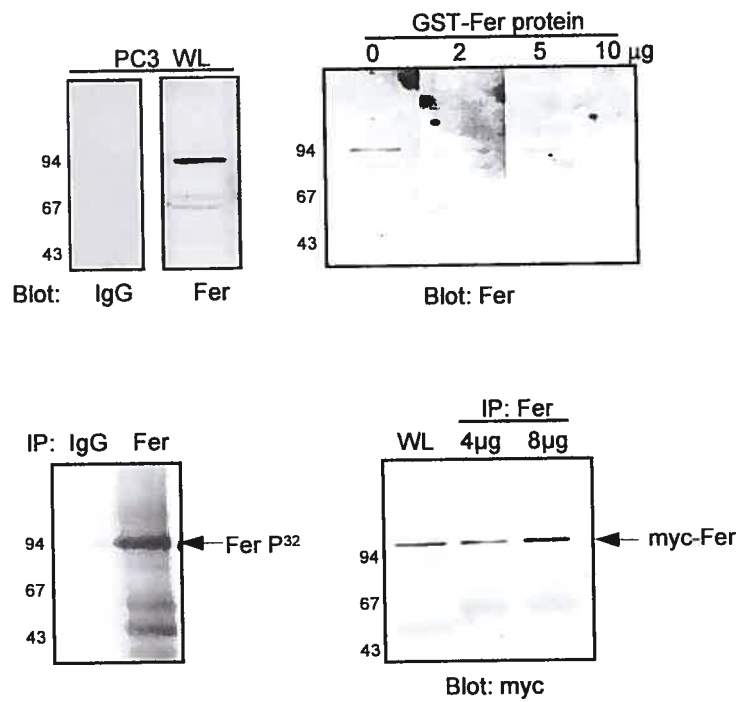
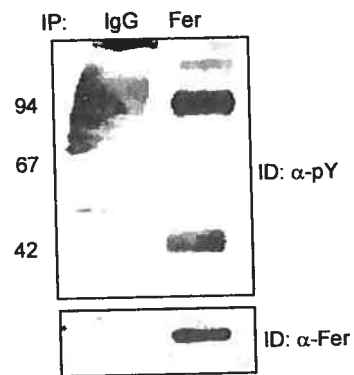


Figure 2

A



B

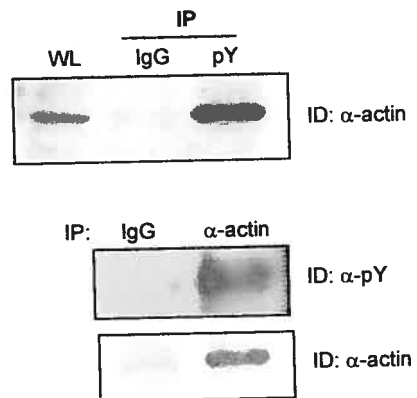
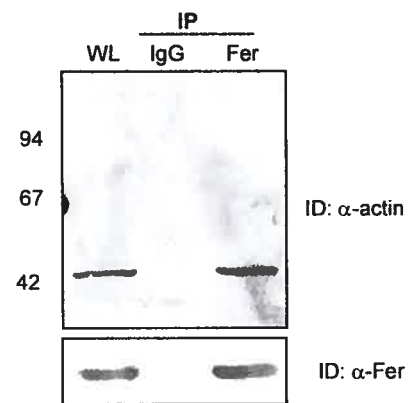
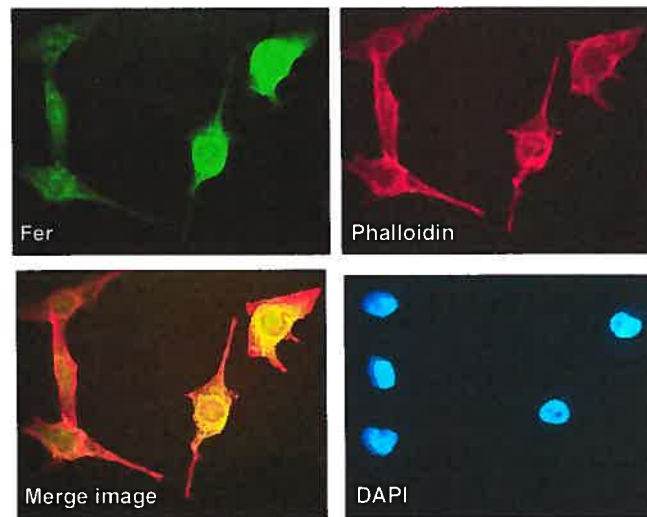


Figure 3

A



B



C

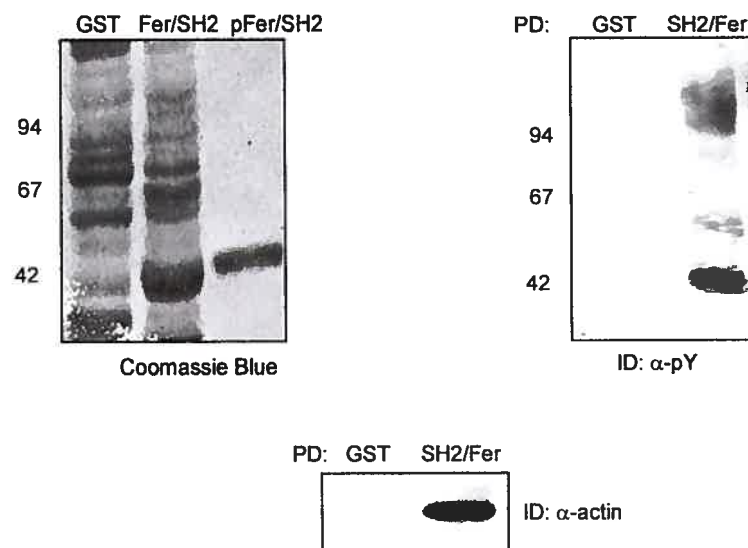


Figure 4

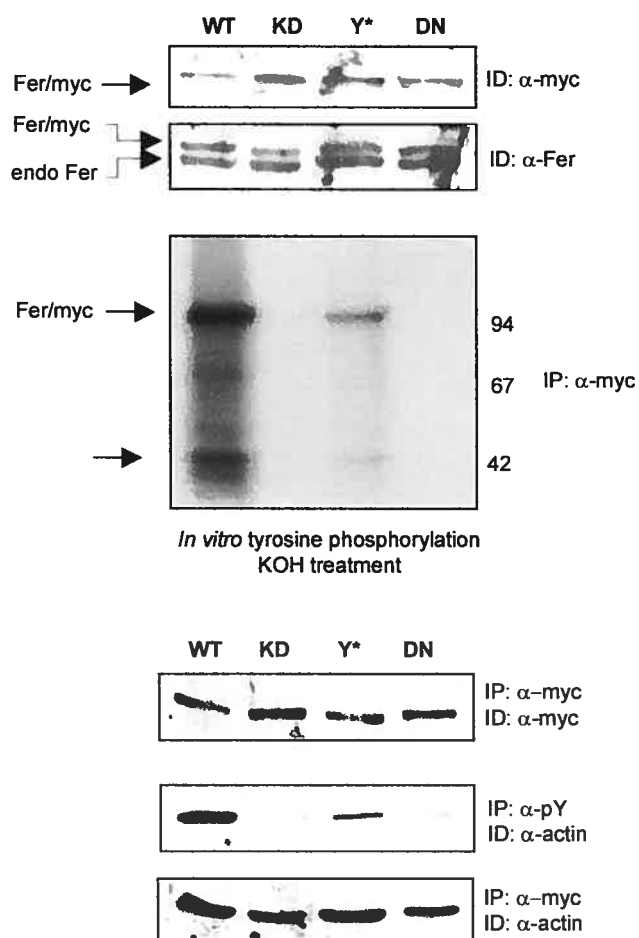


Figure 5

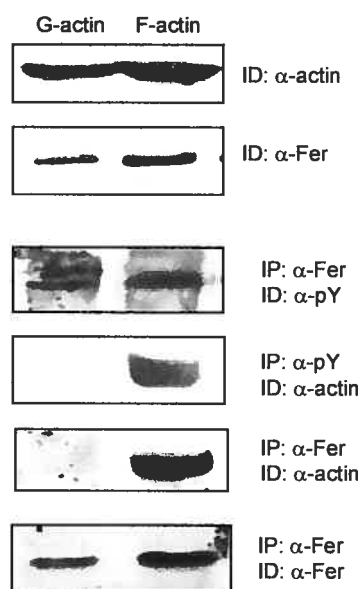
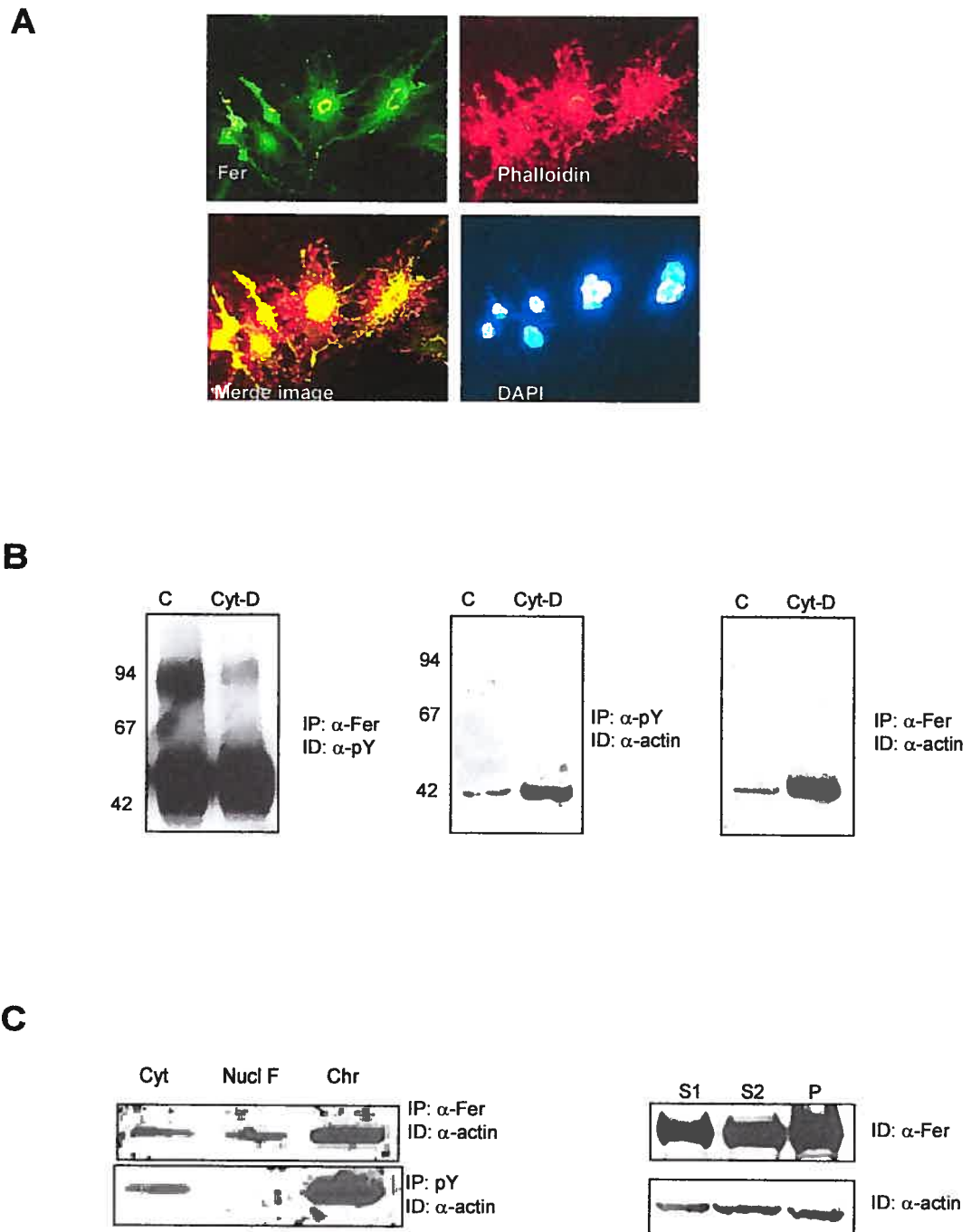




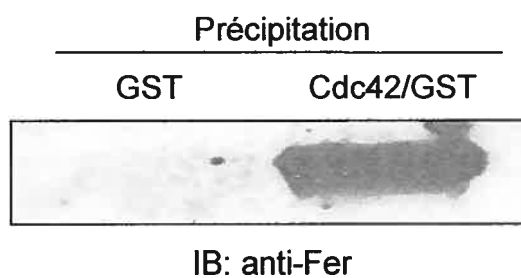
Figure 6



## 5 Annexe II

### 5.1 *Cdc42 : un partenaire de Fer*

- **Préambule** : Fer possède en N-terminal un domaine FCH, domaine identifié dans Fer en raison de son homologie avec les protéines qui interagissent avec Cdc42 (CIP). À ce jour, aucune protéine n'a été identifiée quant à sa capacité d'interagir avec ce domaine. Rappelons que les protéines qui présentent le domaine CIP sont principalement impliquées dans la régulation du cytosquelette, du transport des vésicules et de l'endocytose. Étant donné que Fer interagit avec l'actine, nous proposons que :
- **Hypothèse** : Fer forme un complexe avec Cdc42
- **Méthodes** : La protéine Cdc42 fusionnée à la glutathione-S-transférase (GST) (courtoisie du Dr Yang, Cornell University) a été induite dans les bactéries et purifiée sur billes de glutathione Sepharone, comme décrit dans les manuscrits II & III. Des extraits de protéines de PC3 ont été précipités en présence des protéines Cdc42 et GST purifiées. L'immunobuvardage a été réalisé avec un anticorps polyclonal dirigé contre Fer.
- **Résultats** : La figure 21 montre que Fer est présente uniquement dans les extraits précipités avec Cdc42 et non dans les extraits précipités avec la GST, utilisée comme contrôle négatif.
- **Conclusion** : Ces résultats indiquent que Fer est un partenaire de Cdc42 dans les cellules PC3 et suggèrent que l'interaction est médiée via le domaine FCH de Fer.



**Figure 21: Fer interagit avec cdc42 dans les cellules PC3.**

Les extraits protéiques (750  $\mu\text{g}$ ) ont été précipités (pull down) avec 5  $\mu\text{g}$  de Cdc42-GST et 5  $\mu\text{g}$  de GST comme contrôle. Les protéines ont été séparées sur gel de SDS-PAGE et l'immunobuvardage a été effectué avec l'anti-Fer.

### III DISCUSSION

Le cancer de la prostate est le cancer le plus diagnostiqué chez l'homme. De plus, un homme de 50 ans a 20 à 25 % de probabilité de subir une intervention chirurgicale pour soulager les symptômes de l'obstruction urétrale conséquents à l'hyperplasie bénigne ou au CaP. Les coûts occasionnés par ces pathologies sont énormes et ne cessent d'augmenter dans les pays industrialisés à cause du vieillissement de la population. *In vivo*, le développement et la fonction de la prostate sont sous le contrôle des androgènes. On croit depuis longtemps que ces hormones sont le facteur étiologique principal du développement du CaP. Cependant, une étude récente sur la prévention du CaP, visant à inhiber la formation de la DHT par le finastéride (action sur l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase) et réalisée sur une période de 7 ans, vient de jeter de l'ombre sur ce concept (Thompson *et al.*, 2003). En effet, si tel qu'attendu, 25% des hommes (dans la soixantaine) de la population contrôle ont développé le CaP au cours de cette période, un CaP a aussi été diagnostiqué chez 18% des sujets traités. La différence est significative. De plus, il a été démontré que le grade Gleason des tumeurs du groupe expérimental était plus élevé que celui trouvé chez les sujets contrôles. Ces résultats pour le moins inespérés sont aussi troublants car ils indiquent un rôle moins prépondérant que prévu des androgènes dans le développement du CaP. Ils appuient le concept de mécanismes sous-jacents indépendants des androgènes. Néanmoins, les thérapies endocriniennes utilisées pour les cancers présentant des extensions péri-prostatiques et avancés (métastatiques) sont bénéfiques et améliorent grandement l'état des patients. Cependant, deux à trois années après le début des traitements, il y a récurrence et les patients progressent rapidement vers le stade terminal de la maladie. Ils décèdent d'un CaP androgéno-indépendant ou réfractaire à ces hormones. D'autre part, la chimiothérapie n'offre qu'une réponse mitigée chez ces patients.

La réponse favorable à l'hormono-thérapie s'explique par l'apoptose des cellules cancéreuses dépendantes des androgènes, laissant la place aux populations de cellules transformées dont la survie ne dépend pas des androgènes. Tel qu'en témoignent les données cliniques chez les patients soumis à des traitements anti-androgéniques intermittents de même que le modèle de xénogreffes produites à partir des cellules LNCaP chez la souris nue (Gleave *et al.*,

1998), une portion de ces cellules qui survivent demeurent sensibles aux androgènes. En effet, elles répondent temporairement au traitement et, ultimement, elles s'adaptent et croissent de façon incontrôlée, donc indépendamment des androgènes. Par ailleurs, tout comme les cellules basales et NE androgéno-indépendantes de la prostate, les tumeurs sont aussi composées de cellules qui dérivent de ces sous-types et qui persistent donc lors de l'hormono-thérapie. Les données actuelles suggèrent que leur sélection progressive contribue à l'hormono-indépendance des tumeurs dans le CaP avancé. Il y a donc un besoin urgent pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant ces populations cellulaires. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au développement du CaP et à sa progression du stade hormono-dépendant au stade hormono-indépendant s'impose.

Outre les androgènes et autres hormones stéroïdiennes, tout un éventail de FCs, de cytokines et de neuropeptides présents dans la circulation et la prostate contrôlent la balance entre la prolifération des cellules souches et leur différenciation en cellules luminales et NE de même que le degré d'apoptose. Certains produits d'oncogènes qui contribuent à la prolifération néoplasique sont des homologues des FC, de leurs récepteurs, ou de molécules de signalisation. Plusieurs de ces FC et autres peptides sont aussi impliqués dans la croissance de la prostate cancéreuse. Ils interagissent et exercent des effets autocriniens et paracriniens qui se répercutent sur les diverses sous-populations de cellules épithéliales (basales, NE, et luminales) et autres types cellulaires (stromales, inflammatoires, endothéliales). Cette action implique l'activation de récepteurs membranaires spécifiques et de nombreuses protéines des voies de signalisation.

Les données actuelles sur le rôle des FC et autres peptides dans la prostate et sur les molécules de signalisation surgissent de plusieurs études effectuées sur les tissus humains et sur les modèles cellulaires qui miment le CaP. Dans notre laboratoire, nous utilisons des lignées de cellules prostatiques cancéreuses humaines, aussi bien androgéno-dépendantes qu'androgéno-indépendantes. Plus spécifiquement, nos études portent principalement sur les cellules LNCaP et PC3, dérivées de métastases prostatiques initialement isolées de ganglions lymphatiques et des os, respectivement (Kaigh *et al.*, 1979; Horoszewicz *et al.*, 1980). Les cellules LNCaP sont plutôt différenciées et androgéno-sensibles, reflétant un stade plus précoce du CaP métastatique. Ainsi, elles expriment le récepteur des

androgènes (RA) et l'APS et répondent aux hormones sexuelles de même qu'aux FCs. Les cellules PC3 sont hautement indifférenciées, et androgéno-indépendantes ou réfractaires à ces hormones. Elles n'expriment pas le RA et l'APS et répondent davantage aux facteurs de croissance et autres peptides. Elles sont très agressives et comparativement aux cellules LNCaP, elles forment facilement des tumeurs chez la souris nue (Horoszewicz *et al.*, 1983). L'utilisation de ces modèles cellulaires nous a permis de mieux comprendre, croyons-nous, certains des mécanismes sous-jacents à la progression du CaP.

Étant donné que les FC, cytokines et neuropeptides stimulent les fonctions des cellules, voire leur prolifération, via l'activation de voies de signalisation faisant appel à des TKs intrinsèques ou associées à leurs récepteurs membranaires respectifs. Notre laboratoire a entrepris le clonage des TKs exprimées dans les cellules basales prostatiques primaires en division et dont la prolifération est régulée par des facteurs de croissance du sérum indépendamment de la présence des stéroïdes sexuels (Chevalier *et al.*, 1981; Chevalier *et al.*, 1984). Parmi les divers gènes identifiés codant pour des TKs figurait *fer*, un gène ubiquitaire qui code une protéine tyrosine kinase de type non récepteur, de 94 kDa. À ce moment et même à ce jour (mis à part nos travaux), aucune étude n'avait fait de lien entre l'expression et la fonction de Fer avec une pathologie humaine. Cependant, Fer avait fait l'objet d'études sur sa structure, sa localisation aussi bien dans le cytoplasme que le noyau selon les types cellulaires, son activation par les FC dont le PDGF, l'EGF, l'INF $\gamma$ , et l'insuline, et l'identification de certains de ses partenaires, et ce, principalement dans des modèles de fibroblastes. Une des ses principales fonctions serait de réguler le cytosquelette via la cortactine. De plus, impliquée dans la voie de signalisation des cadhérines régulant les interactions cellule-cellule, Fer permet le couplage de cette voie à celle des intégrines via son association avec Fak. Elle participe aussi à la réponse immunitaire innée.

Le but principal de cette étude était de déterminer le rôle de Fer dans le CaP. Ces travaux ont été motivés par les raisons suivantes : 1) Fer a été cloné dans les cellules prostatiques en division stimulées par les FCs du sérum et la protéine n'est pas exprimée lorsqu'elles sont au repos dans la prostate normale; 2) Fer est un produit d'oncogène, 3) Fer est impliquée dans la prolifération d'autres types de cellules, et 4) Fer est activée par différents FC.

Dans le manuscrit I, nous avons relié l'expression de Fer à la prolifération des cellules prostatiques basales androgéno-indépendantes, appuyant ainsi un rôle physiologique possible, et avons démontré que sa surexpression est associée au CaP chez l'homme. Nous avons obtenu plusieurs évidences suggérant que Fer est impliquée dans la survie et la prolifération des cellules du CaP. Pourtant, les résultats obtenus chez les souris transgéniques exprimant un dominant négatif de Fer montrent que l'activité de Fer n'est pas requise pour l'embryogénèse et le développement postnatal (Craig *et al.*, 2001). Alors que le gène *fer* est ubiquitaire (Pawson *et al.*, 1989), nous avons montré que la protéine est peu ou faiblement exprimée dans les extraits de la prostate humaine normale et hyperplasique de même que dans les cellules épithéliales fraîchement isolées de la prostate de chien (Allard *et al.*, 2000). Il faut rappeler que le développement de la prostate requiert la présence d'androgènes. En ce sens, nous avons montré chez le chien castré que l'expression de Fer n'est aucunement associée à la régénération de l'épithélium prostatique (cellules luminales ou sécrétrices) par les androgènes. Les niveaux de Fer deviennent cependant élevés après l'induction de la métaplasie des cellules épithéliales basales de la prostate chez le chien castré traité aux oestrogènes. Ceci appuie l'existence d'une relation entre Fer et la prolifération des cellules androgéno-indépendantes, telle qu'aussi observée *in vitro* avec les cellules épithéliales primaires de prostate de chien. Comme le niveau de la protéine Fer est plus élevé dans les tissus de prostate cancéreuse humaine que dans les tissus de prostate humaine hyperplasique et normale (Allard *et al.*, 2000) et que ses niveaux sont accrus dans la lignée PC3 vs LNCaP, il est possible que Fer soit associée aux cellules basales transformées et contribuent davantage aux mécanismes de croissance androgéno-indépendants.

Nos résultats sur la distribution de Fer dans les cellules PC3 et PRO (manuscrits I, II, et III), où Fer est distribuée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, contrastent sensiblement avec celle observée dans les cellules épithéliales primaires de prostate normale de chien en division. En effet, Fer y est majoritairement cytoplasmique et seulement 5% de la protéine est retrouvée dans le noyau (Allard *et al.*, 2000). Dans ces cellules primaires, l'expression et l'activation de Fer dépendent initialement de l'habilité des cellules à se diviser. De plus, des études récentes indiquent que l'expression de Fer et sa localisation dans ces compartiments changent avec le ralentissement du taux de prolifération des cellules

en culture primaire, qui accompagne leur différenciation; Fer est alors exclusivement cytoplasmique (Olivier, 2003). À cet égard, il nous apparaît important de souligner que nos études d'immunohistochimie effectuées sur les tissus humains de prostate avec le nouvel anticorps que nous avons produit (manuscrit II). Celles-ci confirment que Fer est plus exprimée dans les tumeurs alors qu'elle est très peu exprimée dans les zones non cancéreuses des mêmes spécimens. Fait fort intéressant, la distribution cytoplasmique et nucléaire de Fer dans les sections de cancer avancé est similaire à celle observée dans les cellules PC3 alors que les observations récentes sur des lésions pré-malignes montrent une expression cytoplasmique. Une étude approfondie sur un plus large échantillonnage de spécimens humains est en cours afin d'établir si les niveaux d'expression de Fer et surtout sa distribution (cytoplasmique vs nucléaire) corrélerent avec la progression et le pronostic du CaP. Ces différences d'expression et de localisation entre les cellules épithéliales de la prostate normale, pré-maligne, et cancéreuse de Fer pourrait être reliée à la transformation ou à la prolifération cellulaire. De telles observations justifient davantage l'importance d'explorer le rôle fonctionnel de Fer dans les lignées de cellules épithéliales du CaP. Ainsi, une stratégie d'antisens a été développée afin d'abolir l'expression de Fer et déterminer son impact sur la croissance cellulaire.

Les résultats ont montré que la surexpression d'un antisens de l'ADNc de *fer* dans les cellules PC3 ne permet pas d'isoler des clones stables qui n'expriment pas Fer. Ceci suggère que Fer joue un rôle important dans la survie des cellules prostatiques cancéreuses. Ceci a récemment été confirmé au laboratoire avec d'autres stratégies anti-sens, soient des oligonucléotides et des petits ARN. Par ailleurs, chez les clones où le taux d'expression de Fer est abaissé de 70%, le taux de prolifération est fortement retardé puisque le temps de dédoublement des cellules passe de 29 à 42 heures. De plus, tel que le démontre le test de tumorigénicité en agar mou, ces clones perdent leur capacité à former des colonies. Aucune perturbation notable n'est observée au niveau des interactions cellules-cellules et cellules-matrice alors que les changements de forme des cellules sont à peine perceptibles. Ces données suggèrent que Fer est impliquée dans la survie, la prolifération, et la tumorigénicité des cellules du CaP (Allard *et al.*, 2000).

D'autre part, les études sur les partenaires de Fer tant dans les PC3 (Allard *et al.*, 2000) que dans les cellules épithéliales primaires de prostate de chien en



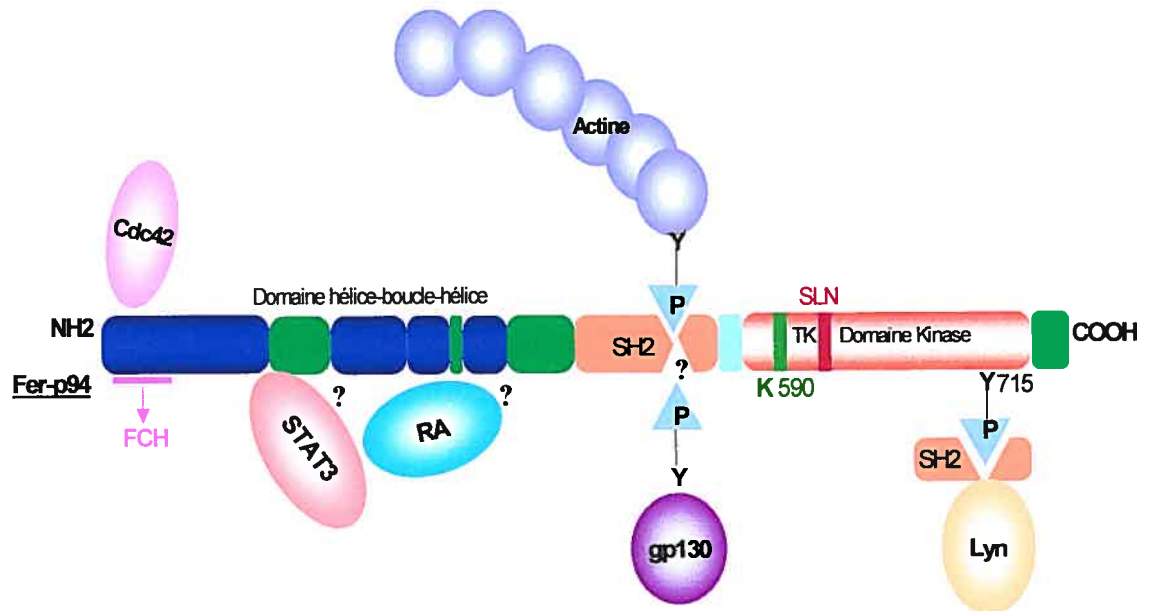
division (Olivier 2003) ont révélé que Fer ne forme pas de complexes avec la  $\beta$ -caténine, la cortactine et p120Cas, identifiés dans d'autres types de cellules. Ceci indique donc que pour transmettre ses signaux dans les cellules de la prostate, Fer requiert d'autres partenaires. À la lumière de ces observations, la recherche de partenaires putatifs de Fer s'imposait afin de mieux comprendre sa fonction. Nous avons choisi les cellules PC3 et la sous-lignée PRO4 comme modèles du stade avancé du CaP.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour atteindre un tel objectif. Nous avons misé sur la structure de la protéine, qui compte un domaine hélice boucle hélice et un domaine FCH en N-terminal, un domaine kinasique contenant le site d'autophosphorylation et la séquence de liaison à l'ATP en C-terminal, et finalement un domaine SH2 central. Hypothétiquement, ces domaines devraient lui conférer la capacité de former des complexes avec plusieurs partenaires et substrats dans les cellules du CaP. Par des techniques simples et directes de précipitations, nous avons ainsi identifié six nouveaux partenaires de Fer représentés à la figure 22: gp130, STAT3, AR, Lyn, actine, et Cdc42. Parmi ceux-ci, seuls STAT3 et l'actine ont récemment été décrits dans la littérature.

Nous avons montré que ces différents partenaires interagissent avec Fer à travers des domaines spécifiques pour réguler des fonctions particulières. Ainsi selon notre étude, ceux-ci peuvent être considérés en deux catégories: 1) L'une formée d'un premier groupe de partenaires, gp130, STAT3, AR et Lyn, que nous avons tous associés à la réponse des cellules à l'IL-6, une cytokine qui régule la prolifération des cellules PC3 androgéno-indépendantes via l'activation du facteur de transcription STAT3. 2) La seconde est formée du groupe actine et Cdc42, deux protéines normalement impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Nous les avons reliées à une réponse des cellules PC3 au stress et à leur survie.

Il semble que l'action ultime de ces deux groupes de complexes avec des cibles différentes dans les cellules du CaP se déroule au même site, dans le noyau. Par exemple, pour le premier groupe, l'action de Fer passerait de la membrane (gp130/Fer; gp130/Fer/STAT3) au cytoplasme (Fer et pY-STAT3) puis dans le noyau où, comme facteurs de transcription, les dimères de STAT3 activés se lient ultimement à l'ADN pour réguler des gènes activés par l'IL-6. Quant au deuxième groupe, nos résultats sur les complexes Fer/actine suggèrent qu'ils s'accumulent au

niveau nucléaire alors que le cytosquelette d'actine est normalement considéré comme étant une fonction cytoplasmique. Ces observations sur Fer avec ces deux groupes de partenaires dans les cellules cancéreuses prostatiques expliquent bien la présence de Fer dans ces deux compartiments cellulaires. Ils réconcilient les résultats des deux écoles de pensée et suggèrent que Fer exerce des fonctions à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules.



**Figure 22 : Modèle illustrant les différents partenaires de Fer identifiés dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines.**

Dans le manuscrit II, nous nous concentrons sur l'activation de Fer et son interaction avec STAT3, modulées par l'IL-6 dans les cellules PC3. Plusieurs études récentes sur l'IL-6 chez les patients (tissus prostatiques et taux sanguins) et les modèles prostatiques ont relié cette cytokine au développement et à la progression du CaP.

Dans la prostate normale, l'immunoréactivité de l'IL-6 est majoritairement confinée aux cellules basales alors qu'elle est très faible dans les cellules glandulaires (luminales) et absente dans le stroma (Hobisch *et al.*, 2000). La sécrétion d'IL-6 est cependant détectée dans le surnageant des fibroblastes prostatiques et des cellules du muscle lisse (Hobisch *et al.*, 2000). L'IL-6 est produite par plusieurs types de cellules épithéliales de la prostate, qu'elles soient normales ou dérivées de la prostate hyperplasique, de même que cancéreuses au site primaire (prostate) des tumeurs (Twillie *et al.*, 1995). De plus, l'IL-6 et son récepteur, l'IL-6R, ont été identifiés dans la prostate hyperplasique et cancéreuse (Siegsmund *et al.*, 1994). Les niveaux sériques d'IL-6 sont aussi très élevés chez les patients atteints de CaP avec métastases (Twillie *et al.*, 1995; Adler *et al.*, 1999). En outre, d'autres études illustrent que les taux élevés d'IL-6 sont associés aux cancers réfractaires aux hormones, comparativement aux témoins et aux patients ayant une hyperplasie bénigne et un cancer localisé (Drachenberg *et al.*, 1999). Ainsi, l'IL-6 pourrait être un marqueur d'un phénotype androgéno-indépendant. Fait intéressant, Fer est aussi plus exprimée dans le CaP (Allard *et al.*, 2000) et sa localisation nucléaire semble varier de pair avec le faible taux de différenciation des tumeurs (manuscrit II, et résultats non publiés du laboratoire).

La présence de l'IL-6 dans la lignée LNCaP demeure controversée. Selon certains, les cellules LNCaP produisent de l'IL-6 (Siegall *et al.*, 1990), tandis que pour d'autres, ce n'est pas le cas (Chung *et al.*, 1999). De plus, les résultats sont contradictoires quant à l'action de l'IL-6 sur la prolifération de ces cellules : ainsi, l'IL-6 se comporte soit comme un facteur d'inhibition paracrine dans les LNCaP (Degeorges *et al.*, 1996; Hobisch *et al.*, 1998; Levesque *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999). Certains chercheurs montrent pourtant qu'elle stimule leur croissance (Okamoto *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1998). La présence d'androgènes semble affecter l'action de l'IL-6, qui deviendrait alors un facteur de croissance

autocrinien pour les cellules LNCaP (Okamoto *et al.*, 1997). Enfin, l'IL-6 passerait d'un facteur paracrinien inhibiteur de la croissance des cellules androgéno-dépendantes à un facteur autocrine stimulateur de la croissance durant la progression du CaP dont le phénotype est réfractaire aux hormones (Chung *et al.*, 1999). À cet égard, les lignées androgéno-indépendantes, PC3 et DU145, produisent des niveaux d'IL-6 très élevés (Chung *et al.*, 1999). Aussi, il appert que l'IL-6 agit sur les cellules PC3 et DU145 comme un facteur de croissance paracrinien et autocrinien (Chung *et al.*, 1999).

Ces études sur l'IL-6 dans les lignées de cellules du CaP montrent donc un parallèle étroit avec la situation décrite dans les tumeurs de prostate humaine et suggèrent que l'IL-6 affecte la croissance et la fonction de la prostate à la fois de manière paracrine et autocrine.

En se basant sur ces données et les nôtres sur Fer, notamment dans les cellules PC3 qui miment le cancer de la prostate androgéno-indépendant, nous avons d'abord confirmé que l'IL-6 induit la prolifération des cellules PC3 (manuscrit II) et ensuite démontré qu'elle active la phosphorylation de Fer. Nous avons alors montré la contribution majeure de Fer dans cette voie de signalisation.

Le défrichage de la voie de l'IL-6 en relation avec Fer nous a permis d'observer dans un premier temps que Fer forme un complexe avec le récepteur gp130 dans une cinétique courte sous l'effet de l'IL-6. Cette cinétique correspond à la phosphorylation de gp130, une des sous-unités du récepteur de l'IL-6. Le même événement a été rapporté pour Fes, un autre membre de cette famille de TKs, dans les cellules hématopoïétiques (Matsuda *et al.*, 1995). En général, cette étape est suivie du recrutement et de l'activation des kinases Jaks et des facteurs de transcription STATs, puis de leur translocation dans le noyau (Schindler and Darnell 1995; Akira 1997). Dans les cellules PC3, ces événements impliquent Fer. La phosphorylation de Fer et la formation du complexe Fer/STAT3 induites par l'IL-6 suivent une cinétique bimodale et parallèle. Cette dernière correspond à l'activation de Fer et de STAT3 dans le cytoplasme après 10 min et de leur translocation dans le noyau jusqu'à la matrice nucléaire à 30 min. Nous avons montré que l'activation de STAT3 est presque entièrement reliée à l'activité de Fer. Ainsi, le dominant négatif de Fer inhibe la phosphorylation de STAT3. Comme il a été rapporté que ceci empêche la liaison de STAT3 à l'ADN dans les cellules Cos (Priel-Halachmi *et al.*,

2000), Fer semble donc être la tyrosine kinase prédominante pour l'activation de STAT3 dans les cellules PC3, même si les Jak kinases y seraient exprimées (Lou *et al.*, 2000).

Selon nos travaux, les cellules PC3 n'expriment pas Fes. Par ailleurs, nous avons observé que le dominant négatif de Fer n'a pas d'effet sur l'interaction de Fer/STAT3. Comme nos données avec le domaine SH2 de Fer ne montrent pas de complexes avec STAT3 (non publiés), ceci suggère que STAT3 ne s'associe pas avec Fer via son domaine SH2. D'autre part, les protéines Fer et STAT3 possèdent toutes les deux un domaine hélice boucle hélice, connu comme étant impliqué dans les interactions des protéines et favorisant leur oligomérisation. D'autres études seront requises pour déterminer les bases moléculaires de cette interaction.

Nos travaux ont permis de découvrir que l'IL-6 induit la translocation de Fer et de STAT3 du cytoplasme au noyau et jusqu'à la chromatine. Ces résultats suggèrent que les complexes Fer/STAT3 dans le noyau jouent probablement un rôle dans l'activation de la transcription des gènes qui dépendent de l'IL-6. Nous croyons que Fer est un partenaire essentiel à l'action de STAT3. En fait, STAT3 est aussi reconnu comme étant le produit d'un oncogène qui est impliqué dans la prolifération et la survie de différents autres types de cellules (Buettner *et al.*, 2002). En plus de Fer (manuscrit II) et des Jaks, STAT3 peut aussi être activé par différentes TKs à activité transformante comme v-Eyk, ETK/BMX, Lck, v-Fps (Bowman *et al.*, 2000). Dans le cas des cellules du CaP, la relation étroite entre l'expression de Fer, l'activation de STAT3, et la survie et prolifération/tumorogénicité des cellules PC3 (antisens de Fer) impliquent que Fer via les interactions avec ses partenaires et leur activation régulent des voies majeures de signalisation et que les facteurs de transcription dans le noyau sont au centre de son action dans la prolifération ou la survie des cellules.

Nos résultats supportent le concept que dans la prostate, l'expression de Fer et sa fonction dépendent du phénotype ou du statut hormonal, de sa distribution, et de ses partenaires. Nous avons démontré que gp130 et STAT3 sont associés de manière constitutive dans les cellules du CaP et que les niveaux de ces complexes sont modulés par l'IL-6 parallèlement avec l'activation de Fer. De plus, étant donné que Fer est essentielle à l'activation de STAT3, elle pourrait agir comme une tyrosine kinase majeure en amont de STAT3 dans les cellules PC3. En se basant

sur la localisation du complexe Fer/STAT3 au niveau de la chromatine de ces cellules et la présence de Fer et de STAT3 au niveau de l'ADN, nous avons réalisé des études d'immunohistochimie de Fer et de STAT3 sur coupes adjacentes des tissus prostatiques humains. Les deux protéines montrent souvent des patrons d'expression similaires et la même distribution. Les résultats que nous avons obtenus sur STAT3 concordent avec ceux rapportés sur les différentes molécules de signalisation de la voie de l'IL-6 (gp130, STAT3 et pY-STAT3) dans le CaP (Mori *et al.*, 1999; Lou *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). Tel que mentionné ci-haut, l'étude sur un plus large échantillonnage est en cours et tentera d'établir les niveaux d'expression de Fer en parallèle avec ceux de STAT3 pour vérifier si leur distribution (cytoplasmique vs nucléaire) corrélerent aussi avec la progression et le pronostic du CaP. Il faut rappeler que l'IL-6 semble être caractéristique du stade avancé du CaP androgéno-indépendant chez les patients (Simard and Gingras 2001; Smith *et al.*, 2001) et les cellules PC3 qui miment la situation du CaP réfractaire aux hormones (Chung *et al.*, 1999).

L'évolution naturelle du CaP indique généralement deux phases chez la plupart des patients. Au début, une majorité des cellules du CaP différenciées sont androgéno-dépendantes et à ce stade, l'implication du RA dans la réponse des cellules aux androgènes est bien documentée. Les thérapie hormonales (anti-androgènes) sont très efficaces et causent l'apoptose des cellules dépendantes des androgènes. Tel que mentionné précédemment, ceci laisse place à la sélection et à l'adaptation des cellules dont la survie ne dépend pas des androgènes, comprenant à la fois des cellules sensibles et des cellules réfractaires aux hormones (Bui et Reiter, 1999). On assiste par la suite au développement d'un CaP androgéno-indépendant.

Plusieurs évidences suggèrent que la voie de signalisation du RA peut demeurer fonctionnelle et que le RA est impliqué dans le CaP réfractaire aux hormones. Parmi les hypothèses élaborées, mentionnons des différences d'expression du RA, la modulation des co-activateurs ou co-répresseurs du RA, des mutations du RA, l'activation du RA par des ligands indépendants via une signalisation croisée avec d'autres voies de transduction (Bonaccorsi *et al.*, 2003). À cet égard, il a été démontré dans les cellules LNCaP que la forskoline active le RA via la voie de la protéine kinase A, de l'EGF et du KGF (Culig *et al.*, 1995). L'IGF-1 active aussi le RA via la voie des MAPK alors que l'IL-6 le fait par la voie de

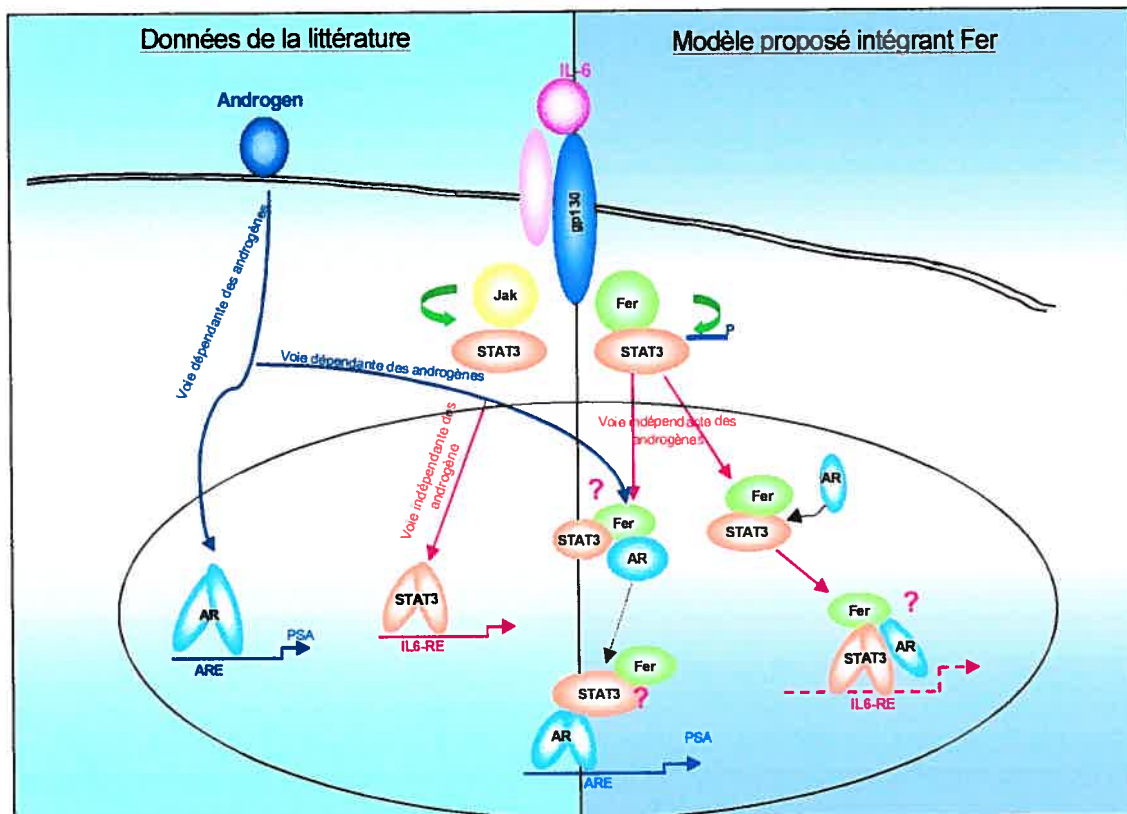
Jak/STAT3 et des MAPK (Ueda *et al.*, 2002a; Ueda *et al.*, 2002b). De même, la bombésine (un analogue du peptide de relâche de la gastrine produit par les cellules NE de la prostate, qui active Fak (Tremblay *et al.*, 1996; Lacoste *et al.*, 2003 soumis) active le RA via Fak et Src (Lee *et al.*, 2001).

Plus spécifiquement dans la voie de l'IL-6 étudiée dans les LNCaP, des études récentes montrent que STAT3 s'associe au RA. L'IL-6 induit l'activation du RA et ceci entraîne la trans-activation médiée par l'IL-6 des gènes normalement dépendants des androgènes (dont l'APS). Le dominant négatif de STAT3 inhibe l'activation du RA (Matsuda *et al.*, 2001). Étant donné les résultats que nous avons obtenus dans les cellules PC3 où Fer est essentielle à l'activation de STAT3, nous avons réalisé des travaux similaires dans les cellules PC3-RA et LNCaP qui ont permis de coupler Fer à l'activation du RA.

Nous avons obtenu des résultats extrêmement prometteurs en montrant que Fer forme à la fois des complexes avec STAT3 et le RA (Annexe I). Ainsi, nos travaux ont été réalisés dans les cellules PC3-RA, i.e. transfectées avec la forme sauvage du RA, qui présentent donc le même bagage génétique que les cellules PC3. Les complexes STAT3/RA se localisent dans le noyau, ce qui concorde avec les résultats rapportés dans les cellules LNCaP (Matsuda *et al.*, 2001) que nous avons aussi confirmés. D'autre part, Fer forme aussi des complexes avec le RA, la fois dans les cellules PC3-RA que LNCaP qui exprime un RA fonctionnel mais muté. Nos études d'immunofluorescence dans les cellules PC3-RA montrent que les deux protéines localisent au niveau de la membrane périmoléculaire et le noyau. De plus, le RA est phosphorylé sur tyrosine et cette phosphorylation est modulée par l'IL-6. Il est intéressant de noter que c'est la première fois que la phosphorylation sur tyrosine du RA humain est observée. Nous croyons que cette phosphorylation sur tyrosine du RA puisse être aussi importante pour l'activation du RA que leur phosphorylation sur sérine et thréonine. Il est à noter que cette étape est reconnue comme étant nécessaire pour l'action des récepteurs stéroïdiens comme facteurs de transcription, et en l'occurrence pour l'action des androgènes (Blok *et al.*, 1996).

Nos données suggèrent donc que Fer pourrait jouer un rôle d'activateur du RA et être requise pour la signalisation dépendante de l'IL-6. Tel que le montre le modèle que nous proposons (figure 23), Fer pourrait être primordiale pour l'activation des gènes androgéno-indépendants impliqués dans la progression.





**Figure 23 : Modèle proposé illustrant la signalisation de Fer, STAT3 et RA dans les cellules du CaP indépendantes des androgènes.**

Nous proposons aussi que Fer active d'autres facteurs de transcription dans le noyau pour activer des gènes régulés par d'autres modulateurs positifs de la prolifération des cellules du CaP, et non seulement par l'IL-6.

Par ailleurs, la voie de signalisation activée par l'IL-6 impliquant Fer pourrait nécessiter une autre TK. Il s'agit de Lyn (Hallek *et al.*, 1997). Le gène *lyn* est ubiquitaire. Il code pour deux protéines de 53 et 56 kDa qui sont des produits d'épissage alternatif (Yamanashi *et al.*, 1987). Les travaux de notre laboratoire ont démontré que l'expression de Lyn est constitutive dans les lignées de CaP dont les PC3 (Atfi *et al.*, 1995) alors que chez le chien, le patron d'expression de la p56 Lyn est semblable à celui de Fer; elle est uniquement détectée dans les cellules épithéliales prostatiques en division, *in vitro* et *in vivo* (Allard *et al.*, 1997; et Defoy, 2002).

Nous avons identifié Lyn comme étant un partenaire de Fer dans les cellules PC3 en se basant sur la structure de Fer de même que les données de la littérature sur les interactions protéiques modulées par les domaines SH2 et les résidus pY retrouvés dans des motifs spécifiques dans les protéines. Ainsi nos études de précipitation (pull down) révèlent que Fer interagit avec le domaine SH2 de Src mais pas ceux des protéines adaptatrices, Grb2 et Shc. Cependant, Fer et Src ne forment pas de complexe endogène dans les cellules PC3. En considérant l'identité des domaines SH2 de Src et de Lyn, l'expression de Lyn dans les cellules PC3, l'activation de Lyn dans la voie de l'IL-6 et son association avec gp130 dans les cellules hématopoïétiques (Hallek *et al.*, 1997), nous avons cherché à vérifier si Lyn s'associait avec Fer. Nos résultats montrent qu'effectivement, Fer et Lyn forment un complexe, possiblement médié directement via le domaine SH2 de Lyn et la tyrosine phosphorylée de Fer (voir figure 22). De plus, les niveaux de ces complexes sont modulés par l'IL-6 dans les cellules PC3. Comme certains membres de la famille Src interagissent avec les récepteurs des cytokines (Reddy *et al.*, 2000), nous croyons que Fer pourrait probablement se retrouver dans un complexe avec Lyn et gp130 et ainsi participer à la voie de signalisation de l'IL-6.

Tout comme Fer, Lyn est activée suite à la stimulation de FcεRI dans les cellules inflammatoires (Rabinowich *et al.*, 1996) où elle est localisée aussi bien dans le cytoplasme que le noyau. Elle pourrait être impliquée dans la régulation du

cycle cellulaire et la réparation de l'ADN par le biais de la phosphorylation du p34cdc2 (Uckum et al., 1996) comme dans le cas de Fer (Halachmy *et al.*, 1997). Il est donc clair que Fer et Lyn peuvent être impliquées dans la même voie de signalisation et jouer des rôles complémentaires.

L'ensemble de ces travaux sur ce premier groupe de partenaires de Fer dévoilent non seulement l'implication de cette tyrosine kinase de type non récepteur dans la voie de signalisation de l'IL-6 mais ils permettent aussi la découverte de nouvelles molécules dans des voies établies. Fer s'associe avec gp130, gp130 s'associe avec Lyn, Fer s'associe avec STAT3 et le RA. il est possible que ces protéines se trouvent dans les mêmes complexes. Fer peut jouer aussi bien un rôle de tyrosine kinase pour leur phosphorylation qu'en servant de protéine d'échaffaudage ("scaffold") facilitant leurs interactions.

La second groupe de partenaires de Fer que nous avons identifiés dans les cellules de CaP impliquent l'actine et cdc42. Rappelons brièvement, que Fer ne s'associe pas avec la  $\beta$ -caténine, p120 Cas et la cortactine dans les lignées de cellules prostatiques cancéreuses, des protéines connues comme étant impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et les jonctions et adhésions cellulaires. Par ailleurs, la surexpression d'un antisens de l'ADNc de *fer* dans les PC3 n'entraîne pas de perturbation notable des interactions et adhésions cellulaires alors que les changements de forme des clones sont à peine perceptibles. Ces résultats suggèrent que Fer n'est pas reliée au cytosquelette dans la prostate.

Paradoxalement, nous montrons dans le manuscrit III que Fer forme un complexe avec l'actine, la protéine majeure du cytosquelette. Plusieurs aspects de l'interaction Fer/actine représentent de nouvelles observations: 1) la phosphorylation sur tyrosine de l'actine dépend largement de l'activité de Fer, 2) le complexe Fer/actine est médié par le domaine SH2 de Fer, 3) Fer se lie préférentiellement avec la forme filamenteuse de l'actine (actine-F) plutôt que la forme globulaire (actine-G), 4) les complexes Fer/actine sont plutôt nucléaires, 5) en réponse au stress, plus de complexes se transloquent dans le noyau et en conséquence, l'activité de Fer diminue alors que la phosphorylation sur tyrosine de l'actine augmente.

Considérons ces observations afin de les mettre en perspective avec les données actuelles sur le rôle de l'actine nucléaire.

L'identification de l'actine comme un partenaire de Fer dans les cellules de CaP a été démontrée par des techniques simples d'immunoprécipitation en se basant sur la structure de Fer. Nous avons misé sur sa capacité à lier des protéines phosphorylées sur tyrosine. Jusqu'à récemment, la phosphorylation sur tyrosine de l'actine avait été uniquement observée chez les protozoaires, *Dictyostelium discoideum* (Schweiger *et al.*, 1992; Jungbluth *et al.*, 1994; Kishi *et al.*, 1998). Une étude vient de paraître sur la déphosphorylation de l'actine par la phosphotyrosine phosphatase SHP-1 dans les cellules hématopoïtiques DT40B (Baba *et al.*, 2003). Dans les deux cas, la kinase responsable de la phosphorylation de l'actine n'a pas été identifiée. Il est indiqué de mentionner que l'actine forme un complexe avec la TK c-abl (Van Etten *et al.*, 1994), mais la phosphorylation de l'actine dans ces complexes n'a pas été étudiée.

Nous montrons pour la première fois que la phosphorylation sur tyrosine de l'actine dépend largement de l'activité de Fer, à tout le moins dans les cellules du CaP. À cet égard, nous avons utilisé trois mutants de Fer. La phosphorylation de l'actine varie avec l'activité de Fer et la surexpression des formes inactives la diminue drastiquement. Ceci suggère que l'actine est un substrat de Fer. Fer est donc une protéine centrale pour la phosphorylation de l'actine dans le contexte physiologique des cellules du CaP.

Nous avons étudié la nature de l'interaction Fer et actine et avons démontré que Fer interagit avec l'actine via son domaine SH2. En se basant sur les données actuelles concernant les interactions protéine-protéine médiées par le domaine SH2/motif pY, une des conclusions qui s'imposent est que Fer et l'actine interagissent directement. Soulignons que le domaine SH2 de Fer régit son interaction avec la cortactine (Kim and Wong 1998). C'est aussi via un domaine SH2 que la tyrosine phosphatase SHP-1 interagit avec l'actine phosphorylée sur tyrosine dans les cellules DT40B (Baba *et al.*, 2003). Comme cette phosphatase (SHP-1) et c-abl sont toutes les deux associées à l'actine, il serait pertinent d'étudier leur implication possible sur sa phosphorylation dans le présent système.

Une autre observation importante concerne les niveaux des complexes Fer/actine. Nous avons montré que l'activité de Fer n'affecte pas les complexes Fer/actine alors que les niveaux de phosphorylation de l'actine sont drastiquement diminués. Trois conclusions en découlent: 1) l'actine phosphorylée présente dans les complexes représente une petite portion du pool d'actine de ces complexes; 2) bien que le rôle de la pY-actine demeure inconnu, Fer est la principale tyrosine kinase qui régule la pY-actine dans le contexte physiologique des cellules du CaP. Fer jouerait un rôle dans la dynamique de l'actine-F, puisqu'elle s'y lie spécifiquement et que cette forme est préférentiellement phosphorylée sur tyrosine. Tel que discuté ci-après, un tel rôle serait relié à l'actine nucléaire plutôt que cytoplasmique. 3) Fer interagit avec l'actine non phosphorylée via d'autres domaines. À cet égard, un domaine potentiel est son domaine hélice boucle hélice de Fer. En fait, l'actine forme un complexe avec la coronine, une autre protéine du cytosquelette (Spoerl *et al.*, 2002) et cette association est médiée par le domaine hélice boucle hélice de la coronine. À notre connaissance, la séquence de l'actine responsable de cette interaction n'a pas encore été identifiée. Les domaines hélice boucle hélice sont connus comme étant responsables de l'oligomérisation des protéines et de leurs interactions (Reynolds *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que les domaines hélice boucle hélice présents à la fois dans Fer et p120Cas sont responsables de leur hétéro-oligomérisation (Kim and Wong 1995). Une autre possibilité est la présence d'un domaine de liaison de l'actine-F dans la structure Fer. Un tel domaine n'a pas été identifié mais on peut dresser un parallèle ici entre les interactions décrites entre p53 et l'actine-F de même que c-abl/actine-F, toutes deux médiées via de tels domaines (Van Etten *et al.*, 1994; Okorokov *et al.*, 2002). Ceci va de pair avec la préférence de Fer que nous avons observée pour l'actine-F. Il est à noter qu'originellement, le gène *fer* a été cloné par son homologie avec *c-abl* (Hao *et al.*, 1989), supportant la possibilité que ces deux protéines puissent exercer des fonctions similaires ou complémentaires. Il serait donc intéressant de déterminer le motif qui est responsable de la liaison de l'actine non phosphorylée à Fer.

La distribution des complexes Fer/actine dans les cellules du CaP est particulièrement intéressante. En effet, le réseau d'actine filamenteuse se retrouve dans le cytoplasme alors que Fer est aussi bien observée dans le cytoplasme que le noyau. Par ailleurs, les complexes Fer/actine sont surtout nucléaires. Ces résultats

vont permettre peut-être de mieux saisir notre conclusion initiale stipulant que Fer n'est pas reliée au cytosquelette d'actine cytoplasmique des cellules du CaP.

Une brève revue des données de la littérature sur l'actine nucléaire et la réponse des cellules à divers stress s'impose afin de mieux saisir le sens de nos résultats. La présence de l'actine dans le noyau a été rapportée dans différents type de cellules, soient les fibroblastes et les cellules Hela (Lestourgeon *et al.*, 1975), les hépatocytes (Crowley et Brasch, 1987), les lymphocytes (Nakayasu and Ueda, 1986), et les oocytes (Funaki *et al.*, 1995),

Plusieurs fonctions lui ont été proposées. L'actine nucléaire peut être une composante de la matrice nucléaire (Nakayasu and Ueda, 1986; Valkov *et al.*, 1989) comme c'est le cas du cytosquelette dans le cytoplasme. Elle peut être impliquée dans la condensation de la chromatine (Lestourgeon *et al.*, 1975) et l'ancrage de l'ARN pré-messager à la matrice nucléaire (Pederson, 1998). Elle peut aussi jouer un rôle dans le positionnement des domaines de la chromatine et dans la transcription (Egly *et al.*, 1984; Schweiger *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1998). Ainsi, la microinjection d'un anti-actine dans le noyaux d'oocytes d'amphibiens inhibe la transcription (Sheer *et al.*; 1984). De plus, un facteur stimulateur de la transcription similaire à l'actine a été purifié à partir des cellules Hela (Egly *et al.* 1984).

La réponse des cellules au stress s'accompagne d'une relocalisation de l'actine dans le noyau, que ce soit suite à l'augmentation de la chaleur (Iida *et al.*, 1986), le DMSO (Osborn and Weber, 1980) et la cytochalasin D (Nguyen *et al.*, 1998). L'induction de la translocation nucléaire de l'actine par la chaleur est réversible, puisque le retour à la température de 37°C entraîne une relocalisation cytoplasmique de l'actine (Luchetti *et al.*, 2002).

Afin de relier ces travaux sur l'actine nucléaire aux nôtres, mentionnons tels que décrits au début de cette thèse (Introduction), que Fer peut aussi exercer quelques fonctions dans le noyau, que ce soit via sa liaison à la chromatine (Hao *et al.*, 1991), au niveau de la synthèse de l'ADN (phase G1-S du cycle cellulaire) (Bend-Dor *et al.*, 1999) et la liaison de divers facteurs de transcription (Priel-Halachmi *et al.*, 2000). Les résultats du manuscrit II montrent que Fer régule l'activation de STAT3 dans la voie de signalisation de l'IL-6. De plus, nous avons démontré que Fer se localise dans le cytoplasme et le noyau dans les cellules du CaP (manuscrit

l). Nous avons aussi démontré que Fer aussi bien que STAT3 et le complexe Fer/STAT3 se trouvent au niveau de la chromatine et de la matrice nucléaire (manuscrit II).

Qu'en est-il des complexes Fer/actine et pY-actine dans le noyau des cellules de mammifères? En fait, jusqu'à aujourd'hui, aucune étude a été publiée sur ce sujet. Il est donc clair que les complexes Fer/actine pourraient être impliqués dans l'un des processus communs listés ci-haut. Nous avons montré que suite au stress de cytochalasine D, l'actine se localise dans le noyau des cellules du CaP. Un phénomène semblable a été décrit dans les embryons de souris, où la cytochalasine D entraîne la formation d'un réseau nucléaire d'actine filamenteuse (Nguyen *et al.*, 1998). Or cet important réseau d'actine polymérisée nucléaire s'accompagne aussi d'une translocation accrue de Fer dans le noyau. Ces résultats inédits de la présence de Fer dans le noyau dans de telles conditions de stress, tel que le traitement à la cytochalasine D, trouvent peut-être leur sens si on considère les résultats rapportés chez *Dictyostelium discoideum*. Ainsi, il appert que la phosphorylation de l'actine sur tyrosine résulte de conditions de stress, telles la chaleur, le DMSO, les stress oxydatif et osmotique, et la privation des nutriments (Jungbluth *et al.*, 1994; Jungbluth *et al.*, 1995). Conséquemment, il nous apparaît évident que le seuil de pY-actine normalement régulé par Fer dans les cellules du CaP est relié à des mécanismes de survie. Cette hypothèse est appuyé par les données de la littérature chez les cellules pré-T normalement déficientes en Fer dont la survie en réponse aux radiations est associée à la surexpression de Fer (Halachmy *et al.*, 1997). Nos résultats sur Fer, avec sa fonction dans la survie et la prolifération dans les cellules androgéno-indépendantes de la prostate et le CaP, vont aussi de pair avec ces observations. tel que déjà mentionné, chez le chien, nous avons corrélé l'expression de Fer avec la présence des cellules basales qui survivent et prolifèrent sans androgènes aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (manuscrit I). Nos études de transfection stable avec un anti-sens de l'ADNc de *fer* n'ont pas permis de récupérer des clones viables qui n'expriment pas Fer. Les résultats récents du laboratoire démontrent que des oligonucléotides et petits ARN anti-sens causent aussi la mort des cellules du CaP. Conséquemment, toutes ces données supportent l'hypothèse d'un seuil critique de phosphorylation de l'actine sur tyrosine pour la survie des cellules et leur récupération dans des situations de stress aigu. Nos données démontrent que Fer contrôle le seuil de pY-actine dans les conditions

physiologiques. Cependant, ce mécanisme est contrebalancé et il appert que lorsque la fonction de Fer est abolie/perturbée, des mécanismes compensatoires impliquant d'autres kinases ou phosphatases, sont mis en branle pour contrôler les niveaux de pY-actine. Nous croyons que ces résultats excitants ouvriront la porte à d'autres travaux qui auront des répercussions dans d'autres systèmes ou cancers. Dans le cas du CaP, ils pourront permettre de développer des nouvelles stratégies d'interventions pour contrôler la composante androgéno-indépendante de cette maladie qui tue environ 4000 hommes annuellement au Canada

#### **IV CONCLUSION**

Les résultats présentés dans cette thèse, couplés à des études complémentaires récentes du laboratoire, montrent un rôle critique et central de Fer dans la survie et la croissance des cellules du CaP. En plus des résultats de signalisation, qui nous ont permis de dévoiler un mécanisme putatif permettant de mieux comprendre la progression du CaP, de l'androgéno-dépendance à l'androgéno-indépendance, nos données suggèrent fortement que Fer représente un marqueur du CaP et, potentiellement, une nouvelle cible thérapeutique.



## V PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de mes études de doctorat ont permis d'identifier plusieurs partenaires de Fer dans les cellules prostatiques cancéreuses et de proposer des mécanismes allant de pair avec des fonctions dans leur survie et prolifération. Cependant, la signification exacte de certaines de ces associations reste à être déterminée.

### RECEPTEUR DES ANDROGENES

Il serait intéressant de vérifier si Fer active le RA et agit comme un co-activateur au niveau de l'expression des gènes dans le cancer de la prostate. Ceci peut favoriser la liaison de complexes Fer/RA sur les éléments de réponse des androgènes (ARE) pour la transcription des gènes normalement dépendants des androgènes, comme l'APS, mais aussi des facteurs non androgéniques, tel l'IL-6. Puisque Fer a la capacité de lier le RA et d'autres facteurs de transcription, comme STAT3, ceci pourrait favoriser la liaison d'autres facteurs de transcription, eux-mêmes liés au RA, sur les éléments de réponse propres à des gènes régulant la croissance et indépendamment des androgènes. Par conséquent, et alors que le mécanisme impliquant Fer /STAT3 peut prendre place dans les cellules du CaP déjà androgéno-indépendantes et sélectionnés pendant la progression, ce second mécanisme pourrait expliquer comment les cellules sensibles aux androgènes qui survivent aux thérapies endocriniennes s'adaptent et contribuent à leur éventuelle croissance androgéno-indépendante.

Nous proposons:

#### **D'identifier le (les) domaine (s) régulant l'interaction Fer/RA**

Nous avons démontré à la figure 16 que le complexe Fer/RA est présent aussi bien dans les cellules PC3-RA que dans les cellules LNCaP. La nature de l'interaction Fer/RA sera déterminée en se basant sur la structure des deux molécules. S'il s'agit d'une interaction directe entre Fer et le RA, il est possible que celle-ci soit médiée par les résidus tyrosines phosphorylés du RA (à identifier) et le domaine SH2 de Fer.

### **De déterminer si le RA est un substrat de Fer**

Nos observations sur la phosphorylation du RA sur tyrosine vont dans le même sens que celles rapportées dans la prostate de rat et montrant la présence de protéines phosphorylées sur tyrosine dans les fractions nucléaires (Golsteyn *et al.*, 1989). Puisque la phosphorylation sur tyrosine du RA est modulée par l'IL-6, les niveaux de pY des RA pourraient être aussi importants que la phosphorylation sur sérine pour la liaison de ces récepteurs à leurs éléments de réponse à l'ADN. Comme les RA sont souvent altérés dans le cancer de la prostate avancé, il serait pertinent de tester comment Fer régule la phosphorylation sur tyrosine des RA et déterminer si le RA est un substrat de Fer.

### **De déterminer l'importance de l'activité Fer dans la liaison du RA à l'ADN**

Si le RA est un substrat de Fer, l'activité de Fer pourrait affecter la capacité du RA à se lier à l'ADN. Cette hypothèse est supportée par les résultats des études impliquant aussi STAT3, obtenus avec le dominant négatif de Fer et de STAT3, ainsi que le dominant négatif de Fer qui inhibe la phosphorylation de STAT3 (manuscrit II) et la liaison de STAT3 à l'ADN (Priel-Halachmi *et al.*, 2000), et le dominant négatif de STAT3 qui inhibe l'activation du RA (Matsuda *et al.*, 2001). Nos données et celles de la littérature suggèrent que le DN de Fer peut affecter l'activation du RA. Ces expériences permettraient de savoir si Fer est une tyrosine kinase centrale dans la phosphorylation du RA.

### **De déterminer si Fer agit comme un co-activateur du RA**

La transactivation des gènes dépendants des androgènes par le RA implique plusieurs co-activateurs (Gelman, 2002). Tel qu'indiqué dans le cas de l'IL-6 qui active le RA dans les cellules LNCaP, STAT3 fait partie de cette catégorie (Matsuda *et al.*, 2001). De plus, la phosphorylation sur tyrosine de STAT3 est essentielle pour que l'IL-6 module l'activation du RA dans ces cellules (Matsuda *et al.*, 2001). Puisque: 1) le dominant négatif de Fer inhibe la phosphorylation sur tyrosine de STAT3 dans les cellules PC3 (manuscrit II), 2) que ceci inhibe la liaison à l'ADN dans les cellules Cos (Priel-Halachmi *et al.*, 2000) et 3) que IL-6 module la phosphorylation sur tyrosine du RA dans les cellules PC3-RA (annexe), il serait intéressant de déterminer si Fer est un co-activateur du RA. Ces expériences pourraient nous renseigner sur le rôle direct ou non de Fer dans la transactivation des gènes dépendants des androgènes et/ou de l'IL-6.

## ACTINE

Nous avons démontré dans le manuscrit III que l'actine est phosphorylée sur tyrosine et forme un complexe avec Fer *in vivo* aussi bien dans les conditions physiologiques que dans les conditions de stress. Ces résultats suggèrent que la liaison de Fer et de l'actine est étroite et importante pour la cellule. D'autre part, il a été rapporté que Fer a la capacité de protéger les cellules Pré-T des radiations. De plus, l'actine se localise dans le noyau suite aux stress. Puisque, les complexes Fer/actine ainsi que la pY-actine se trouvent dans le noyau suite au stress (cytochalasin D), ceci pourrait protéger les cellules de la mort et favoriser un mécanisme de survie.

Nous proposons:

### **D'établir les conditions de stress qui régulent la pY-actine et les complexes Fer/actine**

Dans le manuscrit III, nous avons démontré que la pY-actine augmente, alors que Fer et l'actine se localisent davantage dans le noyau suite à un traitement à la cytochalasin D. Il serait intéressant de vérifier si la réponse de Fer et de la pY-actine est commune à plusieurs types de stress ou c'est uniquement un effet de la cytochalasin D. L'utilisation des radiations (comme agent stressant et thérapeutique) peut nous renseigner davantage sur la relation entre Fer, la pY-actine, et la survie ou la mort des cellules.

### **D'identifier la ou les tyrosines phosphorylées de l'actine dans les cellules du CaP**

L'actine contient 15 tyrosines qui peuvent être potentiellement phosphorylées. Il se peut que certaines tyrosines ne sont phosphorylées que suite à un stress. L'identification de ces tyrosines est un point important afin de comprendre les mécanismes qui mènent à la survie des cellules ou à leur réponse aux conditions indésirables.

- *Conditions physiologiques* : l'actine est phosphorylée sur tyrosine et cette phosphorylation est largement diminuée par le dominant négatif de Fer. Il serait intéressant d'identifier les tyrosines responsables de la phosphorylation de l'actine.

• *Conditions de stress* : Il a été rapporté que l'actine est phosphorylée sur la tyrosine en position 53 chez les amibes (*Dictyostelium discoideum*). Dans ces cellules, la pY-actine serait impliquée dans la survie cellulaire en réponse aux stress induits par la privation de nutriments et d'oxygène, et le choc thermique. Nos travaux montrent que le stress entraîne l'augmentation de la phosphorylation de l'actine. Il serait donc important de vérifier si la tyrosine en position 53 est responsable de la phosphorylation de l'actine dans les conditions de stress dans les cellules du CaP.

#### **D'identifier la kinase responsable de la phosphorylation de l'actine suite au stress**

La cytochalasin D entraîne l'augmentation de la phosphorylation de l'actine et la diminution de l'activité de Fer. Ces résultats suggèrent qu'il existe une autre kinase responsable de la phosphorylation de l'actine dans les conditions de stress. L'identification de cette tyrosine serait une étape importante pour comprendre la réponse des cellules au stress.

#### **D'identifier le ou les domaines autres que SH2 permettant l'interaction Fer et l'actine non phosphorylée**

Nos travaux indiquent que la surexpression du dominant négatif de Fer n'affecte pas le complexe Fer/actine mais entraîne une baisse drastique de la phosphorylation de l'actine sur tyrosine. Ces résultats suggèrent que Fer se lie à l'actine non phosphorylée *via* un autre domaine ou *via* d'autres protéines. Si Fer et l'actine forme toujours un complexe dans ces conditions, il est intéressant de vérifier si le domaine hélice-boucle-hélice favorise cette interaction ou encore, si Fer contient un domaine autre de liaison de l'actine. Ces expériences vont nous renseigner sur le domaine par lequel Fer s'associe avec l'actine non phosphorylée.

L'ensemble de ces travaux va nous permettre de comprendre plus clairement le rôle de Fer dans la survie des cellules du CaP et la progression de cette maladie du stade androgéno-dépendant au stade androgéno-indépendant.

## VI REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement Dr. Simone Chevalier de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Elle m'a proposé un sujet de thèse qui a allumé la flamme de la recherche en moi et qui m'a amenée jusqu'ici. Que ce soit par les conseils qu'elle m'a prodigués, par la confiance qu'elle m'a accordée, elle a pris une place prépondérante dans ma formation de jeune chercheur. Vous êtes une soeur, une mère, une amie, une confidente, je souhaite à tout étudiant un directeur de recherche comme vous.

Je tiens à souligner la précieuse aide fournie par les Dr Simone Chevalier, Dr Mohamed Ben Amer et Dr Mohammed Elmabrouk à la correction de ce travail.

Je remercie particulièrement mon meilleur ami, le Dr Mustapha Allam, pour son support moral et ses efforts déployés à la lecture et la correction de cette thèse.

Je remercie les membres du département d'urologie de l'université McGill et plus particulièrement le Dr Armen Aprikian.

Je remercie Fatima Zahra Zouanat pour son aide technique et son support moral. Je n'oublierais jamais nos fous rires et nos discussions chaudes.

Je tiens à remercier tous mes amis du Regroupement des Biologistes Marocains au Canada de m'avoir supportée dans des moments difficiles. Vous étiez là quand j'avais besoin de vous...

Un grand merci à mes parents de m'avoir donnée la chance de réaliser mon rêve et de m'épanouir à ma façon. Loubna, ma chère soeur et Mohamed, mon grand frère, merci à vous deux...

Un merci à mon petit frère Ali qui m'a accompagnée tout le long de la rédaction de cette thèse. Merci pour ton support, tes encouragements et tes histoires amusantes.

Enfin, je remercie le département de biochimie de l'Université de Montréal de m'avoir accordé la bourse d'exemption des frais de scolarité majorés pour étudiants étrangers et la faculté des études supérieures de m'avoir offert pendant trois années une bourse d'excellence.

## VI REFERENCES

- Adler, H. L., M. A. McCurdy, M. W. Kattan, T. L. Timme, P. T. Scardino and T. C. Thompson (1999). "Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma." J Urol **161**(1): 182-7.
- Akira, S. (1997). "IL-6-regulated transcription factors." Int J Biochem Cell Biol **29**(12): 1401-18.
- Allard, P., A. Affi, F Landry, A. Chapdelaine, S. Chevalier (1997). Estradiol activates p60src, p53/56lyn and renatured p50/55 protein tyrosine kinases in the dog prostate. Mol Cell Endocrinol. **126**(1):25-34.
- Allard, P., A. Zoubeydi, L. T. Nguyen, S. Tessier, S. Tanguay, M. Chevrette, A. Aprikian and S. Chevalier (2000). "Links between Fer tyrosine kinase expression levels and prostate cell proliferation." Mol Cell Endocrinol **159**(1-2): 63-77.
- Allen, P. G. and J. V. Shah (1999). "Brains and brawn: plectin as regulator and reinforcer of the cytoskeleton." Bioessays **21**(6): 451-4.
- Aprikian, A. G., C. Cordon-Cardo, W. R. Fair and V. E. Reuter (1993). "Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma." Cancer **71**(12): 3952-65.
- Arregui, C., P. Pathre, J. Lilien and J. Balsamo (2000). "The nonreceptor tyrosine kinase fer mediates cross-talk between N-cadherin and beta1-integrins." J Cell Biol **149**(6): 1263-74.
- Aspenstrom, P. (1997). "A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton." Curr Biol **7**(7): 479-87.

Atfi, A., K. Lepage, P. Allard, A. Chapdelaine and S. Chevalier (1995). "Activation of a serine/threonine kinase signaling pathway by transforming growth factor type beta." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12110-4.

Ayala, A. G., J. Y. Ro, R. Babaian, P. Troncoso and D. J. Grignon (1989). "The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma." Am J Surg Pathol **13**(1): 21-7.

Baba, T., N. Fusaki, N. Shinya, A. Iwamatsu and N. Hozumi (2003). "Actin tyrosine dephosphorylation by the Src homology 1-containing protein tyrosine phosphatase is essential for actin depolymerization after membrane IgM cross-linking." J Immunol **170**(7): 3762-8.

Battaglia, S., A. M. Casali and A. R. Botticelli (1994). "Age-related distribution of endocrine cells in the human prostate: a quantitative study." Virchows Arch **424**(2): 165-8.

Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M. M. Mareel and W. Birchmeier (1993). "Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene." J Cell Biol **120**(3): 757-66.

Ben-Dor, I., O. Bern, T. Tennenbaum and U. Nir (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 Differ **10**(2): 113-29.

Bern, O., B. Hazan and U. Nir (1997). "Growth-dependent subnuclear localization of a 66 kDa phosphoprotein in FER protein overexpressing cells." FEBS Lett **403**(1): 45-50.

Berry, S. J., D. S. Coffey, P. C. Walsh and L. L. Ewing (1984). "The development of human benign prostatic hyperplasia with age." J Urol **132**(3): 474-9.

Blanchard, J. M. (2003). "[Oncogenes and mitotic regulators: a change in perspective of our view of neoplastic processes]." Med Sci (Paris) **19(2)**: 187-99.

Blok, L. J., P. E. de Ruiter and A. O. Brinkmann (1996). "Androgen receptor phosphorylation." Endocr Res **22(3)**: 197-219.

Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411(6835)**: 355-65.

Bonaccorsi L, M Muratori, V Carloni, S Zecchi, L Formigli, G Forti, E Baldi (2003). Androgen receptor and prostate cancer invasion. Int J Androl **26(1)**:21-5.

Bonkhoff, H. (1996). "Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: a stem cell concept for the development of prostate cancer." Eur Urol **30(2)**: 201-5.

Bonkhoff, H. (1998). "Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status." Prostate Suppl **8**: 18-22.

Bonkhoff, H., U. Stein and K. Remberger (1993). "Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **423(4)**: 291-4.

Bonkhoff, H., N. Wemert, G. Dhom and K. Remberger (1991). "Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate." Prostate **19(2)**: 91-8.

Borgstrom, P., M. A. Bourdon, K. J. Hillan, P. Sriramarao and N. Ferrara (1998). "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo." Prostate **35(1)**: 1-10.



Bostwick, D. G. and J. W. Aquilina (1996). "Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and other prostatic lesions as risk factors and surrogate endpoints for cancer chemoprevention trials." J Cell Biochem Suppl **25**: 156-64.

Bostwick D.G, R.P Myers, J.E Oesterling (1994). "Staging of prostate cancer". Semin Surg Oncol.10(1):60-72.

Bostwick, D. G. and M. K. Brawer (1987). "Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer." Cancer **59**(4): 788-94.

Boudon, C., G. Rodier, E. Lechevallier, N. Mottet, B. Barenton and C. Sultan (1996). "Secretion of insulin-like growth factors and their binding proteins by human normal and hyperplastic prostatic cells in primary culture." J Clin Endocrinol Metab **81**(2): 612-7.

Boulton, T. G., N. Stahl and G. D. Yancopoulos (1994). "Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors." J Biol Chem **269**(15): 11648-55.

Bowen, C., M. Birrer and E. P. Gelmann (2002). "Retinoblastoma protein-mediated apoptosis after gamma-irradiation." J Biol Chem **277**(47): 44969-79.

Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson and R. Jove (2000). "STATs in oncogenesis." Oncogene **19**(21): 2474-88.

Brown, M. T. and J. A. Cooper (1996). "Regulation, substrates and functions of src." Biochim Biophys Acta **1287**(2-3): 121-49.

Buettner, R., L. B. Mora and R. Jove (2002). "Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention." Clin Cancer Res **8**(4): 945-54.

Bui, M. and R. E. Reiter (1998). "Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer." Cancer Metastasis Rev 17(4): 391-9.

Calautti, E., S. Cabodi, P. L. Stein, M. Hatzfeld, N. Kedersha and G. Paolo Dotto (1998). "Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion." J Cell Biol 141(6): 1449-65.

Campbell, C. L., D. M. Savarese, P. J. Quesenberry and T. M. Savarese (1999). "Expression of multiple angiogenic cytokines in cultured normal human prostate epithelial cells: predominance of vascular endothelial growth factor." Int J Cancer 80(6): 868-74.

Cantley L.C (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway. " Science 296(5573):1655-7.

Cappellen, D., C. De Oliveira, D. Ricol, S. de Medina, J. Bourdin, X. Sastre-Garau, D. Chopin, J. P. Thiery and F. Radvanyi (1999). "Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas." Nat Genet 23(1): 18-20.

Cetkovic, H., I. M. Muller, W. E. Muller and V. Gamulin (1998). "Characterization and phylogenetic analysis of a cDNA encoding the Fes/FER related, non-receptor protein-tyrosine kinase in the marine sponge sycon raphanus." Gene 216(1): 77-84.

Chan, J. M., M. J. Stampfer, E. Giovannucci, P. H. Gann, J. Ma, P. Wilkinson, C. H. Hennekens and M. Pollak (1998). "Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study." Science 279(5350): 563-6.

Chen, R. H., M. C. Chang, Y. H. Su, Y. T. Tsai and M. L. Kuo (1999). "Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways." J Biol Chem 274(33): 23013-9.

Chen, Y., E. S. Knudsen and J. Y. Wang (1996). "Cells arrested in G1 by the v-Abl tyrosine kinase do not express cyclin A despite the hyperphosphorylation of RB." J Biol Chem **271**(33): 19637-40.

Chevalier, S., G. Bleau, K. D. Roberts and A. Chapdelaine (1981). "Proliferation and differentiation of canine prostatic epithelial cells in culture." Mol Cell Endocrinol **24**(2): 195-208.

Chevalier S, G Bleau, K.D Roberts, A Chapdelaine (1984). Nonsteroidal serum factors involved in the regulation of the proliferation of canine prostatic epithelial cells in culture. Prostate **5**(5):503-12.

Chevalier, S., I. Defoy, J. Lacoste, L. Hamel, L. Guy, L. R. Begin and A. G. Aprikian (2002). "Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis." Mol Cell Endocrinol **189**(1-2): 169-79.

Cho, J. W., J. Chung, W. K. Baek, S. I. Suh, T. K. Kwon, J. W. Park and M. H. Suh (2003). "RB-resistant Abl kinase induces delayed cell cycle progression and increases susceptibility to apoptosis upon cellular stresses through interaction with p53." Int J Oncol **22**(6): 1193-9.

Chung, T. D., J. J. Yu, M. T. Spiotto, M. Bartkowski and J. W. Simons (1999). "Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer." Prostate **38**(3): 199-207.

Cohen, P., H. C. Graves, D. M. Peehl, M. Kamarei, L. C. Giudice and R. G. Rosenfeld (1992). "Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma." J Clin Endocrinol Metab **75**(4): 1046-53.

Cohen, P., D. M. Peehl, B. Baker, F. Liu, R. L. Hintz and R. G. Rosenfeld (1994). "Insulin-like growth factor axis abnormalities in prostatic stromal cells from patients with benign prostatic hyperplasia." J Clin Endocrinol Metab **79**(5): 1410-5.

Cohen, R. J., G. Gleason, L. F. Taylor, H. A. Grundle and J. H. Naude (1993). "The neuroendocrine cell population of the human prostate gland." J Urol **150**(2 Pt 1): 365-8.

Cohick, W. S. and D. R. Clemmons (1993). "The insulin-like growth factors." Annu Rev Physiol **55**: 131-53.

Collett, M. S. and R. L. Erikson (1978). "Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(4): 2021-4.

Connolly, J. M. and D. P. Rose (1989). "Secretion of epidermal growth factor and related polypeptides by the DU 145 human prostate cancer cell line." Prostate **15**(2): 177-86.

Connolly, J. M. and D. P. Rose (1990). "Production of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha by the androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cell line." Prostate **16**(3): 209-18.

Craft, N., Y. Shostak, M. Carey and C. L. Sawyers (1999). "A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase." Nat Med **5**(3): 280-5.

Craig, A. W., R. Zirngibl and P. Greer (1999). "Disruption of coiled-coil domains in Fer protein-tyrosine kinase abolishes trimerization but not kinase activation." J Biol Chem **274**(28): 19934-42.

Craig, A. W., R. Zirngibl, K. Williams, L. A. Cole and P. A. Greer (2001). "Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation." Mol Cell Biol **21**(2): 603-13.

Cronauer, M. V., A. Hittmair, I. E. Eder, A. Hobisch, Z. Culig, R. Ramoner, J. Zhang, G. Bartsch, A. Reissigl, C. Radmayr, M. Thurnher and H. Klocker (1997). "Basic fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate." Prostate **31**(4): 223-33.

Crowley, K. S. and K. Brasch (1987). "Does the interchromatin compartment contain actin?" Cell Biol Int Rep **11**(7): 537-46.

Culig, Z., G. Bartsch and A. Hobisch (2002). "Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth." Mol Cell Endocrinol **197**(1-2): 231-8.

Culig, Z., A. Hobisch, M. V. Cronauer, C. Radmayr, J. Trapman, A. Hittmair, G. Bartsch and H. Klocker (1994). "Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor." Cancer Res **54**(20): 5474-8.

Culig, Z., J. Hoffmann, M. Erdel, I. E. Eder, A. Hobisch, A. Hittmair, G. Bartsch, G. Utermann, M. R. Schneider, K. Parczyk and H. Klocker (1999). "Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system." Br J Cancer **81**(2): 242-51.

Czech, M. P. (1989). "Signal transmission by the insulin-like growth factors." Cell **59**(2): 235-8.

Daniel, J. M. and A. B. Reynolds (1997). "Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function." Bioessays **19**(10): 883-91.

De Marzo, A. M., W. G. Nelson, A. K. Meeker and D. S. Coffey (1998). "Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells." J Urol **160**(6 Pt 2): 2381-92.

Degeorges, A., R. Tatoud, F. Fauvel-Lafeve, M. P. Podgorniak, G. Millot, P. de Cremoux and F. Calvo (1996). "Stromal cells from human benign prostate hyperplasia produce a growth-inhibitory factor for LNCaP prostate cancer cells, identified as interleukin-6." Int J Cancer **68**(2): 207-14.

Defoy, I. (2002). Rôle des facteurs de croissance dans la régulation des fonctions des cellules épithéliales prostatiques. Thèse de doctorat, Département de médecine, Université de Montréal, Montréal.

di Sant'Agnese, P. A., K. L. de Mesy Jensen, C. J. Churukian and M. M. Agarwal (1985). "Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells. Distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains." Arch Pathol Lab Med **109**(7): 607-12.

Dikstein, R., D. Heffetz, Y. Ben-Neriah and Y. Shaul (1992). "c-abl has a sequence-specific enhancer binding activity." Cell **69**(5): 751-7.

Djakiew, D. (2000). "Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer." Prostate **42**(2): 150-60.

Dong, J. T., H. Suzuki, S. S. Pin, G. S. Bova, J. A. Schalken, W. B. Isaacs, J. C. Barrett and J. T. Isaacs (1996). "Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss." Cancer Res **56**(19): 4387-90.

Drachenberg, D. E., A. A. Elgamal, R. Rowbotham, M. Peterson and G. P. Murphy (1999). "Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer." Prostate **41**(2): 127-33.

Egly J.M, N.G Miyamoto, V P Moncollin, Chambon (1984). "Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? " EMBO J **3**(10):2363-71.

Ekman, P., Y. Pan, C. Li and J. Dich (1997). "Environmental and genetic factors: a possible link with prostate cancer." Br J Urol **79 Suppl 2**: 35-41.

Fero, M. L., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky and J. M. Roberts (1996). "A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice." Cell **85**(5): 733-44.

Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.

Ferrer, F. A., L. J. Miller, R. I. Andrawis, S. H. Kurtzman, P. C. Albertsen, V. P. Laudone and D. L. Kreutzer (1997). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells." J Urol **157**(6): 2329-33.

Fleshner, N. E. and L. H. Klotz (1998). "Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility." Cancer Metastasis Rev **17**(4): 325-30.

Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.

Fong, C. J., E. R. Sherwood, J. Mendelsohn, C. Lee and J. M. Kozlowski (1992). "Epidermal growth factor receptor monoclonal antibody inhibits constitutive receptor phosphorylation, reduces autonomous growth, and sensitizes androgen-independent prostatic carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha." Cancer Res **52**(21): 5887-92.

Foster, C. S. and Y. Ke (1997). "Stem cells in prostatic epithelia." Int J Exp Pathol **78**(5): 311-29.

Fourcin, M., S. Chevalier, C. Guillet, O. Robledo, J. Froger, A. Pouplard-Barthelaix and H. Gascan (1996). "gp130 transducing receptor cross-linking is sufficient to induce interleukin-6 type responses." J Biol Chem **271**(20): 11756-60.

Funaki, K., T. Katsumoto and A. Iino (1995). "Immunocytochemical localization of actin in the nucleolus of rat oocytes." Biol Cell **84**(3): 139-46.

Gao, M., L. Ossowski and A. C. Ferrari (1999). "Activation of Rb and decline in androgen receptor protein precede retinoic acid-induced apoptosis in androgen-

dependent LNCaP cells and their androgen-independent derivative." J Cell Physiol **179**(3): 336-46.

Gao B, X Shen, G Kunos, Q Meng, I.D Goldberg, E.M Rosen, S Fan (2001). Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. FEBS Lett. **488**(3):179-84.

Gao, X. and K. V. Honn (1995). "Recessive oncogenes: current status." Pathol Oncol Res **1**(1): 7-22.

Gingra D, Béliveau R. (1997). L'angiogénèse tumorale: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. Médecine/Sciences **13**: 1428-1435.

Giordano, V., G. De Falco, R. Chiari, I. Quinto, P. G. Pelicci, L. Bartholomew, P. Delmastro, M. Gadina and G. Scala (1997). "Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase." J Immunol **158**(9): 4097-103.

Gleave M, S.L Goldenberg, N Bruchovsky, P Rennie (1998). "Intermittent androgen suppression for prostate cancer: rationale and clinical experience." Prostate Cancer Prostatic Dis **1**(6):289-296.

Goldfarb, M. (1990). "The fibroblast growth factor family." Cell Growth Differ **1**(9): 439-45.

Gelmann E.P (2002). Molecular biology of the androgen receptor. J Clin Oncol **20**(13):3001-15.

Golsteyn E.J, J.S Graham, H.J Goren, Y.A Lefebvre (1989). Phosphorylation status of nuclear and cytosolic androgen receptors in the rat ventral prostate. Prostate **14**(2):91-101.

Greer, P. (2002). "Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(4): 278-89.



Guy, L., L. R. Begin, K. Al-Othman, S. Chevalier and A. G. Aprikian (1998). "Neuroendocrine cells of the verumontanum: a comparative immunohistochemical study." Br J Urol **82**(5): 738-43.

Haggman, M. J., J. A. Macoska, K. J. Wojno and J. E. Oesterling (1997). "The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues." J Urol **158**(1): 12-22.

Halachmy, S., O. Bern, L. Schreiber, M. Carmel, Y. Sharabi, J. Shoham and U. Nir (1997). "p94fer facilitates cellular recovery of gamma irradiated pre-T cells." Oncogene **14**(24): 2871-80.

Hallek, M., C. Neumann, M. Schaffer, S. Danhauser-Riedl, N. von Bubnoff, G. de Vos, B. J. Druker, K. Yasukawa, J. D. Griffin and B. Emmerich (1997). "Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines." Exp Hematol **25**(13): 1367-77.

Hankins, G. R., A. T. De Souza, R. C. Bentley, M. R. Patel, J. R. Marks, J. D. Iglehart and R. L. Jirtle (1996). "M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene." Oncogene **12**(9): 2003-9.

Hao, Q. L., D. K. Ferris, G. White, N. Heisterkamp and J. Groffen (1991). "Nuclear and cytoplasmic location of the FER tyrosine kinase." Mol Cell Biol **11**(2): 1180-3.

Hao, Q. L., N. Heisterkamp and J. Groffen (1989). "Isolation and sequence analysis of a novel human tyrosine kinase gene." Mol Cell Biol **9**(4): 1587-93.

Hattori, T. and H. Sugihara (1996). "The pathological sequence in the development of gastric cancer: I." Scand J Gastroenterol Suppl **214**: 34-5; discussion 40-3.

Heim, M. H. (1996). "The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus." Eur J Clin Invest **26**(1): 1-12.

Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen and F. Schaper (2003). "Principles of IL-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J Pt.

Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper and L. Graeve (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem J 334 ( Pt 2): 297-314.

Hellawell, G. O. and S. F. Brewster (2002). "Growth factors and their receptors in prostate cancer." BJU Int 89(3): 230-40.

Hibbs, M. L. and A. R. Dunn (1997). "Lyn, a src-like tyrosine kinase." Int J Biochem Cell Biol 29(3): 397-400.

Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." Cell 63(6): 1149-57.

Hirano, T., K. Nakajima and M. Hibi (1997). "Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system." Cytokine Growth Factor Rev 8(4): 241-52.

Hobisch, A., I. E. Eder, T. Putz, W. Horninger, G. Bartsch, H. Klocker and Z. Culig (1998). "Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor." Cancer Res 58(20): 4640-5.

Hobisch, A., H. Rogatsch, A. Hittmair, D. Fuchs, G. Bartsch, Jr., H. Klocker, G. Bartsch and Z. Culig (2000). "Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue." J Pathol 191(3): 239-44.

Hoffman, M. A., W. C. DeWolf and A. Morgentaler (2000). "Is low serum free testosterone a marker for high grade prostate cancer?" J Urol 163(3): 824-7.

Horoszewicz JS, S.S Leong, T.M Chu, Z.L Wajsman, M Friedman, L Papsidero, U Kim, L.S Chai, S Kakati, S.K Arya, A.A Sandberg (1980). "The LNCaP cell line-a new model for studies on human prostatic carcinoma. " Prog Clin Biol Res **37**:115-32

Horoszewicz J.S, S.S Leong, E Kawinski, J.P Karr, H Rosenthal, T.M Chu, E.A Mirand, G.P Murphy (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma. " Cancer Res. **43**(4):1809-18

Hu, W. L., Y. Q. Li, H. X. He, Q. R. Li, Y. Tian, R. Q. Lai and H. Mei (2000). "KAI1/CD82 gene expression in benign prostatic hyperplasia and late-stage prostate cancer in Chinese." Asian J Androl **2**(3): 221-4.

Huang, C., N. N. Tandon, N. J. Greco, Y. Ni, T. Wang and X. Zhan (1997). "Proteolysis of platelet cortactin by calpain." J Biol Chem **272**(31): 19248-52.

Hubbard, S. R., M. Mohammadi and J. Schlessinger (1998). "Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases." J Biol Chem **273**(20): 11987-90.

Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000). "Protein tyrosine kinase structure and function." Annu Rev Biochem **69**: 373-98.

Isaacs, J. T., P. I. Lundmo, R. Berges, P. Martikainen, N. Kyprianou and H. F. English (1992). "Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells." J Androl **13**(6): 457-64.

Ishihara, K. and T. Hirano (2002). "Molecular basis of the cell specificity of cytokine action." Biochim Biophys Acta **1592**(3): 281-96.

Ismail A H, M Pollak, H Behlouli, S Tanguay, L.R Begin, A.G Aprikian (2002). "Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 for prostate cancer detection in patients undergoing prostate biopsy. " J Urol. **168**(6):2426-30.

Iwamura, M., P. M. Sluss, J. B. Casamento and A. T. Cockett (1993). "Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines." Prostate **22**(3): 243-52.

Iwanishi, M., M. P. Czech and A. D. Cherniack (2000). "The protein-tyrosine kinase fer associates with signaling complexes containing insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **275**(50): 38995-9000.

Jackson, M. W., J. M. Bentel and W. D. Tilley (1997). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia." J Urol **157**(6): 2323-8.

Joensuu, T., R. Hamalainen, B. Yuan, C. Johnson, S. Tegelberg, P. Gasparini, L. Zelante, U. Pirvola, L. Pakarinen, A. E. Lehesjoki, A. de la Chapelle and E. M. Sankila (2001). "Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3." Am J Hum Genet **69**(4): 673-84.

Jungbluth, A., C. Eckerskorn, G. Gerisch, F. Lottspeich, S. Stocker and A. Schweiger (1995). "Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in Dictyostelium cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop." FEBS Lett **375**(1-2): 87-90.

Jungbluth, A., V. von Arnim, E. Biegelmann, B. Humbel, A. Schweiger and G. Gerisch (1994). "Strong increase in the tyrosine phosphorylation of actin upon inhibition of oxidative phosphorylation: correlation with reversible rearrangements in the actin skeleton of Dictyostelium cells." J Cell Sci **107** ( Pt 1): 117-25.

Jones, A., C. Fujiyama, K. Turner, S. Fuggle, D. Cranston, R. Bicknell and A. L. Harris (2000). "Elevated serum vascular endothelial growth factor in patients with hormone-escaped prostate cancer." BJU Int **85**(3): 276-80.

Kaighn M.E, K.S Narayan, Y Ohnuki, J.F Lechner, L.W Jones (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest Urol. **17**(1):16-23.

Kamoi, K. and R. J. Babaian (1999). "Advances in the application of prostate-specific antigen in the detection of early-stage prostate cancer." Semin Oncol **26**(2): 140-9.

Kapus, A., C. Di Ciano, J. Sun, X. Zhan, L. Kim, T. W. Wong and O. D. Rotstein (2000). "Cell volume-dependent phosphorylation of proteins of the cortical cytoskeleton and cell-cell contact sites. The role of Fyn and FER kinases." J Biol Chem **275**(41): 32289-98.

Kharbanda S, R Ren, P Pandey, T.D Shafman, S.M Feller, R.R Weichselbaum, D.W Kufe (1995). "Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents." Nature. **376**(6543):785-8.

Kishi, Y., C. Clements, D. C. Mahadeo, D. A. Cotter and M. Sameshima (1998). "High levels of actin tyrosine phosphorylation: correlation with the dormant state of Dictyostelium spores." J Cell Sci **111** ( Pt 19): 2923-32.

Kim, I. Y., H. J. Ahn, D. J. Zelner, J. W. Shaw, S. Lang, M. Kato, M. G. Oefelein, K. Miyazono, J. A. Nemeth, J. M. Kozlowski and C. Lee (1996). "Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues." Clin Cancer Res **2**(8): 1255-61.

Kim, L. and T. W. Wong (1995). "The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors." Mol Cell Biol **15**(8): 4553-61.

Kim, L. and T. W. Wong (1998). "Growth factor-dependent phosphorylation of the actin-binding protein cortactin is mediated by the cytoplasmic tyrosine kinase FER." J Biol Chem **273**(36): 23542-8.

Kipreos, E. T. and J. Y. Wang (1990). "Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity." Science **248**(4952): 217-20.

Kipreos, E. T. and J. Y. Wang (1992). "Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA." Science **256**(5055): 382-5.

Kwabi-Addo, B., D. Giri, K. Schmidt, K. Podsypanina, R. Parsons, N. Greenberg and M. Ittmann (2001). "Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11563-8.

Lange, P. H. and R. L. Vessella (1998). "Mechanisms, hypotheses and questions regarding prostate cancer micrometastases to bone." Cancer Metastasis Rev **17**(4): 331-6.

Lee L.F, J Guan, Y Qiu, H.J Kung (2001). "Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bmx, Src, and focal adhesion kinase." Mol Cell Biol **21**(24):8385-97

Lestourgeon, W. M., A. Forer, Y. Z. Yang, J. S. Bertram and H. P. Pusch (1975). "Contractile proteins. Major components of nuclear and chromosome non-histone proteins." Biochim Biophys Acta **379**(2): 529-52.

Leung, H. Y., C. Dickson, C. N. Robson and D. E. Neal (1996). "Over-expression of fibroblast growth factor-8 in human prostate cancer." Oncogene **12**(8): 1833-5.

Levesque, E., M. Beaulieu, C. Guillemette, D. W. Hum and A. Belanger (1998). "Effect of interleukins on UGT2B15 and UGT2B17 steroid uridine diphosphate-glucuronosyltransferase expression and activity in the LNCaP cell line." Endocrinology **139**(5): 2375-81.

Li, P., S. V. Nicosia and W. Bai (2001). "Antagonism between PTEN/MMAC1/TEP-1 and androgen receptor in growth and apoptosis of prostatic cancer cells." J Biol Chem **276**(23): 20444-50.

Lilien, J., C. Arregui, H. Li and J. Balsamo (1999). "The juxtamembrane domain of cadherin regulates integrin-mediated adhesion and neurite outgrowth." J Neurosci Res **58**(6): 727-34.

Liu, X. H., A. Kirschenbaum, M. Lu, S. Yao, A. Klausner, C. Preston, J. F. Holland and A. C. Levine (2002). "Prostaglandin E(2) stimulates prostatic intraepithelial neoplasia cell growth through activation of the interleukin-6/GP130/STAT-3 signaling pathway." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 249-55.

Lou, W., Z. Ni, K. Dyer, D. J. Tweardy and A. C. Gao (2000). "Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway." Prostate **42**(3): 239-42.

Lu, W., Y. Luo, M. Kan and W. L. McKeehan (1999). "Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate." J Biol Chem **274**(18): 12827-34.

Luchetti F, S Burattini, P Ferri, S Papa, E Falcieri (2002). "Actin involvement in apoptotic chromatin changes of hemopoietic cells undergoing hyperthermia." Apoptosis **7**(2):143-52.

Lunter, P. C. and G. Wiche (2002). "Direct binding of plectin to Fer kinase and negative regulation of its catalytic activity." Biochem Biophys Res Commun **296**(4): 904-10.

Lyne, J. C., M. F. Melhem, G. G. Finley, D. Wen, N. Liu, D. H. Deng and R. Salup (1997). "Tissue expression of neu differentiation factor/herregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro." Cancer J Sci Am **3**(1): 21-30.

Macaulay, V. M. (1992). "Insulin-like growth factors and cancer." Br J Cancer **65**(3): 311-20.

Maraj B.H, J.P Leek, I.M Carr, A.F Markham (2000). "Identification of a novel microsatellite marker tightly linked to the KAI-1 gene for predicting prostate cancer progression." Eur Urol. **37**(2):228-33.

Marengo, S. R., R. A. Sikes, P. Anezinis, S. M. Chang and L. W. Chung (1997). "Metastasis induced by overexpression of p185neu-T after orthotopic injection into a prostatic epithelial cell line (NbE)." Mol Carcinog **19**(3): 165-75.

Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and et al. (1995). "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." Science **268**(5215): 1336-8.

Martin G.S (2001). The hunting of the Src. Nat Rev Mol Cell Biol. **2**(6):467-75.

Matsubara, A., M. Kan, S. Feng and W. L. McKeehan (1998). "Inhibition of growth of malignant rat prostate tumor cells by restoration of fibroblast growth factor receptor 2." Cancer Res **58**(7): 1509-14.

Matsuda, M., B. J. Mayer, Y. Fukui and H. Hanafusa (1990). "Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins." Science **248**(4962): 1537-9.

Matsuda, T., T. Fukada, M. Takahashi-Tezuka, Y. Okuyama, Y. Fujitani, Y. Hanazono, H. Hirai and T. Hirano (1995). "Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association." J Biol Chem **270**(19): 11037-9.

Matsuda, T., A. Junicho, T. Yamamoto, H. Kishi, K. Korkmaz, F. Saatcioglu, H. Fuse and A. Muraguchi (2001). "Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells." Biochem Biophys Res Commun **283**(1): 179-87.

McCafferty, D. M., A. W. Craig, Y. A. Senis and P. A. Greer (2002). "Absence of Fer protein-tyrosine kinase exacerbates leukocyte recruitment in response to endotoxin." J Immunol **168**(10): 4930-5.



Melnyk, O., M. Zimmerman, K. J. Kim and M. Shuman (1999). "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model." J Urol **161**(3): 960-3.

Modregger, J., B. Ritter, B. Witter, M. Paulsson and M. Plomann (2000). "All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis." J Cell Sci **113 Pt 24**: 4511-21.

Moran, M. F., C. A. Koch, D. Anderson, C. Ellis, L. England, G. S. Martin and T. Pawson (1990). "Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8622-6.

Mori, S., K. Murakami-Mori and B. Bonavida (1998). "Dexamethasone enhances expression of membrane and soluble interleukin-6 receptors by prostate carcinoma cell lines." Anticancer Res **18**(6A): 4403-8.

Mori, S., K. Murakami-Mori and B. Bonavida (1999). "Oncostatin M (OM) promotes the growth of DU 145 human prostate cancer cells, but not PC-3 or LNCaP, through the signaling of the OM specific receptor." Anticancer Res **19**(2A): 1011-5.

Morris, C., N. Heisterkamp, Q. L. Hao, J. R. Testa and J. Groffen (1990). "The human tyrosine kinase gene (FER) maps to chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with a del(5q)." Cytogenet Cell Genet **53**(4): 196-200.

Myers, R. B., S. Srivastava, D. K. Oelschlager and W. E. Grizzle (1994). "Expression of p160erbB-3 and p185erbB-2 in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma." J Natl Cancer Inst **86**(15): 1140-5.

Nada, S., M. Okada, A. MacAuley, J. A. Cooper and H. Nakagawa (1991). "Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src." Nature **351**(6321): 69-72.

Nagle, R. B., J. D. Knox, C. Wolf, G. T. Bowden and A. E. Cress (1994). "Adhesion molecules, extracellular matrix, and proteases in prostate carcinoma." J Cell Biochem Suppl **19**: 232-7.

Nakayasu, H. and K. Ueda (1983). "Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes." Exp Cell Res **143**(1): 55-62.

Nazareth, L. V. and N. L. Weigel (1996). "Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway." J Biol Chem **271**(33): 19900-7.

Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." Faseb J **13**(1): 9-22.

Nguyen, E., D. Besombes and P. Debey (1998). "Immunofluorescent localization of actin in relation to transcription sites in mouse pronuclei." Mol Reprod Dev **50**(3): 263-72.

Ni Z, W Lou, E.S Leman, A.C Gao (2000). "Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells." Cancer Res. **60**(5):1225-8.

Noordzij, M. A., T. H. van der Kwast, G. J. van Steenbrugge, W. J. Hop and F. H. Schroder (1995). "The prognostic influence of neuroendocrine cells in prostate cancer: results of a long-term follow-up study with patients treated by radical prostatectomy." Int J Cancer **62**(3): 252-8.

Noordzij, M. A., G. J. van Steenbrugge, T. H. van der Kwast and F. H. Schroder (1995). "Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate." Urol Res **22**(6): 333-41.

Oesterling, J. E., P. E. Andrews, V. J. Suman, H. Zincke and R. P. Myers (1993). "Preoperative androgen deprivation therapy: artificial lowering of serum prostate specific antigen without downstaging the tumor." J Urol **149**(4): 779-82.

Oesterling J, Fuks Z, Lee CT, Scher HI. (1997). Cancers of the genitourinary system : Cancer of the prostate. In Da Vita's Cancer : Principal & Practice of Oncology 5th edition, Philadelphia : PA, Lippincott-Raven Publishers.

Okamoto, M., C. Lee and R. Oyasu (1997). "Autocrine effect of androgen on proliferation of an androgen responsive prostatic carcinoma cell line, LNCAP: role of interleukin-6." Endocrinology **138**(11): 5071-4.

Okamoto, M., C. Lee and R. Oyasu (1997). "Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro." Cancer Res **57**(1): 141-6.

Olivier, JF. (2003). Regulation of the Fer kinase in prostatic epithelial cells: dog model. Master thesis, Department of Surgery, McGill University, Montréal.

Orlovsky, K., I. Ben-Dor, S. Priel-Halachmi, H. Malovany and U. Nir (2000). "N-terminal sequences direct the autophosphorylation states of the FER tyrosine kinases in vivo." Biochemistry **39**(36): 11084-91.

Orlovsky, K., L. Theodor, H. Malovani, Y. Chowars and U. Nir (2002). "Gamma interferon down-regulates Fer and induces its association with inactive Stat3 in colon carcinoma cells." Oncogene **21**(32): 4997-5001.

Ornitz, D. M. (2001). "Regulation of chondrocyte growth and differentiation by fibroblast growth factor receptor 3." Novartis Found Symp **232**: 63-76; discussion 76-80, 272-82.

Okorokov A.L., C.P Rubbi, S Metcalfe, J Milner (2002). "The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. " Oncogene **21**(3):356-67.

Osborn, M. and K. Weber (1980). "Dimethylsulfoxide and the ionophore A23187 affect the arrangement of actin and induce nuclear actin paracrystals in PtK2 cells." Exp Cell Res **129**(1): 103-14.

Owens, D. W., G. W. McLean, A. W. Wyke, C. Paraskeva, E. K. Parkinson, M. C. Frame and V. G. Brunton (2000). "The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts." Mol Biol Cell **11**(1): 51-64.

Papsidero, L. D., M. C. Wang, L. A. Valenzuela, G. P. Murphy and T. M. Chu (1980). "A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients." Cancer Res **40**(7): 2428-32.

Paulson, R., J. Jackson, K. Immergluck and J. M. Bishop (1997). "The Dfer gene of *Drosophila melanogaster* encodes two membrane-associated proteins that can both transform vertebrate cells." Oncogene **14**(6): 641-52.

Pawson, T., K. Letwin, T. Lee, Q. L. Hao, N. Heisterkamp and J. Groffen (1989). "The FER gene is evolutionarily conserved and encodes a widely expressed member of the FPS/FES protein-tyrosine kinase family." Mol Cell Biol **9**(12): 5722-5.

Penhallow, R. C., K. Class, H. Sonoda, J. B. Bolen and R. B. Rowley (1995). "Temporal activation of nontransmembrane protein-tyrosine kinases following mast cell Fc epsilon RI engagement." J Biol Chem **270**(40): 23362-5.

Piedra, J., S. Miravet, J. Castano, H. G. Palmer, N. Heisterkamp, A. Garcia de Herreros and M. Dunach (2003). "p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction." Mol Cell Biol **23**(7): 2287-97.

Pienta, K. J., W. B. Isaacs, D. Vindivich and D. S. Coffey (1991). "The effects of basic fibroblast growth factor and suramin on cell motility and growth of rat prostate cancer cells." J Urol **145**(1): 199-202.

Pietrzkowski, Z., G. Mulholland, L. Gomella, B. A. Jameson, D. Wernicke and R. Baserga (1993). "Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor 1." Cancer Res **53**(5): 1102-6.

Priel-Halachmi, S., I. Ben-Dor, S. Shpungin, T. Tennenbaum, H. Molavani, M. Bachrach, S. Salzberg and U. Nir (2000). "FER kinase activation of Stat3 is determined by the N-terminal sequence." J Biol Chem **275**(37): 28902-10.

Qiu, Y., L. Ravi and H. J. Kung (1998). "Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells." Nature **393**(6680): 83-5.

Qualmann, B. and R. B. Kelly (2000). "Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization." J Cell Biol **148**(5): 1047-62.

Rabinowich H, M Manciulea, D Metes, A Sulica, R.B Herberman, S.J Corey, T.L Whiteside (1996). Physical and functional association of Fc mu receptor on human natural killer cells with the zeta- and Fc epsilon RI gamma-chains and with src family protein tyrosine kinases. J Immunol **157**(4):1485-91.

Rajah, R., A. Bhala, S. E. Nunn, D. M. Peehl and P. Cohen (1996). "7S nerve growth factor is an insulin-like growth factor-binding protein protease." Endocrinology **137**(7): 2676-82.

Rajan, R., R. Vanderslice, S. Kapur, J. Lynch, R. Thompson and D. Djakiew (1996). "Epidermal growth factor (EGF) promotes chemomigration of a human prostate tumor cell line, and EGF immunoreactive proteins are present at sites of metastasis in the stroma of lymph nodes and medullary bone." Prostate **28**(1): 1-9.

Reddy EP, A Korapati, P Chaturvedi, S Rane (2000). "IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled." Oncogene **19**(21):2532-47

Reynolds, A. B., L. Herbert, J. L. Cleveland, S. T. Berg and J. R. Gaut (1992). "p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo." Oncogene **7**(12): 2439-45.

Ropiquet, F., D. Giri, D. J. Lamb and M. Ittmann (1999). "FGF7 and FGF2 are increased in benign prostatic hyperplasia and are associated with increased proliferation." J Urol **162**(2): 595-9.

Rosato, R., J. M. Veltmaat, J. Groffen and N. Heisterkamp (1998). "Involvement of the tyrosine kinase fer in cell adhesion." Mol Cell Biol **18**(10): 5762-70.

Ross, J. S., F. Yang, B. V. Kallakury, C. E. Sheehan, R. A. Ambros and P. J. Muraca (1999). "HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary." Am J Clin Pathol **111**(3): 311-6.

Ross, R. K., L. Bernstein, R. A. Lobo, H. Shimizu, F. Z. Stanczyk, M. C. Pike and B. E. Henderson (1992). "5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males." Lancet **339**(8798): 887-9.

Ross, R. K., M. C. Pike, G. A. Coetzee, J. K. Reichardt, M. C. Yu, H. Feigelson, F. Z. Stanczyk, L. N. Kolonel and B. E. Henderson (1998). "Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility." Cancer Res **58**(20): 4497-504.

Roura, S., S. Miravet, J. Piedra, A. Garcia de Herreros and M. Dunach (1999). "Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **274**(51): 36734-40.

Saez, C., A. C. Gonzalez-Baena, M. A. Japon, J. Giraldez, D. I. Segura, J. M. Rodriguez-Vallejo, J. Gonzalez-Esteban, G. Miranda and F. Torrubia (1999). "Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors FGFR1 and FGFR2 in human benign prostatic hyperplasia treated with finasteride." Prostate **40**(2): 83-8.

Sagalowsky, A. I. (1998). "Further experience with split-cuff nipple ureteral reimplantation in urinary diversion." J Urol **159**(6): 1843-4.

Sagalowsky AI, Wilson JD. (1998) Hyperplasia and carcinoma of the prostate. In: Harrison's Principles of Internal Medicine, 14<sup>th</sup> edition, Fauci AS, Braunwald E,

Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin NB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DE. Eds. New York, NY: McGraw-Hill.

Sasor, A., M. Wagrowska-Danilewicz and M. Danilewicz (2000). "Ki-67 antigen and P53 protein expression in benign and malignant prostatic lesions. Immunohistochemical quantitative study." Pol J Pathol **51**(1): 31-6.

Schaper, F., C. Gendo, M. Eck, J. Schmitz, C. Grimm, D. Anhuf, I. M. Kerr and P. C. Heinrich (1998). "Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression." Biochem J **335** ( Pt 3): 557-65.

Scher, H. I., A. Sarkis, V. Reuter, D. Cohen, G. Netto, D. Petrylak, P. Lianes, Z. Fuks, J. Mendelsohn and C. Cordon-Cardo (1995). "Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms." Clin Cancer Res **1**(5): 545-50.

Schindler, C. and J. E. Darnell, Jr. (1995). "Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway." Annu Rev Biochem **64**: 621-51.

Schlessinger, J. (1994). "SH2/SH3 signaling proteins." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 25-30.

Schmitt, J. F., M. T. Hearn and G. P. Risbridger (1996). "Expression of fibroblast growth factor-8 in adult rat tissues and human prostate carcinoma cells." J Steroid Biochem Mol Biol **57**(3-4): 173-8.

Schwartz, Y., I. Ben-Dor, A. Navon, B. Motro and U. Nir (1998). "Tyrosine phosphorylation of the TATA element modulatory factor by the FER nuclear tyrosine kinases." FEBS Lett **434**(3): 339-45.

Schweiger, A., O. Mihalache, M. Ecke and G. Gerisch (1992). "Stage-specific tyrosine phosphorylation of actin in Dictyostelium discoideum cells." J Cell Sci **102** (Pt 3): 601-9.

Sherwood, E. R., G. Theyer, G. Steiner, L. A. Berg, J. M. Kozlowski and C. Lee (1991). "Differential expression of specific cytokeratin polypeptides in the basal and luminal epithelia of the human prostate." Prostate **18**(4): 303-14.

Shurbaji, M. S., J. H. Kalbfleisch and T. S. Thurmond (1995). "Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer." Hum Pathol **26**(1): 106-9.

Siegall, C. B., G. Schwab, R. P. Nordan, D. J. FitzGerald and I. Pastan (1990). "Expression of the interleukin 6 receptor and interleukin 6 in prostate carcinoma cells." Cancer Res **50**(24): 7786-8.

Siegsmond, M. J., H. Yamazaki and I. Pastan (1994). "Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia." J Urol **151**(5): 1396-9.

Simard, J. and S. Gingras (2001). "Crucial role of cytokines in sex steroid formation in normal and tumoral tissues." Mol Cell Endocrinol **171**(1-2): 25-40.

Singh, A., R. F. Jones, H. Friedman, S. Hathir, G. Soos, A. Zabo and G. P. Haas (1999). "Expression of p53 and pRb in bladder and prostate cancers of patients having both cancers." Anticancer Res **19**(6B): 5415-7.

Smith, P. C., A. Hobisch, D. L. Lin, Z. Culig and E. T. Keller (2001). "Interleukin-6 and prostate cancer progression." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 33-40.

Soker, S., S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." Cell **92**(6): 735-45.



Spoerl Z, M Stumpf, A.A Noegel, A Hasse (2002). "Oligomerization, F-actin interaction, and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus." J Biol Chem **13**;277(50):48858-67.

Stackhouse, G. B., I. A. Sesterhenn, J. J. Bauer, F. K. Mostofi, R. R. Connelly, S. K. Srivastava and J. W. Moul (1999). "p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy." J Urol **162**(6): 2040-5.

Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini and et al. (1994). "Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components." Science **263**(5143): 92-5.

Steinbock, F. A. and G. Wiche (1999). "Plectin: a cytolinker by design." Biol Chem **380**(2): 151-8.

Story, M. T., K. A. Hopp, M. Molter and D. A. Meier (1994). "Characteristics of FGF-receptors expressed by stromal and epithelial cells cultured from normal and hyperplastic prostates." Growth Factors **10**(4): 269-80.

Story, M. T., B. Livingston, L. Baeten, S. J. Swartz, S. C. Jacobs, F. P. Begun and R. K. Lawson (1989). "Cultured human prostate-derived fibroblasts produce a factor that stimulates their growth with properties indistinguishable from basic fibroblast growth factor." Prostate **15**(4): 355-65.

Suzuki H, N. Sato, Y. Watabe, M. Masai, S. Seino, J. Shimazaki (1993). "Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer." J Steroid Biochem Mol Biol. **46**(6):759-65

Taga, T. (1996). "Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines." J Neurochem **67**(1): 1-10.

Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." Cell **58**(3): 573-81.

Takahashi-Tezuka, M., M. Hibi, Y. Fujitani, T. Fukada, T. Yamaguchi and T. Hirano (1997). "Tec tyrosine kinase links the cytokine receptors to PI-3 kinase probably through JAK." Oncogene **14**(19): 2273-82.

Takayama, H., M. Shin, N. Nonomura, A. Okuyama and K. Aozasa (2000). "p53 mutations in prostatic intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis of laser capture microdissected specimens from non-transition and transition zones." Jpn J Cancer Res **91**(9): 941-7.

Taler, M., S. Shpungin, Y. Salem, H. Malovani, O. Pasder and U. Nir (2003). "Fer is a downstream effector of insulin and mediates the activation of signal transducer and activator of transcription 3 in myogenic cells." Mol Endocrinol **17**(8): 1580-92.

Tamboli, P., M. B. Amin, H. J. Xu and M. D. Linden (1998). "Immunohistochemical expression of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with prostatic adenocarcinoma and benign prostate." Mod Pathol **11**(3): 247-52.

Tanaka, A., K. Miyamoto, H. Matsuo, K. Matsumoto and H. Yoshida (1995). "Human androgen-induced growth factor in prostate and breast cancer cells: its molecular cloning and growth properties." FEBS Lett **363**(3): 226-30.

Tanagho EA and McAninch JA. (1992). Smith's General Urology, 13<sup>e</sup> édition, Appleton and LANGE, Connecticut, CA, USA.

Thiery, J. P. and D. Chopin (1999). "Epithelial cell plasticity in development and tumor progression." Cancer Metastasis Rev **18**(1): 31-42.

Thompson, I. M. (2002). "Prostate cancer: wait or treat? How to apply new findings to your individual situation." Health News **8**(11): 5.

Thompson I.M, P.J Goodman, C.M Tangen, M.S Lucia, G.J Miller, L.G Ford, M.M Lieber, R.D Cespedes, J.N Atkins, S.M Lippman, S.M Carlin, A Ryan, C.M Szczepanek, J.J Crowley, C.A Coltman Jr (2003). "The influence of finasteride on the development of prostate cancer." N Engl J Med **349**(3):215-24.

Tian, L., D. L. Nelson and D. M. Stewart (2000). "Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules." J Biol Chem **275**(11): 7854-61.

Tremblay, L., W. Hauck, A. G. Aprikian, L. R. Begin, A. Chapdelaine and S. Chevalier (1996). "Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma." Int J Cancer **68**(2): 164-71.

Tremblay, L., W. Hauck, L. T. Nguyen, P. Allard, F. Landry, A. Chapdelaine and S. Chevalier (1996). "Regulation and activation of focal adhesion kinase and paxillin during the adhesion, proliferation, and differentiation of prostatic epithelial cells in vitro and in vivo." Mol Endocrinol **10**(8): 1010-20.

Tribioli, C., S. Droetto, S. Bione, G. Cesareni, M. R. Torrisi, L. V. Lotti, L. Lanfrancone, D. Toniolo and P. Pelicci (1996). "An X chromosome-linked gene encoding a protein with characteristics of a rhoGAP predominantly expressed in hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 695-9.

Twillie, D. A., M. A. Eisenberger, M. A. Carducci, W. S. Hsieh, W. Y. Kim and J. W. Simons (1995). "Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity." Urology **45**(3): 542-9.

Uckun F.M, L Tuel-Ahlgren, K.G Waddick, X Jun, J Jin, D.E Myers, R.B Rowley, A.L Burkhardt, J.B Bolen (1996). Physical and functional interactions between Lyn and p34cdc2 kinases in irradiated human B-cell precursors. J Biol Chem **271**(11):6389-97.

- Ueda, T., N. Bruchovsky and M. D. Sadar (2002). "Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways." J Biol Chem **277**(9): 7076-85.
- Ueda, T., N. R. Mawji, N. Bruchovsky and M. D. Sadar (2002). "Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells." J Biol Chem **277**(41): 38087-94.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**(2): 203-12.
- Valkov, N. I., M. I. Ivanova, A. A. Uscheva and C. P. Krachmarov (1989). "Association of actin with DNA and nuclear matrix from Guerin ascites tumour cells." Mol Cell Biochem **87**(1): 47-56.
- Van der Geer, P., S. Wiley, V. K. Lai, J. P. Olivier, G. D. Gish, R. Stephens, D. Kaplan, S. Shoelson and T. Pawson (1995). "A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides." Curr Biol **5**(4): 404-12.
- Van Etten R.A, P.K Jackson, D Baltimore, M.C Sanders, P.T Matsudaira, P.A Janmey (1994). "The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity." J Cell Biol. **124**(3):325-40.
- Vermeulen, A., J. P. Deslypere and K. De Meirleir (1989). "A new look to the andropause: altered function of the gonadotrophs." J Steroid Biochem **32**(1B): 163-5.
- Walsh, K., R. A. Sherwood, T. K. Dew and D. Mulvin (1999). "Angiogenic peptides in prostatic disease." BJU Int **84**(9): 1081-3.
- Wang, J. Y. (2000). "Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase." Oncogene **19**(49): 5643-50.

Wang, J. Y., F. Ledley, S. Goff, R. Lee, Y. Groner and D. Baltimore (1984). "The mouse c-abl locus: molecular cloning and characterization." Cell **36**(2): 349-56.

Wang, Y. Z. and Y. C. Wong (1998). "Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer." Prostate **35**(3): 165-77.

Ware J.L (1993). "Growth factors and their receptors as determinants in the proliferation and metastasis of human prostate cancer." Cancer Metastasis Rev. **12**(3-4):287-301.

Weed, S. A. and J. T. Parsons (2001). "Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly." Oncogene **20**(44): 6418-34.

Wen, Z., Z. Zhong and J. E. Damell, Jr. (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-50.

Wemert, N., G. Seitz and T. Achtstatter (1987). "Immunohistochemical investigation of different cytokeratins and vimentin in the prostate from the fetal period up to adulthood and in prostate carcinoma." Pathol Res Pract **182**(5): 617-26.

Wolk, A., C. S. Mantzoros, S. O. Andersson, R. Bergstrom, L. B. Signorello, P. Laggiou, H. O. Adami and D. Trichopoulos (1998). "Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study." J Natl Cancer Inst **90**(12): 911-5.

Xue, Y., F. Smedts, A. Verhofstad, F. Debruyne, J. de la Rosette and J. Schalken (1998). "Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives." Prostate Suppl **8**: 62-73.

Yamanashi, Y., S. Fukushige, K. Semba, J. Sukegawa, N. Miyajima, K. Matsubara, T. Yamamoto and K. Toyoshima (1987). "The yes-related cellular gene lyn encodes a possible tyrosine kinase similar to p56lck." Mol Cell Biol **7**(1): 237-43.

Yan, G., Y. Fukabori, S. Nikolaropoulos, F. Wang and W. L. McKeehan (1992). "Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin." Mol Endocrinol **6**(12): 2123-8.

Yao, G. Y., M. D. Lai and P. H. Chen (1994). "[Immunohistochemical study of neuroendocrine cells and prostate-specific antigen in prostate carcinoma]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **74**(3): 161-2, 191-2.

You, X., H. M. Yu, L. Cohen-Gould, B. Cao, M. Symons, G. F. Vande Woude and B. S. Knudsen (2003). "Regulation of migration of primary prostate epithelial cells by secreted factors from prostate stromal cells." Exp Cell Res **288**(2): 246-56.

Zhang, P. L., S. Rosen, R. Veeramachaneni, J. Kao, W. C. DeWolf and G. Bubley (2002). "Association between prostate cancer and serum testosterone levels." Prostate **53**(3): 179-82.

Zhau, H. Y., J. Zhou, W. F. Symmans, B. Q. Chen, S. M. Chang, R. A. Sikes and L. W. Chung (1996). "Transfected neu oncogene induces human prostate cancer metastasis." Prostate **28**(2): 73-83.

Zirngibl, R., D. Schulze, S. E. Mirski, S. P. Cole and P. A. Greer (2001). "Subcellular localization analysis of the closely related Fps/Fes and Fer protein-tyrosine kinases suggests a distinct role for Fps/Fes in vesicular trafficking." Exp Cell Res **266**(1): 87-94.

Zirngibl, R. A., Y. Senis and P. A. Greer (2002). "Enhanced endotoxin sensitivity in fps/fes-null mice with minimal defects in hematopoietic homeostasis." Mol Cell Biol **22**(8): 2472-86.

Zolfaghari, A. and D. Djakiew (1996). "Inhibition of chemomigration of a human prostatic carcinoma cell (TSU-pr1) line by inhibition of epidermal growth factor receptor function." Prostate **28**(4): 232-8.