

Université de Montréal

**Rôle de l'endogline et de la protéine kinase c-tak1 dans le
cancer de la prostate**

par

Lucie Hamel

Département de médecine

Faculté de médecine

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

Décembre 2003

© Lucie Hamel, 2003



W

4

UEF

2004

v. 114

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.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle de l'endogline et de la protéine kinase c-tak1 dans le cancer de la prostate

présentée par:
Lucie Hamel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Richard Momparler, président-rapporteur

Dr Simone Chevalier, directrice de recherche

Dr Fred Saad, membre du jury

Dr Denis Cournoyer, examinateur externe

Dr Nicole Leclerc, représentante du doyen de la FES

Résumé

En dépit des progrès, le cancer de la prostate (CaP) demeure une préoccupation importante dans notre société puisqu'il affecte près de 1% des hommes au Canada. C'est aussi le cancer le plus prévalent chez l'homme et la troisième cause de décès dû au cancer. Les difficultés rencontrées dans le traitement de cette pathologie sont en grande partie attribuables à l'hétérogénéité de cellules tumorales, notamment liées à l'évolution continue et progressive de leurs propriétés. En effet, les cellules tumorales sont soumises à de nombreuses modifications concomitantes des voies de régulation paracrine et autocrine impliquant les stéroïdes sexuels et divers facteurs non stéroïdiens agissant sur des nombreuses molécules de signalisation, dont les niveaux d'expression et d'activation favorisent ultimement les phénotypes les plus agressifs. Pour mieux comprendre de telles voies de signalisation, nous avons démontré que l'endogline, un des récepteurs accessoires du TGF β , ne peut expliquer par son expression les différences d'effets d'inhibition du TGF β sur la prolifération de lignées de CaP issues de métastases humaines et reflétant divers stades de la pathologie. Dans l'optique de l'identification de nouveaux marqueurs et cibles thérapeutiques potentielles du CaP, nous avons ensuite caractérisé une sérine/thréonine kinase, c-tak1, appartenant à la famille Mark associée aux microtubules et dont un fragment a été obtenu par clonage dans les cellules prostatiques. Nous avons démontré son activation constitutive dans le CaP, tissus et lignées, en corrélation avec le phénotype tumoral. De plus chez le chien, nous avons montré son induction dans les cellules basales/souches prostatiques normales, seulement dans des conditions de croissance androgéno-indépendante. Ceci est médié par les œstrogènes après déplétion des

androgènes *in vivo* et sous l'effet de facteurs de croissance sériques non stéroïdiens stimulant leur prolifération *in vitro*. Ces données militent en faveur de l'implication de c-tak1 dans la division androgéno-indépendante de ces cellules et prônent le concept de sa contribution dans la progression du CaP.

En raison de l'appartenance de c-tak1 à la famille Mark, nous avons recherché ses partenaires de signalisation. Dans les cellules PC-3, c-tak1 ne forme pas de complexes spécifiques avec les protéines MAP4 et la tubuline mais elle s'associe à la phosphatase Cdc25C, déjà impliquée dans le cycle cellulaire et dont la phosphorylation par c-tak1 (cellules COS transfectées) est associée à l'inhibition de l'activité de Cdc25C. Les facteurs comme les neuropeptides et l'interleukine-6 connus pour leur action sur les cellules PC-3 ne modulent pas l'activité c-tak1 dans les conditions utilisées, alors que le TGF β augmente faiblement l'activité kinasique. Des drogues inhibitrices de la croissance cellulaire agissant sur les microtubules, tels que la vinblastine, la vincristine, le taxol, ainsi que la colchicine, ont ensuite été testées sur les cellules LNCaP et PC-3. Les deux types de cellules montrent des sensibilités différentes face à ces drogues et de la résistance à leurs effets inhibiteurs. Seul le taxol a modulé l'activité de c-tak1, augmentée de manière dose-dépendante et associée à une modification de la phosphorylation de Cdc25C. Ceci implique de la spécificité d'action et un lien avec la dynamique des microtubules. L'absence d'effet du taxol sur l'activation de c-tak1 dans les cellules primaires normales suggère un rôle différent de c-tak1 dans ces cellules et un effet du taxol sur c-tak1 relié au phénotype tumoral. L'ensemble de ces résultats fait de c-tak1 une cible potentielle du taxol. Ceci

ouvre une nouvelle fenêtre pour mieux comprendre son mécanisme d'action de même que le rôle de c-tak1 dans les cellules prostatiques, notamment dans le CaP.

Mots-clés: cancer de la prostate, stéroïdes sexuels, TGF β , drogues chimiothérapeutiques, endogline, kinases mark, c-tak1, microtubules, prolifération cellulaire, cycle cellulaire.

Abstract

Despite progress, prostate cancer (PCa) remains an important problem in our society since it affects nearly 1% of men in Canada. This disease is also the most prevalent cancer in man and the third cause of death by cancer. Difficulties encountered in the treatment of this pathology are mostly attributed to the heterogeneity of tumor cell populations, notably linked to their continuously and progressively evolving properties. Indeed, tumor cells are submitted to several concomitant modifications of paracrine and autocrine regulatory pathways involving sex hormones and diverse non steroidal factors acting on numerous signaling molecules, and whose altered expression and activation patterns ultimately favor most aggressive cell phenotypes. To get insights into such regulatory pathways, we have demonstrated that endoglin, one of the accessory receptor of TGF β , cannot by its expression explain differences in inhibitory effects of TGF β on the growth properties of human metastatic PCa cell lines reflecting different stages of the disease. In the context of the identification of novel markers and potential therapeutic targets of PCa, we have next characterized a serine/threonine kinase, c-tak1, belonging to the Mark family and associated to microtubules, for which part of the transcript was cloned in prostate cells. We have demonstrated a constitutive activation of c-tak1 in PCa, tissues and cell lines, in correlation with the tumor cell phenotype. Moreover using the dog model, we showed the induction of its activation in normal prostatic basal/stem cells, only in conditions of androgen-independent growth. This was mediated by estrogens after androgen depletion *in vivo* and under the effect of potent non steroidal serum growth factors stimulating cell

growth *in vitro*. These findings support the implication of c-tak1 in androgen-independent growth of prostatic cells and substantiate the concept of its contribution to PCa progression.

Based on the fact that c-tak1 is a Mark family member, we investigated on its signaling partners. In PC-3 cells, c-tak1 bind the phosphatase Cdc25C, already implicated in the cell cycle and whose phosphorylation by c-tak1 (transfected COS cells) is associated with the inhibition of Cdc25C activity but it did not form specific complexes with proteins, such as MAP4 and tubulin. Factors such as neuropeptides and interleukin-6, known as growth-promoters for PC-3 cells, did not modulate c-tak1 activity in the experimental conditions tested while TGF β slightly increased c-tak1 activity. Growth inhibitory drugs known to act on microtubules, such as vinblastine, vincristine, taxol, as well as the cell cycle inhibitor, colchicine, were next tested in LNCaP and PC-3 cells. The two cell types exhibited different sensitivities towards these drugs and significant resistance to their inhibitory effects. Only taxol modulated c-tak1 activity, which was increased in a dose-dependent manner and also associated with alterations in Cdc25C phosphorylation state. This implies some specificity of action and a link with microtubule dynamics. The lack of effect of taxol on c-tak1 activation in normal dog primary prostatic cells suggest a different role of c-tak1 in these cells and also that effects of taxol on c-tak1 is related to the cancer cell phenotype. Taken together and based on these findings, c-tak1 may become a promising target of taxol. This opens a new window of opportunity to better understand its mechanism of action as well as the role of c-tak1 in prostate cells and notably in PCa.

Keywords: prostate cancer, sex steroids, TGF β , chemiotherapeutic drugs, endoglin, mark kinases, c-tak1, microtubules, cell proliferation, cell cycle.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	vi
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures	xv
Liste des sigles et abréviations.....	xix
Liste d'abréviations des acides aminés	xxii
Remerciements.....	xxiv
Avant-propos.....	xxv
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. La prostate humaine.....	3
1.2. Le développement et l'évolution de la prostate avec l'âge	8
1.3. Pathologies de la prostate.....	9
1.3.1. <i>L'hyperplasie bénigne</i>	9
1.3.2. <i>Néoplasie prostatique intraépithéliale (PIN)</i>	11
1.3.3. <i>Le cancer de la prostate</i>	12
1.3.3.1. Diagnostic	12
1.3.4. <i>Thérapies du CaP</i>	14
1.3.4.1. Cancer localisé	14
1.3.4.1.1. Cancer avancé et thérapie hormonale adjuvante.....	15
1.3.4.1.2. Cancer avancé et chimiothérapie	17
1.3.4.1.3. Stratégies en développement.....	19
1.4. Hétérogénéité cellulaire de la prostate et implication dans le cancer	19
1.5. Les facteurs de risque de l'émergence et du développement du CaP	21
1.5.1. <i>Âge</i>	21
1.5.2. <i>Race</i>	23
1.5.3. <i>Causes génétiques</i>	23
1.5.3.1. Gènes associés au CaP	24
1.5.3.2. Anomalies somatiques	25
1.5.3.2.1. Oncogènes et gènes de suppression tumorale	25
1.5.4. <i>Environnement et diète</i>	27
1.5.5. <i>Hormones stéroïdiennes</i>	28
1.5.6. <i>Facteurs de croissance</i>	34
1.6. Le TGFβ.....	39
1.6.1. <i>Récepteurs du TGFβ</i>	42
1.6.1.1. Endogline	47

1.7. Fonctions cellulaires	51
1.7.1. <i>Cycle cellulaire</i>	53
1.7.2. <i>Mort cellulaire</i>	55
1.8. Protéines kinase et microtubules	61
1.8.1. <i>Cytosquelette</i>	62
1.8.1.1. Les microfilaments ou l'actine	63
1.8.1.2. Filaments intermédiaires	65
1.8.1.3. Microtubules.....	67
1.8.2. <i>Régulation des microtubules</i>	70
1.8.2.1. Protéines motrices.....	70
1.8.2.2. Protéines déstabilisatrices des microtubules	71
1.8.2.3. Protéines stabilisatrices du microtubule.....	71
1.8.2.4. Autres protéines de liaison de la tubuline	73
1.9. La famille Emk/Mark/Par1	74
1.9.1. <i>Par-1: polarité et division asymétrique des cellules</i>	76
1.9.2. <i>Les kinases Mark et leur activité sur les microtubules</i>	80
1.9.2.1. <i>C-tak1/Kp78/Mark3</i>	84
1.10. Hypothèses et Buts du travail	86
1.10.1 <i>Première partie: Endogline</i>	86
Volet 1: Endogline chez la souris	87
Volet 2: L'endogline dans les cellules prostatiques cancéreuses chez l'humain	87
1.10.2. <i>Deuxième partie: C-tak1</i>	88
Caractérisation de c-tak1 dans les cellules prostatiques.....	88
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	90
2.1. Tissus prostatiques humains	90
2.2. Tissus prostatiques de chien.....	90
2.3. Isolation et culture primaire des cellules prostatiques canines.....	91
2.4. Lignées humaines	93
2.5. Lignée de cellules cancéreuses de prostate canine	95
2.6. Extraction des protéines des tissus prostatiques	95
2.7. Extraction des protéines des cellules en culture	95
2.8. Extraction des protéines membranaires du placenta	96
2.9. Stimulation des cellules.....	97
2.9.1. <i>TGFβ, neuropeptides, et agents chimiothérapeutiques</i>	97
2.9.2. <i>Stéroïdes sexuels</i>	98

2.10.	Mesure des fonctions cellulaires	98
2.10.1.	<i>Prolifération cellulaire: effets du TGF-β1 et des drogues chimiothérapeutiques</i>	<i>98</i>
2.10.2.	<i>Visualisation de l'apoptose.....</i>	<i>100</i>
2.10.3.	<i>Synchronisation des cellules</i>	<i>101</i>
2.11.	Stratégies moléculaires.....	101
2.11.1.	<i>Extraction d'ARN, RT-PCR, et analyses par Northern blot</i>	<i>101</i>
2.11.2.	<i>Production de la protéine recombinante c-tak1/kp78/mark3 Myc-His.....</i>	<i>104</i>
2.11.2.1.	<i>Amplification de c-tak1/kp78/mark3</i>	<i>104</i>
2.11.2.2.	<i>Expression de la protéine dans les cellules de mammifères</i>	<i>105</i>
2.11.3.	<i>Clonage d'un fragment de c-tak1/Kp78/mark3 dans le vecteur de fusion génique</i>	<i>105</i>
2.11.3.1.	<i>Induction du vecteur PGEX-4T-3-c-tak1/Kp78/mark3.....</i>	<i>106</i>
2.11.4.	<i>Établissement de la lignée stable Tet-On.....</i>	<i>107</i>
2.11.4.1.	<i>Développement des lignées doubles stables Tet-On c-tak1/kp78/mark3</i>	<i>108</i>
2.12.	Production des anticorps avec des peptides de synthèse	109
2.12.1.	<i>ELISA</i>	<i>109</i>
2.12.2.	<i>Purification des anticorps.....</i>	<i>110</i>
2.12.3.	<i>Vérification de la spécificité des anticorps</i>	<i>111</i>
2.13.	Analyse de l'expression des protéines	111
2.13.1.	<i>Détection d'antigènes de surface: l'endogline.....</i>	<i>111</i>
2.13.2.	<i>Détection des protéines totales</i>	<i>111</i>
2.13.2.1.	<i>Immunoprécipitations</i>	<i>111</i>
2.13.2.2.	<i>Électrophorèse.....</i>	<i>112</i>
2.13.2.3.	<i>Transfert des protéines</i>	<i>113</i>
2.13.2.4.	<i>Immunobuvardage.....</i>	<i>113</i>
2.14.	Activité kinasique.....	114
2.15.	Analyse des acides aminés phosphorylés	115
2.16.	Analyse des interactions protéine-protéine.....	116
2.17.	Analyses statistiques.....	117
3.	RÉSULTATS.....	118
3. 1.	Expression de l'endogline.....	119
3.1.1.	<i>Volet I: Le rôle de l'endogline dans les cellules stromales de l'utérus de souris</i>	<i>119</i>
3.1.2.	<i>Volet II: L'endogline dans les cellules prostatiques humaines</i>	<i>134</i>

3.2.	Effet du TGFβ sur la prolifération des lignées prostatiques humaines.....	134
3.3.	Recherche de l'endogline.....	140
3.3.1.	<i>Recherche de l'endogline à la surface des cellules</i>	<i>140</i>
3.3.2.	<i>Recherche de l'endogline par l'expression de la protéine totale</i>	<i>144</i>
3.3.3.	<i>Analyse des transcrits de l'endogline</i>	<i>151</i>
3.4.	Caractérisation de c-tak1	153
3.4.1.	<i>Identification d'un membre de la famille des kinases Mark dans les cellules prostatiques.</i>	<i>153</i>
3.4.2.	<i>Analyse des transcrits des kinases Mark dans les cellules prostatiques....</i>	<i>154</i>
3.5.	Production d'anticorps	160
3.5.1.	<i>Obtention des anticorps</i>	<i>160</i>
3.5.1.1.	<i>Protéine de fusion GST/c-tak1</i>	<i>160</i>
3.5.1.2.	<i>Peptides de synthèse.....</i>	<i>164</i>
3.5.2.	<i>Expression de la protéine c-tak1</i>	<i>166</i>
3.5.2.1.	<i>Détection de la protéine</i>	<i>166</i>
3.5.2.2.	<i>Activation de c-tak1</i>	<i>171</i>
3.5.3.	<i>Spécificité de l'anticorps mark</i>	<i>174</i>
3.6.	Activité de c-tak1 dans les cellules prostatiques	176
3.6.1.	<i>Activation de c-tak1 dans les cellules prostatiques normales et cancéreuses</i>	<i>176</i>
3.6.2.	<i>Confirmation du type de kinase.....</i>	<i>178</i>
3.7.	Régulation de c-tak1.....	179
3.7.1	<i>Association de l'activité de c-tak1 avec la prolifération des cellules prostatiques normales canines et le CaP chez le chien.....</i>	<i>180</i>
3.7.1.1.	<i>Modulation de l'activité c-tak1 in vivo</i>	<i>180</i>
3.7.1.2.	<i>Modulation de l'activité c-tak1 in vitro</i>	<i>183</i>
3.7.2.	<i>Association de la kinase c-tak1 et les pathologies prolifératives de la prostate humaine</i>	<i>186</i>
3.8.	Surexpression de c-tak1	191
3.8.1.	<i>Contrôle de la capacité d'induction des lignées stables Tet-On.....</i>	<i>191</i>
3.8.2.	<i>Expression de c-tak1 sous le contrôle de la doxycycline</i>	<i>193</i>
3.9.	Études de l'activation directe de c-tak1 in vitro	193
3.9.1.	<i>Effets des neuropeptides.....</i>	<i>193</i>
3.9.2.	<i>Modulation par l'interleukine 6.....</i>	<i>196</i>
3.9.3.	<i>Modulation par le TGFβ.....</i>	<i>198</i>
3.10.	Interactions de c-tak1 avec des molécules de signalisation.....	201
3.10.1.	<i>Association c-tak1-MAP4.....</i>	<i>201</i>

3.10.2.	<i>Association c-tak1-tubuline</i>	204
3.10.3.	<i>Association c-tak1-Cdc25C</i>	206
3.11.	Activité de c-tak1 et le cycle cellulaire	208
3.12.	Modulation par les drogues chimiothérapeutiques	209
3.12.1.	<i>Effet inhibiteur des drogues sur la prolifération cellulaire</i>	211
3.12.2.	<i>Effet sur le phénotype et l'induction de la mort cellulaire</i>	215
3.12.2.1.	Induction de la mort cellulaire	217
3.12.3.	<i>Effets des drogues sur l'activité de c-tak1</i>	221
3.12.4.	<i>Effets des drogues sur les cellules normales prostatiques de chien</i>	224
3.12.5.	<i>Effet dose-réponse du taxol</i>	227
3.12.5.1.	Effet de la cycloheximide sur l'activation de c-tak1	229
3.12.5.2.	Modification de la phosphorylation de Cdc25C	229
4.	DISCUSSION	233
4.1.	Endogline	235
4.2.	Caractérisation de c-tak1	239
4.2.1.	<i>La protéine de c-tak1</i>	241
4.2.2.	<i>Recherche de facteurs de modulation de c-tak1</i>	245
4.2.3.	<i>Interaction de c-tak1 avec des partenaires de signalisation</i>	251
4.2.4.	<i>Interactions de c-tak1 avec les drogues chimiothérapeutiques associées aux microtubules</i>	254
4.3.	Potentiel thérapeutique	267
5.	CONCLUSION	268
6.	BIBLIOGRAPHIE	274
ANNEXE 1	312

Liste des tableaux

Tableau 1.	Sommaire des locus associés au CaP.....	24
Tableau 2.	Exemples de protéines et de gènes impliqués dans le CaP.....	27
Tableau 3.	Principaux facteurs de croissance impliqués dans la prostate.....	37
Tableau 4.	Exemples de récepteurs des facteurs de croissance impliqués dans le CaP....	38
Tableau 5.	Liste des tyrosines kinases de type non récepteur impliquées dans le cancer de la prostate.....	38
Tableau 6.	Différents membres de la famille des filaments intermédiaires.....	67
Tableau 7.	Principales caractéristiques des lignées des cellules cancéreuses prostatiques humaines.....	94
Tableau 8.	Immunobuvardages: types et concentrations d'anticorps.....	114
Tableau 9.	Combinaison des anticorps pour l'analyse des interactions protéine-protéine.....	116
Tableau 10.	Temps de doublement (heures) des cellules prostatiques cancéreuses humaines.....	138
Tableau 11.	Titre des antisérums en réponse aux peptides P1805 et P1806.....	166
Tableau 12.	Liste partielle des analyses de l'induction des clones par l'essai de la β -galactosidase.....	192
Tableau 13.	Comparaison des IC_{50} des différentes drogues.....	213

Liste des figures

Figure 1. Système uro-génital mâle et localisation de la prostate humaine	4
Figure 2. Définitions anatomiques des zones de la prostate	5
Figure 3. Morphologie de la prostate humaine normale	6
Figure 4. Système de gradation de Gleason	13
Figure 5. Différents modèles de différenciation des cellules épithéliales de la prostate....	22
Figure 6. Biosynthèse des stéroïdes sexuels	30
Figure 7. Structure du récepteur des androgènes et modèle d'activation transcriptionnelle	31
Figure 8. Mécanisme de régulation de l'activité biologique du TGF- β	40
Figure 9. Modèle d'activation du récepteur I du TGF β	44
Figure 10. Schéma simplifié de la voie de signalisation du TGF β	45
Figure 11. Modèle d'interaction de l'endogline	52
Figure 12. Schéma simplifié du cycle cellulaire	54
Figure 13. Représentation simplifiée des voies de l'apoptose	56
Figure 14. Voie de signalisation de la protéine kinase Akt	60
Figure 15. Organisation du cytosquelette	64
Figure 16. Structure des microfilaments d'actine.....	66
Figure 17. Dynamique des microtubules.....	69
Figure 18. Structure des kinases Emk/Mark/Par1	75
Figure 19. Dentogramme de la famille des kinases mark.....	77
Figure 20. Établissement de la polarité chez <i>C.elegans</i> et <i>D.melanogaster</i>	78

Figure 21. Polarisation de la cellule épithéliale.....	81
Figure 22. Cinétique d'inhibition de la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses humaines par le TGF β	136
Figure 23. Effet maximal du TGF- β 1 sur la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses humaines	137
Figure 24. Effet du TGF- β 1 sur la prolifération des cellules prostatiques normales de chien.....	139
Figure 25. Contrôle de l'analyse de l'expression de l'endogline par cytométrie en flux...	141
Figure 26. Analyse représentative de la recherche d'endogline à la surface des cellules cancéreuses prostatiques humaines.....	143
Figure 27. Détection de l'endogline par l'anticorps 44G4.....	145
Figure 28. Immunoréactivité de l'anticorps 44G4 purifié.....	146
Figure 29. Immunoprécipitation de l'endogline des cellules HOON et réactivité de l'anticorps 44G4 sur des immunoprécipités.....	147
Figure 30. Recherche de l'endogline avec l'anticorps SN6h dans les lignées prostatiques cancéreuses humaines	149
Figure 31. Analyse des transcrits de l'endogline.....	152
Figure 32. Comparaison de la séquence en acides aminés du transcrit obtenu à partir des cellules canines avec les kinases mark humaines.....	155
Figure 33. Représentation schématique des principaux membres homologues de la famille des kinases Mark	156
Figure 34. Analyse par RT-PCR des transcrits des kinases mark	158
Figure.35. Analyse Northern des transcrits des kinases mark c-tak1, p78 et c-tak75a	159
Figure 36. Clonage de c-tak1	162
Figure 37. Gel représentatif des essais d'induction de la protéine fusion GST/c-tak1 ...	163

Figure 38. Réactivité des antisérums aux peptides P1805 et P1806.....	165
Figure 39. Réactivité des IgG purifiées envers le peptide P1806	167
Figure 40. Recherche de la protéine c-tak1 avec les anticorps purifiés du lapin P1805.....	168
Figure 41. Recherche de la protéine c-tak1 par immunobuvardage après immunoprécipitation avec les anticorps P1805.....	170
Figure 42. Recherche de la protéine c-tak1 native.....	172
Figure 43. Activité kinasique en gel.....	173
Figure 44. Spécificité de l'anticorps anti-mark.....	175
Figure 45. Activité kinasique mark dans les cellules épithéliales prostatiques.....	177
Figure 46. Immunohistochimie des prostates de chien.....	181
Figure 47. Modulation de l'activation de c-tak1 <i>in vivo</i>	182
Figure 48. Modulation de c-tak1 dans les cellules de chien <i>in vitro</i> et ajout de stéroïdes sexuels.....	184
Figure 49. Stimulation de la prolifération des cellules avec le sérum de chien et activation de c-tak1.....	185
Figure 50. Activité de c-tak1 dans la lignée cancéreuse de prostate canine DPC1.....	187
Figure 51. Activité de c-tak1 dans le CaP chez l'humain.....	188
Figure 52. Activité c-tak1 dans les différentes sous-lignées de CaP humain.....	190
Figure 53. Clonage de c-tak1 dans le vecteur de réponse pTRE.....	194
Figure 54. Contrôle de l'induction de l'activité c-tak1 par la doxycycline.....	195
Figure 55. Modulation de l'activité de c-tak1 par les neuropeptides.....	197
Figure 56. Modulation de l'activité de c-tak1 par l'IL-6.....	199
Figure 57. Effet du TGF- β 1 sur l'activité kinase des cellules PC-3.....	200

Figure 58. Recherche de complexes c-tak1-MAP4.....	203
Figure 59. Recherche de complexes c-tak1-tubuline.....	205
Figure 60. Association de c-tak1 avec Cdc25C.....	207
Figure 61. Activité de c-tak1 au cours du cycle cellulaire.....	210
Figure 62. Effet inhibiteur des drogues chimiothérapeutiques sur la croissance des cellules PC-3.....	212
Figure 63. Effet inhibiteur des drogues chimiothérapeutiques sur la croissance des cellules LNCaP.....	214
Figure 64. Effet du taxol sur la morphologie des cellules PC-3.....	216
Figure 65. Effet du taxol sur la morphologie des noyaux.....	218
Figure 66. Induction de l'apoptose par le taxol.....	220
Figure 67. Effet représentatif de la vincristine et du taxol sur l'activation de c-tak1.....	222
Figure 68. Effet représentatif de la colchicine et de la vinblastine sur l'activation de c-tak1.....	223
Figure 69. Effet représentatif des drogues associées aux microtubules sur l'activation de c-tak1 dans les cellules de chien.....	225
Figure 70. Effet du taxol sur l'activation de c-tak1 dans les cellules de chien.....	226
Figure 71. Activation de c-tak1 selon la dose de taxol.....	228
Figure 72. Effet de la cycloheximide sur l'activation de c-tak1 par le taxol.....	230
Figure 73. Phosphorylation de Cdc25C par le taxol.....	232
Figure 74. Activation des voies biochimiques reliées au dommage induit à la cellule.....	258
Figure 75. Schématisation des sites de liaison de différentes drogues chimiothérapeutiques associées aux microtubules.....	261

Liste des sigles et abréviations

ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AIF:	facteur d'induction de l'apoptose
APC:	adenomatous polyposis coli
APS:	antigène prostatique spécifique
ARN:	acide ribonucléique
ATP:	adénosine triphosphate
bFGF:	FGF basique
BMP:	protéine morphogénique de l'os
CAB:	thérapie de blocage combinée des androgènes
CAK:	protéine kinase qui active les Cdk
CaP:	cancer de la prostate
Cdk:	protéine kinase dépendante des cyclines
CdkI:	cycline inhibitrice des Cdk
CTGF:	facteur de croissance du tissu conjonctif
DED:	domaine indicatif de la mort
DHT:	dihydrotestostérone
EDTA:	acide éthylènediamine tétraacétique
EGF:	facteur de croissance épidermique
EGFR:	récepteur du EGF

EGTA:	acide éthylènebis(oxyéthylènenitrilo) tétraacétique
FAK:	kinase d'adhésion focale
FC:	facteur de croissance
FGF:	facteur de croissance fibroblastique
FGF-R:	récepteur du FGF
g:	accélération gravitationnelle à la surface de la terre
GDF:	facteur de croissance et de différenciation
GM-CSF:	facteur stimulant les colonies de type granulocyte-macrophage
GnRH:	hormone de relâche des gonadotrophines
GRP:	peptide de relâche de la gastrine
GTP:	guanosyl triphosphate
HBP:	hyperplasie bénigne de la prostate
HPC1:	hereditary prostate cancer 1
IGF:	facteur de croissance insulinique
IGF-BP:	protéine de liaison de l'IGF
IGF-R:	récepteur de l'IGF
Il:	interleukine
KAP:	phosphatase associée à la kinase
kDa:	kiloDalton
KGF:	facteur de croissance des kératinocytes
LAP:	peptide de latence
LH:	hormone lutéinisante
LHRH:	hormone de relâche de l'hormone lutéinisante
LOH:	perte d'hétérozygoté

mL:	millilitre
NE:	neuroendocrine
ODN:	oligodésoxynucléotide
ONPG	o-nitrophényl- beta-D-galactopyranoside
PAP:	phosphatase acide prostatique
PDGF:	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIN:	néoplasie prostatique intraépithéliale
PIP3:	phosphatidyl inositol-3, 4, 5 triphosphate
PKA:	protéine kinase A
PTP:	phosphotyrosine phosphatase
RA:	récepteurs des androgènes
Rb:	rétinoblastome
RCPG:	récepteur couplé aux protéines G
RE:	récepteur des œstrogènes
S/TK:	sérine/thréonine kinase
SBE:	élément spécifique de liaison Smad
SHBG:	globuline de liaison des hormones sexuelles
TGF:	facteur de croissance transformant
TK:	tyrosine kinase
TNF:	facteur tumoral de nécrose
VEGF:	facteur de croissance vasculaire/endothélial

Liste d'abréviations des acides aminés

A:	Alanine (Ala)
C:	Cystéine (Cys)
D:	Acide aspartique (Asp)
E:	Acide glutamique (Glu)
F:	Phénylalanine (Phe)
G:	Glycine (Gly)
H:	Histidine (His)
I:	Isoleucine (Ile)
K:	Lysine (Lys)
L:	Leucine (Leu)
M:	Méthionine (Met)
N:	Asparagine (Asn)
P:	Proline (Pro)
Q:	Glutamine (Gln)
R:	Arginine (Arg)
S:	Sérine (Ser)
T:	Thréonine (Thr)
V:	Valine (Val)
W:	Tryptophane (Trp)
X:	N'importe quel acide aminé
Y:	Tyrosine (Tyr)

À ma mère et à la mémoire de mon père

Remerciements

Je veux d'abord remercier le Dr Simone Chevalier qui m'a généreusement accueillie dans son laboratoire me permettant de poursuivre mes études de doctorat. Tout au long de ces années, elle m'a offert le support et la latitude nécessaires pour combler les exigences du doctorat et celles inhérentes à l'éducation de mon fils Frédérick. Je tiens à la remercier pour toutes ces années au cours desquelles j'ai pu acquérir des connaissances. Un merci au Dr Sylvie St-Jacques qui a cru à mon retour aux études. Je remercie également les membres du laboratoire pour les discussions.

Je remercie le FCAR/FRSQ, le département d'urologie de l'hôpital Général de Montréal ainsi que la Faculté des Études Supérieures qui m'ont accordé le support financier nécessaire pour poursuivre ces études. Un merci particulier au Dr Gilles Bleau pour ses précieux conseils.

Je ne peux passer sous silence le support moral de ma famille, particulièrement ma mère, Carline, et de mes amis qui ont été à l'écoute de mes difficultés, de mes joies qui ont parsemé ce long parcours.

Finalement, un merci à Frédérick pour sa patience et ses efforts de compréhension face aux exigences nombreuses de ces études.

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse reflète le cheminement particulier parcouru lors de mes études de doctorat. Les deux premières années du doctorat se sont déroulées sous la supervision du Dr. Sylvie St-Jacques et le sujet portait sur le rôle de l'endogline au cours du cycle oestral chez la souris. Suite au départ du Dr St-Jacques pour la ville de Québec, j'ai voulu poursuivre mes études de doctorat. Le Dr.Simone Chevalier m'a accueillie dans son équipe. Elle a accepté que je poursuive mes travaux sur l'endogline en utilisant le modèle de la prostate qui est le centre d'intérêt de son laboratoire. Mon projet a par la suite été réorienté afin de poursuivre la caractérisation d'un nouveau marqueur potentiel du cancer de la prostate, la protéine kinase c-tak1/kp78/mark3.

1. Introduction

Nos sociétés ont fait des progrès remarquables au cours des dernières décennies dans différents domaines de la recherche appliquée à la biologie et à la médecine. Les impacts de nouveaux traitements et méthodes chirurgicales sont importants et de nombreuses pathologies, telles que différents types d'infections, le diabète, les maladies cardiovasculaires etc., ont pu être éliminées voire contrôlées. Ceci a eu pour conséquence d'augmenter la longévité des populations mais en contrepartie nous sommes aussi confrontés à l'apparition de maladies liées au vieillissement. Chez l'homme, les pathologies prolifératives de la prostate, soient l'hyperplasie bénigne (HBP) et le cancer (CaP), sont devenues un problème de santé publique puisqu'une grande proportion des hommes en sont atteints après l'âge de 50 ans (Carter and Isaacs, 1988; Schulman and Lunenfeld, 2002) avec près de 1% chez les hommes de 50 à 75 ans au Canada (<http://www.hc-sc.gc.ca/>). Ces pathologies se développent généralement lentement et parfois subtilement comme c'est le cas pour le CaP puisque l'absence de symptômes a longtemps été responsable d'un diagnostic tardif, i.e. à un stade avancé ou métastatique généralement létal. Les campagnes de sensibilisation réalisées au cours des 15 dernières années de même que l'utilisation courante d'un test sérique de l'antigène prostatique spécifique (APS) couplé à l'examen de la prostate par toucher rectal, ont permis le dépistage du CaP à un stade plus précoce de la maladie. En ce sens, lorsque le cancer est circonscrit au tissu prostatique, les interventions thérapeutiques sont plus efficaces. Ainsi, nous assistons présentement à une baisse de la mortalité attribuée au CaP, qui vient de passer du 2^{ième} au 3^{ième} rang.

Par ailleurs, la survie des patients est fortement diminuée lorsque les cellules tumorales ont traversé la capsule prostatique et que des métastases ont fait leur apparition. A ce stade, les traitements hormonaux systémiques visant à éliminer les androgènes et bloquer leur action s'avèrent le meilleur choix thérapeutique disponible, apportant une réponse rapide en terme de régression des tumeurs et de diminution du niveau d'APS sanguin. Cependant, les effets ne sont que transitoires et la plupart des patients récidivent. Ceci est associé à un sombre pronostic puisque l'arsenal chimiothérapique ne peut contrer la progression du CaP androgéno-indépendant. Les patients évoluent irrémédiablement vers le stade terminal de la maladie.

De nombreuses études se sont donc attardées à déterminer les facteurs impliqués dans la progression du CaP. On s'est rapidement rendu compte de sa grande complexité puisqu'il implique non seulement des cellules tumorales strictement dépendantes des androgènes mais plutôt une multitude de sous-populations de même que des facteurs non androgéniques et de nombreuses molécules de signalisation. L'ensemble de ces facteurs favorise l'émergence de cellules tumorales aux phénotypes plus agressifs. Malgré les progrès accomplis, il est impérieux de mieux comprendre les différentes phases du développement et de la progression du CaP afin de faire de la prévention, découvrir de nouveaux marqueurs, et développer des thérapies plus efficaces pour contrer la croissance des cellules tumorales androgéno-indépendantes.

1.1. La prostate humaine

La prostate fait partie des glandes sexuelles accessoires du système uro-génital mâle. Elle se localise sous la vessie et est traversée entièrement par l'urètre (figure 1) ainsi que par les canaux éjaculatoires des vésicules séminales (Tanagho EA McAninch JA, 1992). Chez l'adulte, ses caractéristiques morphologiques rappellent la taille et la forme d'une châtaigne pesant entre 15 à 20 g (gramme). Une représentation anatomique apparaît à la figure 2. La prostate est entourée d'une mince capsule fibreuse (figure 2A) sous laquelle se projettent des fibres musculaires lisses rejoignant le pourtour de l'urètre. Essentiellement, la prostate est composée de tissu glandulaire épithélial et de tissu fibromusculaire. La portion glandulaire de la prostate peut être divisée en trois zones (figure 2B): 1-la zone périphérique qui comprend 70% des glandes de même que les canaux qui s'ouvrent dans l'urètre prostatique distal; 2-la zone centrale qui comprend 25% des glandes et dont les canaux se projettent dans l'urètre moyenne; 3-la zone de transition autour de l'urètre composée de 5% des glandes. Cette dernière zone se subdivise en deux petits lobes desquels la majorité des canaux aboutissent au niveau du sphincter de l'urètre. Le stroma fibromusculaire remplit les espaces entre les glandes de même que la portion de la prostate dépourvue d'éléments glandulaires. Il est composé de cellules musculaires lisses ainsi que de cellules du tissu conjonctif (fibroblastes), de petits vaisseaux sanguins, et occasionnellement de cellules inflammatoires.

La morphologie de la prostate humaine normale avec ses composantes cellulaires, est illustrée par une coupe histologique représentée à la figure 3A. Le schéma présenté à

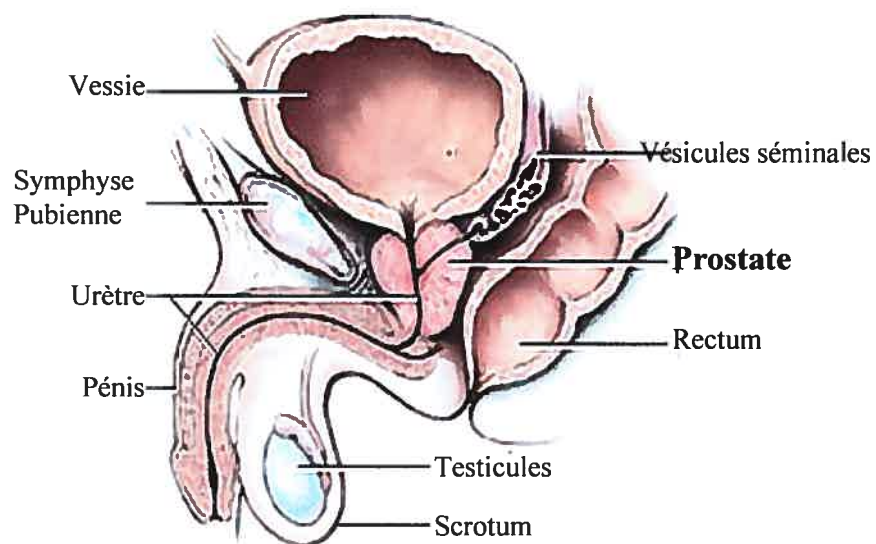
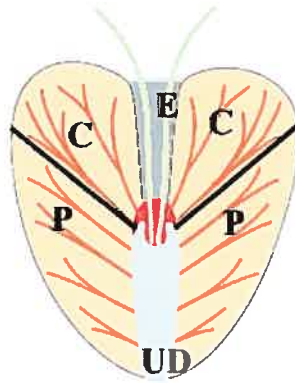


Figure 1. Système uro-génital mâle et localisation de la prostate humaine.

Copyright 2000 Medical Media Design

A



B

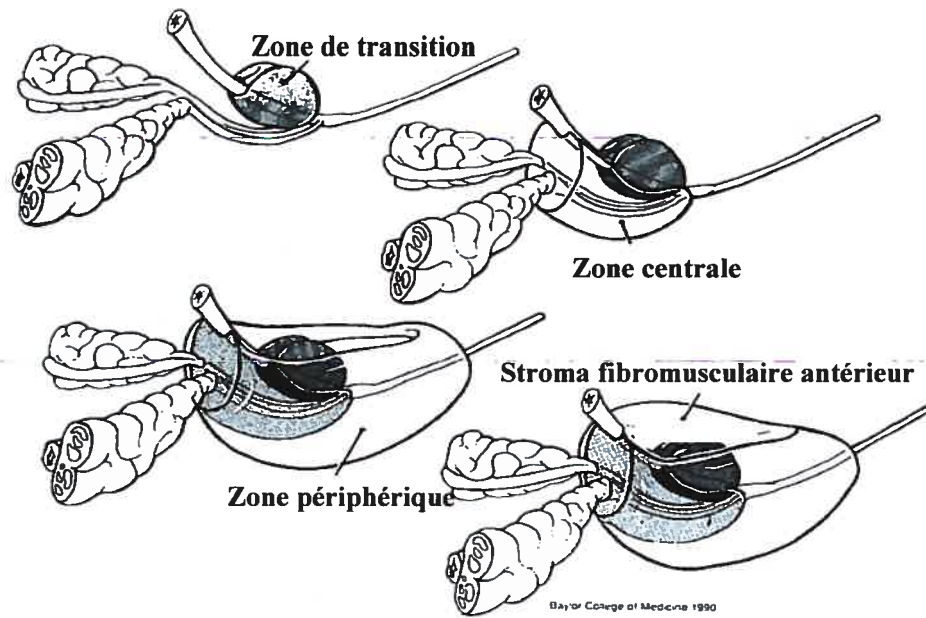
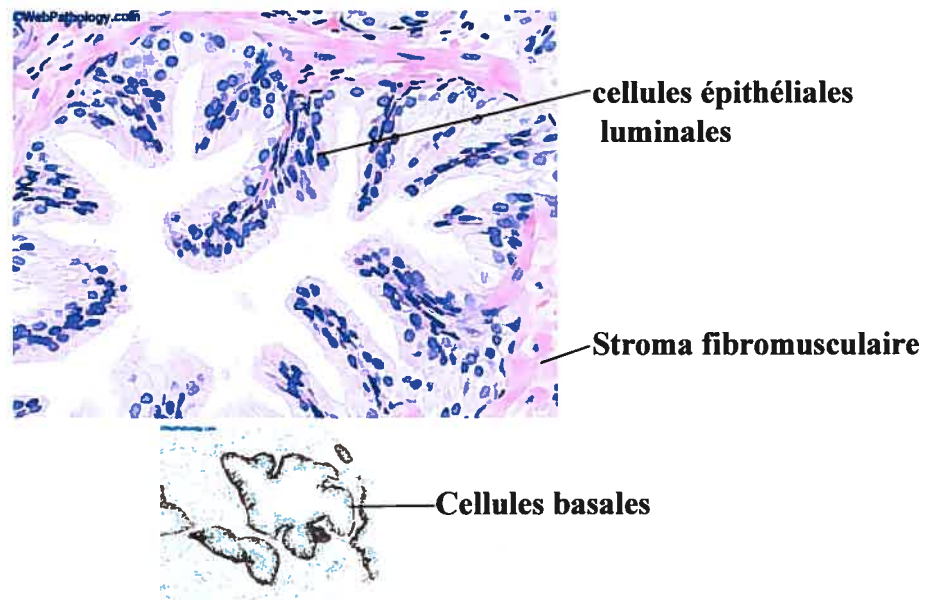


Figure 2. Définitions anatomiques des zones de la prostate.

A) Coupe sagittale. La zone centrale (C) et la zone périphérique (P) sont délimitées par le *verumontanum* et ses projections. L'urètre distal (UD) et les canaux éjaculatoires (E) sont aussi illustrés. B) Schématisation des différentes zones de la prostate. Tirée de McNeal et al., 1988.

A



B

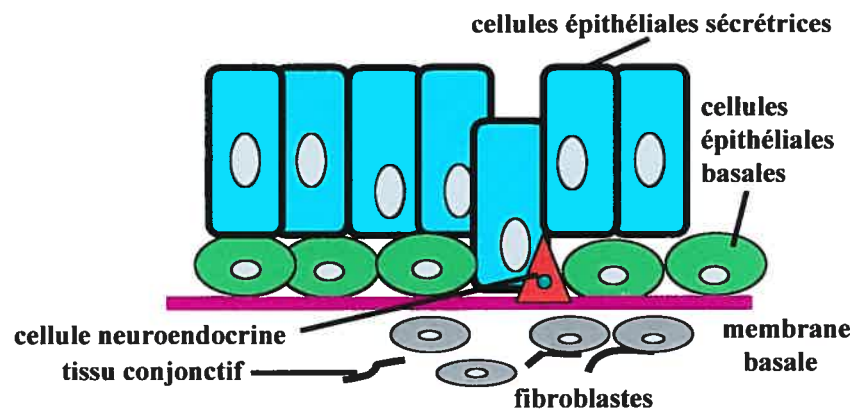


Figure 3. Morphologie de la prostate humaine normale

A) Coupes histologiques montrant les cellules épithéliales luminales cylindriques (partie supérieure) et les cellules basales (partie inférieure) respectivement caractérisées par leur coloration pâle du cytoplasme et l'expression des cytokératines de haut poids moléculaire (anticorps 34 β E12). (Tirée et adaptée du site web www.webpathology.com). B) Représentation schématique de la prostate normale illustrant ces types cellulaires de même que les cellules neuroendocrines (NE) et les éléments du stroma. Adaptée de Sell and Pierce, 1994.

la figure 3B reprend ces éléments et montrent aussi les autres sous-types de cellules retrouvés dans les glandes ou acini. L'épithélium normal se compose de trois types cellulaires distincts (figure 3B) (McNeal, 1980). On distingue une couche de cellules épithéliales basales appuyées sur une membrane basale. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de cytokératines spécifiques, dites de haut poids moléculaire qui sont absentes dans des cellules luminales (figure 3A) (Xue et al., 1998). Quelques cellules neuroendocrines (NE) sont présentes et sécrètent des neuropeptides pouvant influencer la croissance des cellules prostatiques adjacentes (Noordzij et al., 1995; di Sant'Agnesse and Cockett, 1996). Les cellules épithéliales sécrétrices ou luminales caractéristiques de la prostate produisent diverses substances retrouvées dans le liquide séminal au moment de l'éjaculation dont du cholestérol, du zinc, du citrate, des carbohydrates, des électrolytes, des polyamines, des hormones, des lipides, des protéines, ainsi que des facteurs de croissance (FC). Le liquide d'éjaculation contient aussi des produits de sécrétion de cellules neuroendocrines. Parmi les nombreux groupes de protéines identifiés dans le liquide séminal, il y a l'APS et la phosphatase acide prostatique (PAP), dont la présence à des niveaux élevés dans la circulation est généralement indicatrice de CaP (Aumuller, 1989). Les fonctions des composantes du liquide prostatique ne sont pas totalement connues. Par ailleurs, le rôle majeur de l'APS aussi identifié sous le nom de séminine ou de protéase séminale, est de dissoudre le gel séminal par protéolyse, favorisant ainsi le processus de fécondation (Elzanaty et al., 2002).

1.2. Le développement et l'évolution de la prostate avec l'âge

Le développement de la prostate commence chez le fœtus et sa croissance se poursuit jusqu'à l'âge adulte où elle atteint sa pleine maturité fonctionnelle (contribution à la composition du plasma séminal). La morphogenèse de la prostate nécessite l'apport d'androgènes (testostérone et son principal métabolite actif, la dihydrotestostérone ou DHT produite sous l'action de la 5- α -réductase) systémiques produits par les testicules fœtaux. Ces hormones se lient aux récepteurs des androgènes (RA) localisés au niveau du noyau et activent la transcription des gènes requis pour déclencher la formation des boutons épithéliaux partant du sinus urogénital. L'apport androgénique est essentiel puisque la présence de mutations inactivant les RA résulte en l'absence de la prostate (Brown et al., 1988; Charest et al., 1991). De plus, chez le rat, l'exposition de sinus urogénital femelle aux androgènes induit la formation des boutons prostatiques (Takeda et al., 1986).

Les cellules se divisent et forment des cordons épithéliaux caractérisés par la co-expression des cytokératines 5, 8, 14 et 18, ainsi que la protéine p63 (Parsons et al., 2001; Wang et al., 2001). Par la suite, ces cordons s'allongent au travers du mésenchyme. À ce stade s'amorce la formation des canaux. L'épithélium comprend déjà les trois sous-types de cellules épithéliales présentes dans la glande adulte, basales, sécrétrices, et NE (Noordzij et al., 1996; Marker et al., 2003) bien que leur origine demeure controversée. Il en est de même pour le mésenchyme qui contient des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, vasculaires, neuronales et lymphatiques.

La prostate mature possède une structure compacte et sa taille est relativement stable jusqu'à l'âge de 50 ans. Le poids de la prostate augmente lentement par la suite, soit de 3 à

5 g par tranche de 10 ans (Berry et al., 1984). Cette croissance en continue affecte presque tous les hommes et génère l'HBP, qui s'accompagne souvent en parallèle du développement du CaP.

1.3. Pathologies de la prostate

Tel que leurs noms l'indiquent, l'HBP et le CaP sont respectivement des conditions bénigne et maligne. Essentiellement, l'HBP ne constitue pas un événement précurseur du CaP et la probabilité d'apparition du CaP n'est pas reliée à la présence de l'HBP (Tanagho EA McAninch JA, 1992). Ces pathologies se distinguent entre autres par les zones d'où elles émergent et les types cellulaires impliqués (décrits ci-après). De manière générale, leur développement refléterait des anomalies de croissance résultant de déséquilibres relatifs entre les taux de survie, prolifération, et différenciation des diverses populations de cellules prostatiques par rapport à ceux de leur apoptose (Montironi et al., 1994; Colombel et al., 1998).

1.3.1. L'hyperplasie bénigne

En raison de son incidence élevée (20% des hommes âgés de 50 ans et moins; jusqu'à 50% des hommes de 50-60 ans; et 70% de ceux qui ont 60 ans et plus) (Zakaria et al., 2001), l'HBP pourrait se définir comme étant un processus physiologique. Ainsi, la prostate hyperplasique génère souvent une compression de l'urètre prostatique, qui lorsqu'elle devient symptomatique, peut causer une vessie irritable et entraîner des problèmes de débit urinaire allant jusqu'à l'obstruction. L'intensité des symptômes n'est cependant pas reliée à la taille de la glande (Christensen and Bruskewitz, 1990; Witjes et al., 1997). L'HBP touche

à la fois les composantes stromale et épithéliale et se manifeste d'abord dans la zone de transition. Dès l'âge de 30 ans, l'apparition de petits nodules stromaux est associée avec un début d'hyperplasie à leur pourtour qui continue à se développer avec l'âge (Tanagho EA McAninch JA, 1992).

L'étiologie de la maladie demeure obscure. Plusieurs facteurs de risque ont été considérés dont évidemment l'âge, la race, les diverses maladies (hypertension, cirrhose du foie), la vasectomie, et les hormones sexuelles (androgènes, œstrogènes) mais aucun à lui seul ne peut expliquer son développement (Berry et al., 1984; Frea et al., 1987; Jakobsen et al., 1988; Hammarsten et al., 1998). Parmi les hypothèses émises, mentionnons un retour du potentiel de prolifération des cellules embryonnaires du *verumontanum* (zone de transition) qui ont donné naissance à la prostate (McNeal, 1978). Une seconde met en cause un déséquilibre entre l'action des hormones sexuelles et des FC stimulant la prolifération des cellules stromales et épithéliales de la prostate (Marcelli and Cunningham, 1999; Carson, III and Rittmaster, 2003; Karan et al., 2003). On sait que le taux de testostérone diminue avec l'âge mais celui de la DHT plus active que la testostérone, demeure constant (Carson, III and Rittmaster, 2003). L'action de la DHT, couplée à une modification de la sensibilité des RA et/ou à des niveaux altérés des FC fonctionnels modulés par la DHT seraient autant de facteurs impliqués dans la perte de l'homéostasie glandulaire. De plus, le ratio œstrogène/androgène dans le tissu prostatique augmente avec l'âge, ce qui favoriserait l'hyperplasie des cellules basales (Krieg et al., 1993). Ceci est corroboré par des études menées chez le chien indiquant que les œstrogènes induisent l'hyperplasie des cellules stromales et épithéliales basales de la prostate *in vivo* (DeKlerk et al., 1979). En plus d'un

rôle possible des stéroïdes sexuels, d'autres facteurs non stéroïdiens seraient également impliqués. A titre d'exemple, les niveaux augmentés du facteur de croissance fibroblastique 7 (FGF7) produit par les cellules stromales dans l'HBP corréleraient avec une activité accrue de prolifération des cellules épithéliales. Cette boucle paracrine s'expliquerait par l'action de l'interleukine 1 α (Il-1 α) produite par les cellules épithéliales sénescents sur la production du FGF7 (Ropiquet et al., 1999; Carson, III and Rittmaster, 2003).

1.3.2. Néoplasie prostatique intraépithéliale (PIN)

Le CaP se développe principalement à partir des cellules épithéliales bordant les acini (adénocarcinomes/épithéliomes). Il évolue en plusieurs phases et se présente d'abord sous forme de lésions pré-malignes de type PIN (néoplasie prostatique intraépithéliale) fréquentes dans la zone périphérique (McNeal et al., 1988). Ces lésions résulteraient de la prolifération anormale des cellules épithéliales basales au profit des cellules sécrétrices luminales (Bonkhoff et al., 1994b). Tout comme dans le CaP, ces lésions montrent un profil histologique qui diffère selon la gravité de la lésion et détermine ainsi la probabilité de développer un CaP. Au stade précoce, le PIN est constitué d'acini hyperplasiques bénins bordés de cellules d'apparence maligne et ces patients ont le même risque que la population saine de développer un CaP (Brawer et al., 1991). Cependant, le PIN de stade intermédiaire serait un indicateur de l'apparition ultérieure du CaP (Davidson et al., 1995). Par ailleurs, lorsque l'analyse histologique révèle un PIN de stade avancé ceci reflète un risque accru, soit de 30% à 50% de retrouver une lésion cancéreuse lors de biopsies subséquentes (Brawer et al., 1991).

1.3.3. Le cancer de la prostate

De la même façon que l'HBP, le CaP touche une proportion grandissante de la population vieillissante, avec près de 75% des cancers détectés chez des hommes âgés entre 50 et 70 ans (Brawley et al., 1998). Les nombreux changements histologiques observés dans les glandes dont l'atrophie et l'hyperplasie viennent souvent compliquer l'interprétation des biopsies et peuvent malencontreusement générer des faux positifs tandis que des changements histologiques subtils peuvent être vraiment dus à des cellules tumorales (Nelson et al., 2003). Pour limiter ces problèmes et catégoriser les stades du CaP, les pathologistes ont adopté un système de classification de Gleason (Gleason and Mellinger, 1974) qui chiffre l'aspect des glandes de 1 à 5 en se basant sur leur organisation et l'état de différenciation des cellules sécrétrices, le premier étant un cancer différencié tandis qu'au stade 5, le cancer est non différencié et associé avec la perte des structures glandulaires (figure 4). L'addition des grades histologiques, prédominant et deuxième plus important, du tissu analysé donne la somme de Gleason qui permet alors d'orienter les cliniciens quant au pronostic et au type de traitement optimal pour le patient. Ainsi, les cancers peu différenciés sont plus agressifs et sont souvent accompagnés de métastases qui corrént avec un faible taux de survie (Bova et al., 1998).

1.3.3.1. Diagnostic

Tel que mentionné auparavant et s'appliquant pour d'autres types de cancer, le dépistage précoce d'un CaP (toucher rectal, mesure sérique d'APS, biopsies) augmente significativement les chances de survie des patients puisqu'il permet d'appliquer des traitements efficaces lorsqu'il est encore localisé à la glande. Il est cependant souvent

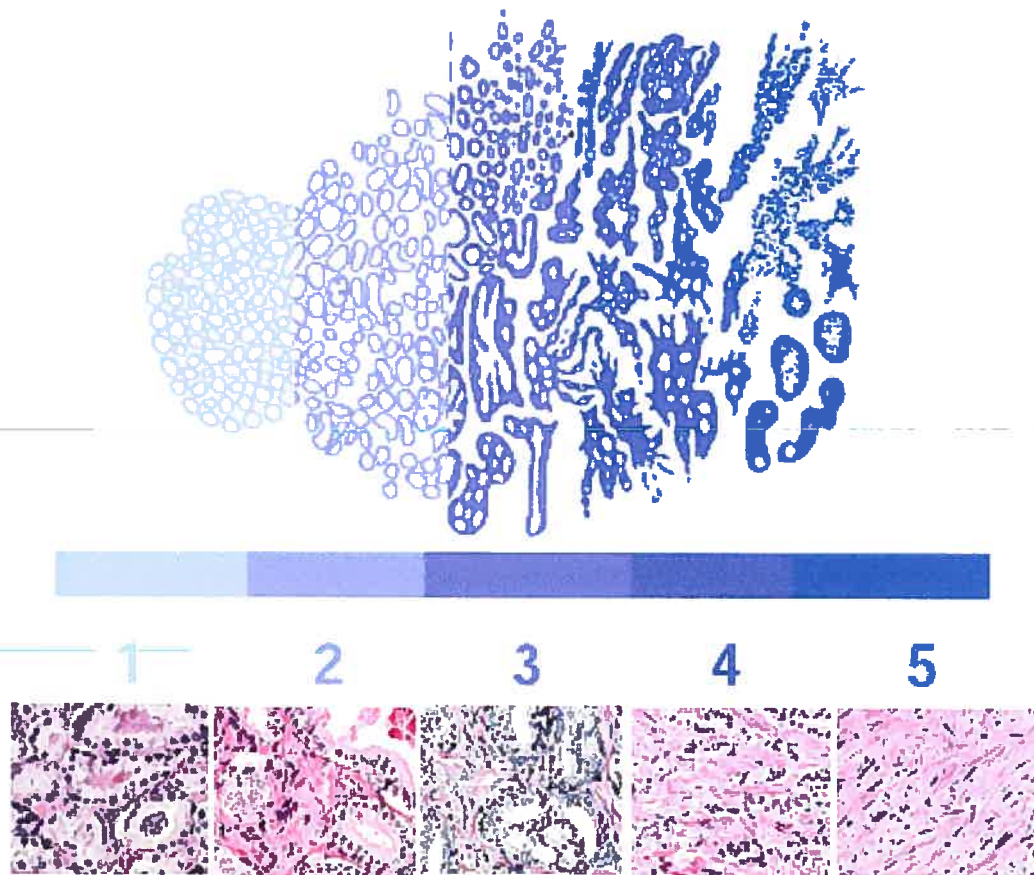


Figure 4. Système de gradation de Gleason.

La méthode de classification est basée sur l'aspect architectural des glandes. Au stade 1, les glandes ressemblent à celles de la prostate normale alors qu'au stade 5, elles sont très désorganisées. Tirée de Dr. D.F. Gleason, Minneapolis, Minnesota Integrated design courtesy of Pittsburgh Supercomputing Center, 2003.

difficile, voire impossible, de discriminer les foyers cancéreux latents de ceux qui sont plus agressifs et progresseront. Ceci souligne l'importance de la recherche pour trouver de nouveaux marqueurs et cibles thérapeutiques du CaP.

1.3.4. Thérapies du CaP

Le stade, localisé ou métastatique, du CaP de même que le profil clinique général du patient influencent le clinicien dans le choix de son approche thérapeutique. Ainsi, ces facteurs affectent grandement l'efficacité, la durée, et le succès de la thérapie.

1.3.4.1. Cancer localisé

L'arsenal courant pour traiter le CaP localisé comprend la chirurgie radicale et les radiations. Parmi les thérapies alternatives, mentionnons la cryochirurgie, l'hyperthermie, la thérapie génique intra-prostatique et les agents de différenciation (acide rétinoïque). La thérapie génique est encore à ses premiers balbutiements mais elle s'avère intéressante par la simplicité relative de l'introduction du vecteur dans la glande et le suivi clinique par l'APS et la taille de la prostate. À titre d'exemple, mentionnons l'utilisation du gène de la thymidine kinase de l'Herpes simplex (HSVtk), basé sur la capacité de HSVtk de convertir la drogue inactive le ganciclovir en sa forme active soit le ganciclovir triphosphate. Ainsi, dans le cadre d'un essai clinique de phase I, les patients reçoivent une injection intra-prostatique d'un adénovirus porteur du gène HSVtk et sont par la suite traités par voie intraveineuse avec la ganciclovir. Ces patients ont montré une baisse de 50% de leur niveau d'APS (Hermans, 2003). Le gène p53 portant de multiples mutations dans le CaP primaire est un autre candidat pour la thérapie génique (Morris and Scher, 2002).

1.3.4.1.1. Cancer avancé et thérapie hormonale adjuvante

Malgré le fait que de nos jours peu de patients se présentent avec un CaP avec métastases à distance (principalement aux os), ceci n'était pas le cas chez le tiers des patients il y a 20 ans. Par ailleurs, le diagnostic d'un CaP non confiné à la prostate avec extension locale, i.e. autour de la prostate, demeure fréquent. De plus, des cellules tumorales que l'on croyait uniquement localisées dans la prostate au moment de la chirurgie radicale pouvaient avoir déjà traversé la capsule et ne pas être détectées par les méthodes d'imagerie courantes. L'élévation subséquente de l'APS chez ces patients signifie alors la présence systémique d'un CaP montrant des signes d'invasion ou de métastases, et oblige par le fait même le recours à des thérapies systémiques.

La thérapie de choix demeure la déprivation ou la suppression des androgènes. Celle-ci vise en principe à diminuer la progression tumorale, à normaliser l'APS, et à réduire les lésions métastatiques (Morris et al., 2002). Elle est réalisée soit par la castration chirurgicale (orchectomie) qui élimine les androgènes testiculaires ou encore, la castration chimique (analogues de l'hormone de relâche de l'hormone lutéinisante ou LHRH, tels la goseréline, la leuprolide et la triptoreline) qui inhibe la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) de l'hypophyse et réduit ainsi la production de testostérone.

La castration peut être couplée à l'administration d'anti-androgènes (stéroïdiens et non stéroïdiens) pour un blocage plus complet par inhibition de l'action des androgènes résiduels périphériques (surrénaux) au niveau du RA dans les cellules cancéreuses dépendantes des androgènes et causant leur mort par apoptose (Catz and Johnson, 2003).

La thérapie combinée a fait l'objet de quelques grandes études (Denis et al., 1993; Eisenberger et al., 1998); il appert que les avantages seraient supérieurs à des stades moins avancés car les patients présentant des métastases osseuses et aux tissus mous acquièrent peu d'avantages.

Plus récemment, la thérapie hormonale intermittente a été développée à partir du modèle expérimental Shionogi de cancer du sein de souris androgéno-dépendant (Gleave et al., 1997). Ceci permet la croissance des cellules sensibles aux androgènes en présence d'androgènes et leur apoptose (régression des tumeurs) en absence des stéroïdes. La réponse, chez l'humain, est suivie par les pics d'élévation de l'APS (Sternberg, 2002).

Plusieurs études tendent à démontrer que le traitement hormonal administré immédiatement après la chirurgie radicale de la prostate et l'éradication des ganglions lymphatiques pelviens augmente la survie et réduit le risque de récurrence du cancer (Messing et al., 1999; Zincke et al., 2001). La combinaison des traitements hormonaux et de radiations apparaît favorable aux patients ayant subi une chirurgie et présentant des ganglions lymphatiques positifs (Zagars et al., 2001). Une proportion de 42% des patients traités par chirurgie ou par radiation mais ayant des ganglions lymphatiques négatifs montre un délai dans la récurrence du cancer lorsqu'ils ont aussi accès à la thérapie hormonale (Sternberg, 2002). Toutefois, l'appréciation de ces résultats demande un suivi à plus long terme de ces patients. Par ailleurs, la thérapie hormonale néo-adjuvante appliquée avant le traitement chirurgical pour un CaP localisé limite l'étendue du tissu cancéreux et peut faciliter la chirurgie mais a peu d'effet sur le taux de survie et de récurrence (Pansadoro, V and Sternberg, 1999 Sternberg, 2002). Ces traitements ne sont pas sans avoir des effets

indésirables (impotence, chaleurs, diarrhée, gynécomastie, anomalies de la fonction hépatique) (Rosenberg and Small, 2003).

1.3.4.1.2. Cancer avancé et chimiothérapie

L'efficacité de la thérapie anti-androgènes pour un CaP avancé est en moyenne de 18 mois à 2,5 ans (Sternberg, 1992; Morris and Scher, 2002) et est suivie de récurrences chez une majorité des patients. Le taux de survie de ces patients dépend de la sévérité du cancer, étant en moyenne de 11,9 mois mais seulement de 6 mois pour les cancers plus agressifs (Morris and Scher, 2002). Le choix des traitements consiste alors en l'essai d'une deuxième thérapie hormonale et est suivi de la chimiothérapie associée ou non à la thérapie endocrinienne. Les thérapies expérimentales (en développement) associées aux thérapies palliatives constituent le choix subséquent.

Le pronostic est généralement sombre puisque l'arsenal des agents chimiothérapeutiques disponibles ne semble pas assurer la survie à long terme. Jusqu'à récemment le CaP était considéré comme étant résistant au traitement de chimiothérapie (Roth, 1999). Les résultats apparaissent controversés et surtout influencés par la grande diversité des drogues utilisées, seules ou combinées, leur séquence temporelle d'administration, et l'évaluation de la réponse biologique selon les critères mesurés (APS, taux de survie, toxicité). À titre d'exemple, les agents d'alkylation (melphalan, ifosfamide) ou inhibiteurs de topoisomérases I et II (irinotecan, étoposide) provoquent une réponse chez 10% des patients (Smith et al., 1993; Hussain et al., 1994; Williamson et al., 1996; Schmid et al., 1997). La cyclophosphamide, un agent bloquant la division cellulaire par sa liaison avec l'acide

désoxyribonucléique (ADN), est un peu plus efficace avec un taux de succès pouvant atteindre 30% (Raghavan et al., 1993). La combinaison des drogues, vinblastine (agent qui déstabilise les microtubules) et phosphate d'estrémustine (modifie la vitesse de la dynamique des microtubules), semble susciter une meilleure réponse tel que montré par la baisse du taux d'APS chez 30 à 63 % des patients (Seidman et al., 1992). Jusqu'à maintenant au moins une dizaine de rapports d'essais cliniques ont été publiés sur l'utilisation du taxol ou du docetaxel (action au niveau des microtubules) combiné ou non au phosphate d'estrémustine en phases cliniques I et II chez les patients souffrant de CaP réfractaire aux thérapies hormonales. Bien qu'une activité anti-tumorale ait été montrée par la réduction des métastases des tissus mous, la diminution du niveau d'APS, de la douleur et l'effet sur le taux de survie demeure encore sous évaluation (Obasaju and Hudes, 2001). La vinblastine est aussi utilisée dans des essais cliniques en combinaison avec le taxol (Pienta et al., 1996) ou autres composés chimiothérapeutiques et anti-androgènes (Pettaway et al., 2000; Zelefsky et al., 2000). Une autre étude clinique de phase II prônant l'utilisation combinée de la vincristine, de la cyclophosphamide et de la dexaméthasone révèle que la vincristine est un agent intéressant par sa faible toxicité dans les événements thromboemboliques (Daliani et al., 2003). De nouvelles approches utilisant une panoplie de drogues telles que le kétoconazole, la doxorubicine, la vinblastine et l'étoposide font l'objet d'essais cliniques de phase II et III, utilisées seules ou combinées à l'hormono-thérapie (Pettaway et al., 2000; Zelefsky et al., 2000; Clark et al., 2001; Ben Josef et al., 2001).

1.3.4.1.3. Stratégies en développement

Parmi les stratégies prometteuses, mentionnons d'abord la thérapie immune utilisant les cellules dendritiques pulsées avec l'APS combinée au facteur stimulant les colonies de type granulocyte-macrophage (GM-CSF). L'utilisation d'inhibiteurs de l'angiogenèse avec la thalidomide ou un antagoniste de l'endothéline-1 font aussi l'objet d'essais cliniques visant respectivement à bloquer l'apport sanguin et la prolifération des cellules tumorales (D'Amato et al., 1994; Nelson et al., 1995; Folkman, 1995).

1.4. Hétérogénéité cellulaire de la prostate et implication dans le cancer

En raison de la complexité de la composition cellulaire de l'épithélium prostatique (cellules basales, sécrétrices, et NE), plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le développement du CaP. Parmi celles-ci, mentionnons une origine mettant en cause la transformation/dédifférenciation des cellules épithéliales sécrétrices, tel que corroborée par l'augmentation des taux circulants d'APS et de la PAP chez les patients atteints de CaP (Denis et al., 1993; Oesterling et al., 1993). Dans la glande normale, la différenciation des ces cellules requiert la présence des androgènes et une fois différenciées, les cellules sécrétrices dépendent strictement de la présence de ces hormones pour leur survie. Elles sont donc la cible de thérapies anti-androgènes dans le CaP, et tel que déjà mentionné, la baisse des niveaux d'APS et de PAP associée à une régression du volume tumoral, reflète l'apoptose des cellules dépendantes des androgènes. Étant donné l'effet temporaire de ces thérapies et le taux élevé de récurrence chez une majorité des cas avancés, il est évident qu'une partie seulement des cellules tumorales meurent. Il a ainsi été proposé que la survie

des cellules tumorales dans un environnement dépourvu d'androgènes s'explique par des modifications de la sensibilité des voies de signalisation impliquant les RA. À titre d'exemples, ceci peut se produire *via* une synthèse accrue de la DHT ou une surexpression des RA (Navarro et al., 2002), par l'activation des RA *via* des facteurs non stéroïdiens dont les FC, les neuropeptides, les cytokines (Anidjar et al., 2001), ainsi que par des mutations du RA (Koivisto et al., 1998). L'utilisation de traitements hormonaux intermittents en fonction des variations cycliques du niveau d'APS montre bien qu'en plus des cellules cancéreuses qui dépendent des androgènes pour leur survie (tuées par l'absence d'androgènes tout comme les cellules sécrétrices différenciées), les tumeurs contiennent des cellules cancéreuses sensibles aux androgènes qui survivent aux thérapies anti-androgènes. Comme ces cellules semblent s'adapter progressivement à un environnement dépourvu d'androgènes et contribuer à la progression du CaP, elles pourraient être la cible des traitements subséquents. Or tel que le révèle la physiologie normale de la prostate, les cellules souches survivent à la castration et peuvent croître et se différencier à nouveau sous un apport adéquat d'androgènes (Isaacs, 1999). Ce modèle de cellules souches responsables de la diversité des types cellulaires présents dans la prostate est de plus en plus évoqué pour expliquer le développement et la progression du CaP.

Les cellules souches ont initialement été caractérisées dans le système hématopoïétique par leur capacité de se renouveler et de se différencier en sous-types de cellules sanguines. La présence des cellules souches est importante dans les tissus nécessitant un renouvellement rapide des cellules tels que la moelle osseuse, la peau, le système gastro-intestinal (De Marzo et al., 1998). Ces dernières peuvent être totipotentes ou être partiellement

différenciées. Dans la prostate, par exemple, les cellules souches joueraient un rôle fondamental dans le développement des glandes ainsi que dans l'initiation et la progression de certaines formes de CaP (Sell and Pierce, 1994). Plusieurs modèles ont été proposés et sont illustrés à la figure 5 (Garraway et al., 2003). Selon le modèle schématisé en A, la couche des cellules souches qui reposent sur la membrane basale génère les cellules NE et les cellules dites transitoires qui forment les cellules sécrétrices. Le modèle B propose que les cellules souches soient précurseur des cellules NE, et des cellules basales et transitoires qui elles donneront les cellules sécrétrices. Finalement selon le schéma C, les deux principaux sous-types cellulaires soient les cellules basales et sécrétrices seraient formés chacun par leurs cellules souches distinctes. En regard de ces modèles, l'expression de différents marqueurs dans une même cellule tels que l'APS, les cytokératines respectives des cellules basales et sécrétrices, et la chromogranine A, appuie l'hypothèse stipulant que les cellules souches ont la capacité de se différencier en différents types cellulaires (Bonkhoff et al., 1994a; Bonkhoff, 1996; Verhagen et al., 2000).

1.5. Les facteurs de risque de l'émergence et du développement du CaP

1.5.1. Âge

Bien que le CaP affecte des hommes relativement encore jeunes (45-55 ans), ceci est plutôt rare et de fait, 85% des diagnostics sont posés chez des hommes âgés de plus de 65 ans, avec une moyenne d'âge se situant à 73,5 ans (Gronberg, 2003). En plus de

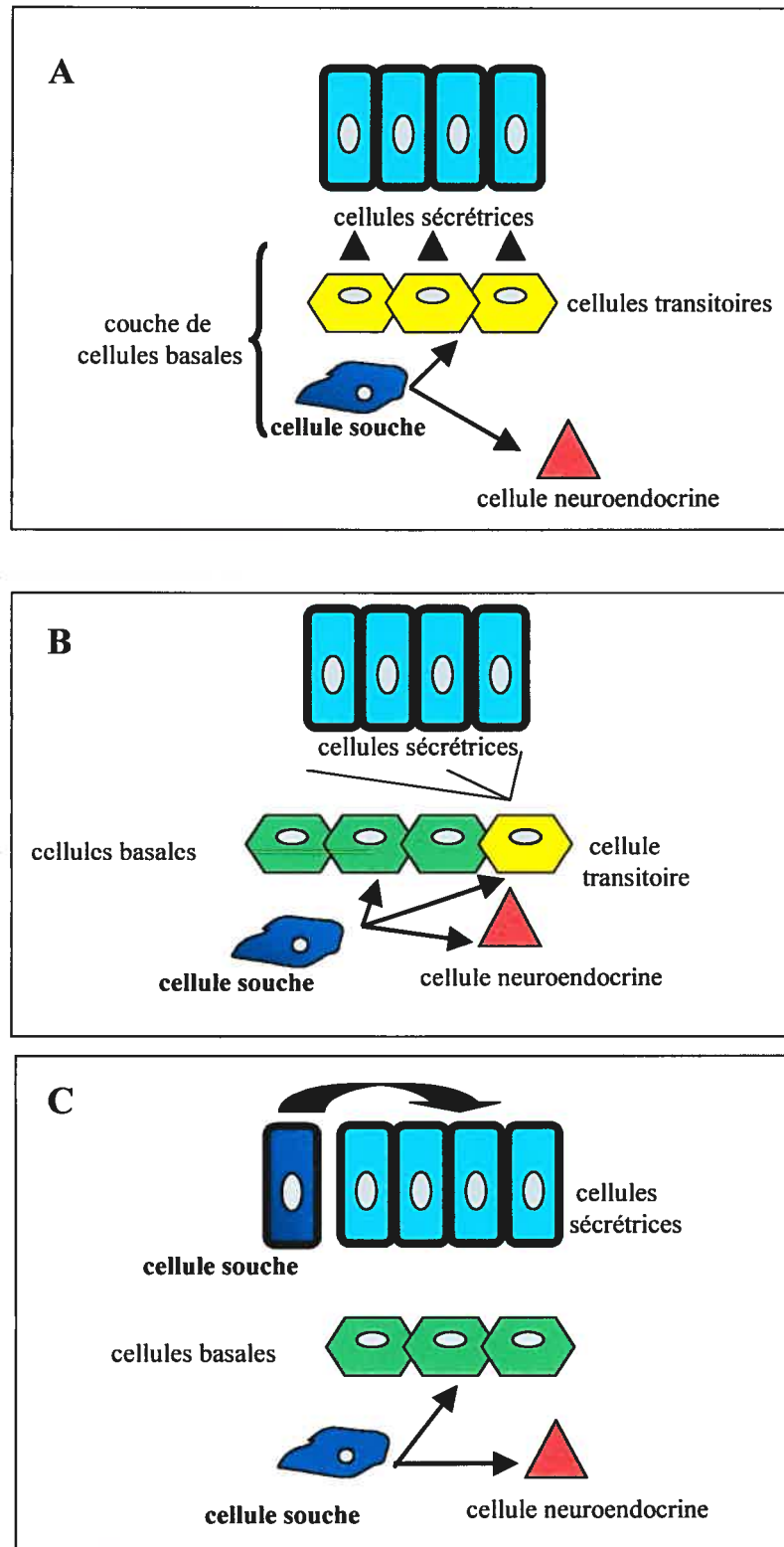


Figure 5. Différents modèles de différenciation des cellules épithéliales de la prostate.

Tirée et adaptée de Garraway, 2003.

l'âge, les principaux facteurs de risque sont raciaux, génétiques, reliés à l'environnement ou à la diète et les hormones sexuelles.

1.5.2. Race

L'incidence du CaP varie selon les pays et les groupes ethniques. Le plus bas taux est observé chez le peuple chinois tandis que l'Amérique du Nord et la Scandinavie remportent la palme, avec les plus hauts taux de CaP. Plus particulièrement, les hommes américains d'origine africaine ont une incidence élevée de CaP (Whittemore et al., 1995). Dans une même ville, des Afro-Américains et des Américains caucasiens ont une incidence différente du CaP qui pourrait s'expliquer par un métabolisme différent des androgènes (Fleshner and Klotz, 1998). Des Asiatiques vivant toujours en Asie sont peu affectés par le CaP (Ruijter et al., 1999). La prévalence du CaP latent est la même chez les Américains et les Japonais (Takahashi et al., 1995).

1.5.3. Causes génétiques

Des études épidémiologiques ont montré que la probabilité de développer un CaP est plus grande chez des jumeaux identiques, ayant un risque accru de quatre fois comparé à celui des jumeaux non identiques (Lichtenstein et al., 2000; Isaacs and Kainu, 2001). Selon le registre national des jumeaux, il y a 1 009 paires de jumeaux chez lesquelles au moins un membre était affecté par le CaP (Verhage and Kiemeny, 2003). Naturellement, une histoire familiale de CaP constitue un facteur de risque accru, la probabilité augmentant jusqu'à huit fois lorsque des hommes de la première et de la deuxième génération en sont atteints (Steinberg et al., 1990). De plus, le risque encouru de développer ce cancer serait à

un plus jeune âge. Selon des études de ségrégation, 9% des CaP serait attribuable à la transmission autosomique dominante d'un allèle à haut risque. Cette transmission génétique pourrait être liée au chromosome X ou être récessive puisque les hommes sont plus à risque s'ils ont des frères atteints comparés à ceux dont leurs pères sont atteints (Monroe et al., 1995).

1.5.3.1. Gènes associés au CaP

L'analyse des marqueurs de polymorphisme des chromosomes révèle sept locus ou sites associés au CaP (Nelson et al., 2003) (présentés ci-après dans le tableau 1).

Tableau 1. Sommaire des locus associés au CaP

Locus	Identifié par
1q24-25 (HPC1)	(Smith et al., 1996)
1q42.2-43 (PCAP)	(Berthon et al., 1998)
1p36 (CAPB)	(Gibbs et al., 1999)
8p22-23	(Li et al., 1998)
17p11 (HPC2/ELAC2)	(Rokman et al., 2001)
20q13 (HPC20)	(Berry et al., 2000)
Xq-27-q28 (HPCX)	(Xu et al., 1998)

La recherche de gènes cibles de susceptibilité du CaP a permis d'identifier dans la région 1q24-25, le gène *HPC1* (*hereditary prostate cancer 1*) impliqué dans 30 à 40% des CaP héréditaires (Smith et al., 1996). Malgré l'analyse de nombreux autres gènes, aucun n'aurait la pénétrance du gène *APC* (*adenomatous polyposis coli*) initialement découvert au niveau

du colon. Ceci suggère que pour qu'un allèle spécifique d'un gène devienne hautement à risque pour le développement du CaP, il doit être associé à des facteurs diététiques et/ou environnementaux.

1.5.3.2. Anomalies somatiques

Les cellules cancéreuses se caractérisent par diverses anomalies somatiques, telles que des mutations, des délétions de gènes, des amplifications de gènes, des réarrangements chromosomiques et des modifications de la structure de la chromatine (Karan et al., 2003). De façon générale, il est entendu que les cancers résultent de l'accumulation de telles anomalies. Dans le CaP, la perte de portions de chromosomes est plus fréquente que les gains. Ainsi, la perte des régions 8p et 13q est retrouvée dans 50% des échantillons analysés alors que l'incidence pour les portions 4q, 5q et 18q est de l'ordre de 17 à 25% (Karan et al., 2003; Nelson et al., 2003). Les gains repertoriés sont au niveau de 2p, 11p, 1q, 3q, 4q, 7q, 8q, 11q, 12q et Xq (Zitzelsberger et al., 2001). Ces altérations chromosomiques résultent souvent en une activation de nombreux oncogènes de même que l'inactivation de plusieurs gènes de suppression de tumeurs et de métastases.

1.5.3.2.1. Oncogènes et gènes de suppression tumorale

Les proto-oncogènes sont des gènes codant pour des protéines responsables de la régulation normale des fonctions des cellules telles que la survie, la prolifération, et la différenciation, de même que le contrôle des interactions entre cellules et avec la matrice extracellulaire. Les proto-oncogènes peuvent devenir oncogéniques et donc acquérir de nouvelles fonctions suite à diverses altérations génétiques tels des délétions, mutations, surexpressions,

amplifications et réarrangements chromosomiques chez un allèle du gène. À l'inverse, les gènes de suppression tumorale ont un rôle de régulation négative de la croissance cellulaire et l'apparition de diverses modifications génétiques (mutations, délétions, réarrangements) et de méthylation de promoteurs de certains de ces gènes chez les deux allèles constituent autant de facteurs qui modifient leur rôle et mode d'action. À l'aide de marqueurs d'ADN microsatellites, les gènes de suppression tumorale ont été localisés sur des chromosomes ayant perdu un allèle. Ainsi le pourcentage de perte d'hétérozygoté (LOH) représente la fréquence de la perte d'un allèle sur différents chromosomes. Dans le CaP, ces analyses montrent une variabilité selon les études, reflet de l'hétérogénéité des tumeurs prostatiques. Le tableau 2 illustre quelques gènes de suppression tumorale impliqués dans le CaP.

En principe, la plupart des composantes des voies de signalisation positive et négative des fonctions des cellules peuvent être respectivement considérées comme des produits d'oncogènes ou de suppression des tumeurs.

Ainsi, tel qu'illustré par le gène *ras* codant pour une GTPase et muté dans plusieurs néoplasies, une seule mutation dominante du gène suffit pour transformer un proto-oncogène en oncogène (Pelengaris et al., 2000). Par ailleurs, ceci n'est pas le cas dans le CaP où le gène *ras* demeure un proto-oncogène malgré une augmentation du niveau de la protéine (Konishi et al., 1997). Plusieurs exemples d'amplification de produits de proto-oncogènes sont associés ou encore jouent des rôles possibles dans le CaP. Quelques exemples de ces derniers sont illustrés dans le tableau 2. Au même titre, plusieurs protéines ayant un rôle dans l'adhésion et les interactions cellulaires et jouant un rôle dans

l'acquisition de propriétés d'invasion ont été associées à la progression du CaP et à la dissémination des métastases. Pour ce faire, des cellules de la tumeur primaire doivent envahir le stroma et se joindre à la circulation sanguine pour coloniser des sites éloignés (voir les exemples dans le tableau 2).

Tableau 2. Exemples de protéines et de gènes impliqués dans le CaP

Facteurs et gènes impliqués dans le CaP	Protéines	Observations dans le CaP	Références
Produits d'oncogènes	c-myc	Surexpression dans 30% des métastases	(Karan et al., 2002)
	Bcl2	Surexpression dans le PIN	(Krajewska et al., 1996)
	Récepteur du FC des hépatocytes	Surexpression dans 100% des CaP étudiés	(Pisters et al., 1995)
Gènes suppresseurs de tumeurs	Rb	Mutation dans 42% des CaP avancés	(Konishi et al., 1997)
	P53	Mutation dans 20-25% des CaP avancés	(Bookstein et al., 1993)
	PTEN	Mutation dans plus de 30% des CaP avancés	(Sun et al., 1999)
Facteurs d'adhésion cellulaire	Fak	Surexpression dans CaP invasifs et métastatiques	(Kornberg, 1998)
	C-CAM	Diminution dans le CaP	(Kleinerman et al., 1995)
	KA11	Perte de son expression associée à la progression du CaP	(Dong et al., 1996)

1.5.4. Environnement et diète

Parmi les événements environnementaux augmentant l'incidence du CaP, mentionnons le mode de vie occidental, et plus spécifiquement l'apport d'une diète riche en gras et viande rouge. Ce lien possible entre la diète et le CaP a suscité une vaste étude épidémiologique

impliquant plus d'une trentaine de populations différentes (Whittemore et al., 1995). Parmi les gras, la consommation prononcée d'acide α -linoléique (produits laitiers) entraîne un risque accru de CaP, dû à la production de peroxyde d'hydrogène qui résulte d'une β -oxydation des chaînes d'acides gras (Chan et al., 1998). Par ailleurs, le faible taux d'incidence de CaP chez la population asiatique trouve son explication par une diète à haute teneur en phyto-œstrogènes ou isoflavones (fèves de soya) (Strom et al., 1999). Ceci est aussi appuyé par des études chez des souris athymiques porteuses de tumeurs prostatiques humaines (dérivées de la lignée LNCaP) soumises à une diète riche en protéines de soya (Bylund et al., 2000). Parmi les mécanismes évoqués pour expliquer le mode d'action des œstrogènes diététiques, mentionnons des effets anti-œstrogénique *via* le récepteur des œstrogènes (RE), la diminution de la concentration des androgènes circulants par la liaison des hormones sexuelles à la globuline (SHBG), l'augmentation de l'apoptose ou la régulation de l'angiogenèse (Griffiths K, 1996; Bylund et al., 2000). Un autre élément de la diète, le lycopène présent dans la tomate, est associé à une diminution du taux de risque du CaP en raison du pouvoir anti-oxydant puissant de ce caroténoïde (Giovannucci et al., 2002). Des propriétés anti-oxydantes sont aussi attribuées au sélénium ainsi qu'à la vitamine E (Willis and Wians, 2003). L'incubation des cellules prostatiques humaines cancéreuses avec la sélénométhionine diminue leur prolifération et active les inhibiteurs des cyclines dépendantes des kinases Cip1/p21 et Kip1/p27 (Venkateswaran et al., 2002).

1.5.5. Hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes mâles (ou sexuelles), les androgènes, sont membres d'une super-famille comprenant la vitamine D, l'acide rétinoïque, l'hormone thyroïdienne, les

œstrogènes et progestines, les glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes. Ces hormones, exception faite de l'acide rétinoïque, sont dérivées du cholestérol (figure 6) (Nelson, 2000). Chez l'homme, les androgènes sont principalement régis par un axe de signalisation (Carson, III and Rittmaster, 2003), allant de la synthèse de la testostérone (principalement au niveau des testicules et impliquant aussi la contribution des glandes surrénales) à sa liaison dans la circulation à la SHBG, son entrée sous forme libre dans les cellules prostatiques (seulement environ 2% de la testostérone est libre) (Farnsworth, 1999), son métabolisme en DHT (action de la 5- α -réductase) et sa liaison au RA pour contribuer ainsi que d'autres androgènes à leur survie, croissance, et différenciation (Isaacs, 1984) en régulant l'activation de la transcription de divers gènes. Brièvement, le RA appartient à la famille des récepteurs nucléaires. La structure de ces protéines (illustrée à la figure 7) se compose en C-terminal du domaine, qui permet de lier le ligand, le DHT, les anti-androgènes (par exemple le flutamide) (Culig et al., 1994; Navarro et al., 2002) et celui assurant la liaison de l'ADN. Ce dernier est formé de deux motifs en doigt de zinc qui interagissent avec des séquences spécifiques du promoteur des gènes dépendants des androgènes. La molécule comprend aussi deux régions régulatrices de l'activation de l'activité transcriptionnelle, TAF-1 et TAF-2, par la liaison d'effecteurs et de répresseurs, et qui sont localisés respectivement dans la portion N-terminale et dans la région de liaison de l'ADN (Navarro et al., 2002). L'apport des androgènes est requis pour le développement de la prostate au niveau embryonnaire, sa croissance au moment de la puberté et par la suite, le maintien de sa fonction glandulaire. Il est admis que les androgènes, couplés à plusieurs facteurs génétiques et environnementaux, jouent un rôle dans le développement et la

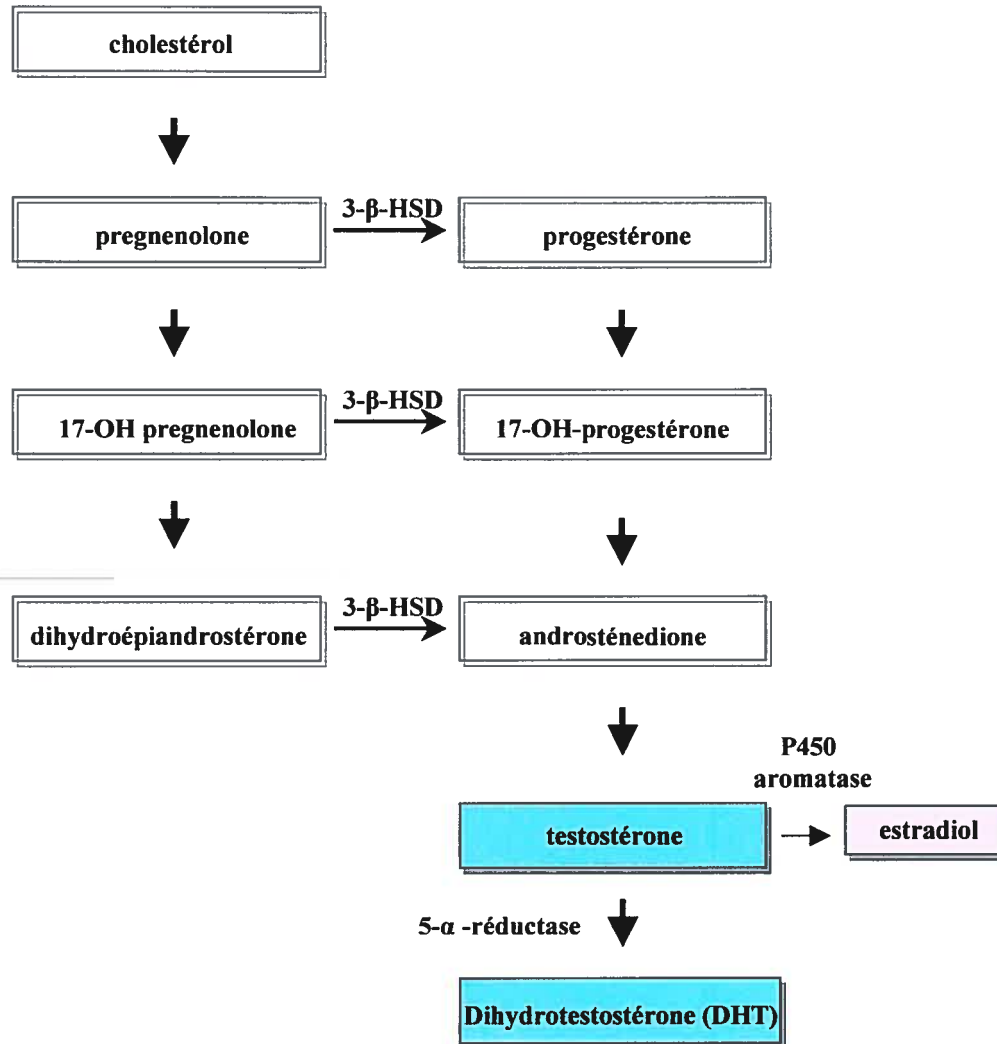


Figure 6. Biosynthèse des stéroïdes sexuels

Le cholestérol est le précurseur de la synthèse des androgènes et des œstrogènes. Sous l'action d'enzymes spécifiques, la testostérone est convertie en estradiol ou en DHT.

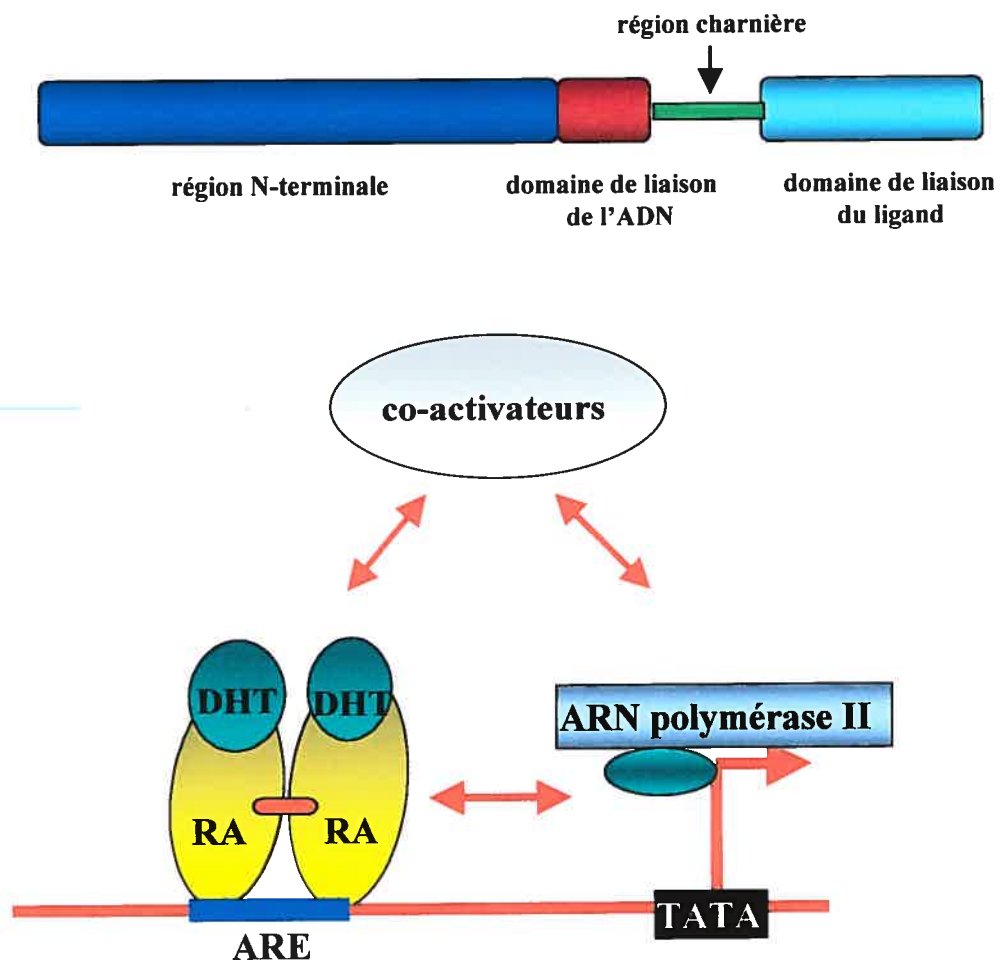


Figure 7. Structure du récepteur des androgènes et modèle d'activation transcriptionnelle

Le RA est composé d'une région N-terminale de composition et longueur variables suivi d'un domaine de liaison à l'ADN très conservé, d'une région charnière et d'un domaine de liaison du ligand hautement conservé. La DHT provenant de la transformation de la testostérone se lie au RA. Après l'activation de ce dernier, le récepteur se transloque dans le noyau où il se lie à l'ADN et active la transcription génique.

progression du CaP. Cependant, malgré de très nombreuses études controversées sur les taux circulants des androgènes, des protéines de liaison et des niveaux intraprostatiques des enzymes de conversion de la testostérone, de la DHT et des RA, les mécanismes ne sont pas parfaitement compris. On croit que les androgènes pourraient agir comme promoteurs de la formation tumorale *via* des mécanismes reliés à l'activation des RA. Ceci est notamment appuyé par la réponse des CaP androgéno-dépendants à la thérapie hormonale. Dans le même ordre d'idée, l'absence de réponse à ces thérapies et la progression vers l'indépendance hormonale, laissent présager une perte des RA. Or, la majorité des tumeurs prostatiques réfractaires aux androgènes expriment le RA à des niveaux supérieurs à ceux retrouvés dans les tumeurs dépendantes des androgènes (Ruizeveld de Winter et al., 1994; Linja et al., 2001). De plus, l'amplification du gène des *RA* a été démontrée chez le tiers des patients présentant des tumeurs réfractaires aux androgènes après leur traitement endocrinien (Linja et al., 2001). La possibilité que les androgènes favorisent la progression du cancer en agissant *via* un RA muté a donc été envisagée. Or dans la plupart des cancers peu avancés, le gène du *RA* est normal (Hakimi et al., 1996). Comme la fréquence des mutations du gène peut atteindre 30% des métastases issues de tumeurs réfractaires aux androgènes (Koivisto and Helin, 1999), ces modifications du RA ne peuvent totalement expliquer la résistance des cellules aux androgènes et leur adaptation à un environnement pauvre en androgènes. Un troisième mécanisme propose que la voie de signalisation du RA demeure active en dépit du blocage de l'activation des RA par les androgènes. Cette activation du sentier de signalisation, indépendante des androgènes, est observée *via* l'augmentation du niveau d'APS, de la kallikréine-2, ainsi que des gènes dépendants des

androgènes dans les tumeurs de CaP avancé (Koivisto et al., 1998; Gregory et al., 1998; Koivisto and Helin, 1999). Elle pourrait s'expliquer d'une part par l'augmentation de la sensibilité de la réponse des RA suite à leur surexpression ainsi que celle de co-activateurs de la transcription (TIF-2 et SRC-1) (Navarro et al., 2002).

Des évidences récentes montrent que les RA peuvent être activés de manière indépendante de la liaison des androgènes par le biais des FC, des neuropeptides, et des cytokines (Sadar et al., 1999; Jenster, 2000). Ceux-ci activent des voies de signalisation impliquant les protéines kinase A (PKA) et des récepteurs de FC avec activité tyrosine kinase (TK). Les RA semblent aussi induire l'activation non génomique des sentiers de signalisation de Src/Raf-1/Erk et ce, dans les cellules LNCaP ainsi que dans les cellules humaines mammaires cancéreuses MCF-7 (Migliaccio et al., 2000; Navarro et al., 2002).

Bien que les œstrogènes soient des joueurs clés du système reproducteur chez la femme, ces hormones sont depuis longtemps pressenties comme étant importantes chez l'homme qui vieillit et dont la production d'androgènes testiculaires décroît. En effet, comme les niveaux d'œstrogènes demeurent constants (Gooren, 1998), il a été proposé que des ratios androgènes/œstrogènes modifiés jouent en faveur d'altérations phénotypiques observées dans la prostate et ce, particulièrement au niveau de la prolifération cellulaire. Il a été montré que le niveau de DHT diminuait dans la zone de transition de la prostate en fonction de l'âge chez l'humain et que le ratio œstrogène/DHT était augmenté favorisant un environnement œstrogénique (Shibata et al., 2000). À cet égard, les effets des œstrogènes sont complexes et réfèrent à des actions directes et indirectes sur le tissu prostatique. Alors que des faibles doses ont peu d'effet sur la croissance des cellules prostatiques, des doses

pharmacologiques inhibent la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires et réduisent ainsi la production des androgènes testiculaires donc le volume de la prostate diminue. Comme cet effet indirect équivaut à une castration chimique (Walsh, 1975), les œstrogènes (Huggins, 1941) sont encore utilisés pour traiter le CaP au stade androgéno-dépendant (Aprikian et al., 1994). À des doses élevées, les œstrogènes stimulent le tissu fibromusculaire et induisent la métaplasie des cellules basales chez différentes espèces animales (Cunha et al., 2001). Par ailleurs, la combinaison des androgènes avec les œstrogènes induit des effets marqués sur la croissance de la prostate tant chez l'humain que le chien (Walsh and Wilson, 1976; DeKlerk et al., 1979). Ceci est significatif puisque ces hormones combinées induisent le CaP chez les rats Noble (Lane et al., 1997; Wang and Wong, 1998). De plus, l'œstradiol induit des lésions pré-cancéreuses ainsi que le CaP chez les chiens âgés normaux (Steiner and Raghov, 2003). Les effets des œstrogènes seraient médiés par la présence de récepteurs des œstrogènes α (ER α) et β (Er β ; clonés à partir d'une banque d'ADNc de prostate de rat) (Kuiper et al., 1996), tous deux exprimés tant dans le stroma que dans la partie épithéliale de la prostate humaine (Mosselman et al., 1996; Linja et al., 2003) de même que dans les tumeurs et les lignées cancéreuses humaines (Ehara et al., 1995; Allard et al., 2000b). Toutefois, leurs rôles exacts dans la biologie de la cellule prostatique normale et cancéreuse ne sont pas complètement élucidés.

1.5.6. Facteurs de croissance

Les premières évidences de l'implication des FC dans la croissance des cellules prostatiques normales et cancéreuses sont d'abord venues d'études, dont celles du laboratoire d'accueil, montrant l'absence d'effets directs des stéroïdes sexuels *in vitro* alors

que les cellules prostatiques proliféraient activement en présence de sérum ou divers extraits de tissus (Chevalier et al., 1984; Sherwood et al., 1998; Igawa et al., 2003). Depuis, la recherche sur les FC a permis de classifier plusieurs composés qui agissent comme régulateurs positifs ou négatifs de la croissance cellulaire dans son sens large comme FC, i.e. qu'ils contrôlent la survie, la prolifération, et la différenciation des cellules et assurent un équilibre relatif par rapport à la mort cellulaire. Dans le tissu prostatique et les tumeurs, les effets des FC s'exercent par des boucles d'action autocrine et paracrine entre les cellules du stroma et de l'épithélium et ce, mis à part le cas des cellules NE, sans distinguer les sous-types de cellules épithéliales (Chevalier, 1996). Le tableau 3 présente de façon succincte les membres impliqués dans le CaP.

Les FC se lient à des récepteurs spécifiques transmembranaires qui transmettent leur signal biologique *via* l'activation des protéines kinases. La phosphorylation de ces dernières crée des sites d'ancrage permettant le recrutement et l'activation d'autres protéines. L'amplification et la propagation du signal se poursuivent ainsi jusqu'aux facteurs de transcription nucléaires qui sont alors phosphorylés et activent les gènes reliés à la prolifération cellulaire. Les TK sont divisées en deux groupes selon leurs caractéristiques structurales. Il y a les TK de type récepteur et de type non-récepteur. Ce dernier groupe se caractérise par l'absence de deux domaines, soit la portion extracellulaire permettant la reconnaissance des ligands peptidiques et la région transmembranaire (Cantley et al., 1991; Porter and Vaillancourt, 1998). Les TK possèdent un domaine catalytique dont la structure est hautement conservée dans les deux groupes. Celui-ci permet le transfert d'un groupe phosphate de type gamma de l'ATP sur les groupements hydroxyles de résidus tyrosine

spécifiques de leurs substrats peptidiques. De plus, le domaine kinase contient un site spécifique de liaison de l'ATP conduisant à l'autophosphorylation du récepteur. La modification de la signalisation intracellulaire des TK conséquemment à leur surexpression, leur activation constitutive ou la présence de mutations entraîne des troubles physiologiques reliés à la prolifération et suggère que ces TK participent à la progression tumorale. Les tableaux 4 et 5 regroupent les principales TK impliquées dans le CaP.

Plus spécifiquement, mentionnons que des études dans le laboratoire d'accueil ont permis de montrer que le récepteur Flt-1 était activé par le VEGF-A entraînant la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK) et la stimulation de la motilité de ces cellules. Ceci suggère donc un rôle additionnel du VEGF dans la progression du CaP (Chevalier et al., 2002). La tyrosine kinase de type non récepteur Fer (tableau 5) a été étudiée dans le contexte du CaP montrant qu'elle a un rôle dans la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses et dans la régulation de la forme cellulaire. De plus, son expression est augmentée dans les lignées cancéreuses humaines, les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire et les cellules basales métaplasiques suite à un traitement aux œstrogènes après castration chez le chien (Allard et al., 2000b).

Comme chacune des familles a ses caractéristiques propres et a fait l'objet de nombreuses études, nous limiterons la revue de la littérature à la famille du TGF- β , ses récepteurs, les protéines kinases à activité sur résidus sérine et thréonine, de même qu'aux aspects moléculaires de la régulation de certaines fonctions cellulaires en mettant l'emphase sur le cytosquelette et notamment les microtubules.

Tableau 3. Principaux facteurs de croissance impliqués dans la prostate

Facteurs de croissance	Production ou localisation	Rôle dans la prostate normale <i>in vitro</i>	Rôle dans le CaP	Références
IGF 1	Stroma	Action paracrine sur les cellules épithéliales (croissance et différenciation)	Action autocrine avec expression dans les cellules tumorales	(Macaulay, 1992).
EGF	Épithéliales	Croissance	Favorise la formation des métastases et l'invasion	(Cronauer et al., 1997)
TGF α	Stroma	Action paracrine sur le récepteur de l'EGF dans les cellules épithéliales (croissance)	Production autocrine dans les cellules tumorales	(Fowler, Jr. et al., 1988; Harper et al., 1993), Peehl et al., 1989)
FGF	Stroma	Action autocrine dans le stroma (croissance)	Production autocrine dans les cellules tumorales, favorise la formation des métastases	(Yan et al., 1993)
KGF	Stroma et épithéliales	Facteur paracrine contribuant à l'action des androgènes	Production autocrine dans les cellules tumorales	(McGarvey and Stearns, 1995)
PDGF	PDGF α dans le stroma (CaP, cellules tumorales)	Faible expression	Expression du PDGFR augmentée	(Fudge et al., 1994).
VEGF	Cellules épithéliales et NE	Expression dans les cellules basales	Favorise la progression du CaP <i>via</i> le VEGFR-2 de manière autocrine et paracrine	(Jackson et al., 1997; Campbell et al., 1999; Borre et al., 2000; Chevalier et al., 2002)
Cytokines* Produits des cellules NE*				
TGF β	Stromales	Apoptose, croissance des cellules stromales; inhibition de la croissance des cellules épithéliales	Expression augmentée, inhibition de la croissance des cellules tumorales; favorise les métastases/ invasion	(Steiner et al., 1994; Thompson et al., 1992; Truong et al., 1993; Perry et al., 1997)

* Les principales cytokines impliquées dans le CaP sont l'interféron α et γ , l'interleukine 1 et 6 (Smith et al., 2001; Shou et al., 2002) alors que les principaux produits des cellules NE comprennent le peptide de la relâche de gastrine (GRP), l'hormone de stimulation thyroïdienne, l'hormone parathyroïdienne, la calcitonine ainsi que la sérotonine (Noordzij et al., 1995; di Sant'Agnese and Cockett, 1996; Aprikian et al., 1997).

Tableau 4. Exemples de récepteurs des facteurs de croissance impliqués dans le CaP

Récepteur TK	Implication dans le CaP	Références
EGFR	Utilisation d'anticorps chimérique bloquant le EGFR; induit un effet anti-tumoral	(Goldstein et al., 1995)
IGF-1R	Expression augmentée dans les cellules PC-3; rôle dans la progression du CaP	(Iwamura et al., 1993)
VEGFR, FGF-R, PDGF-R	Surexpression dans le CaP; prolifération cellulaire	(Yan et al., 1993)

Tableau 5. Liste des des tyrosines kinases de type non récepteur impliquées dans le cancer de la prostate

Famille	Membre	Implication dans le CaP	Références
Src	Src	↓ migration des cellules via l'utilisation d'un inhibiteur de src	(Slack et al., 2001)
		interaction src avec une protéine p110 <i>via</i> la bombésine	(Allard et al., 2000a)
	yes	expression dans les tumeurs	(Robinson et al., 1996)
	lck	expression dans les tumeurs	(Robinson et al., 1996)
Abl	abl	impliqué dans l'apoptose induite par l'irradiation γ des cellules	(Bowen et al., 2002)
Fes	fer	prolifération des cellules et régulation de la forme cellulaire	(Allard et al., 2000a)
Fak	fak	rôle dans la progression du cancer ↑ de l'expression et de son association avec la paxilline et la csk	(Tremblay et al., 1996) (Rovin et al., 2002)

1.6. Le TGF β

La superfamille du TGF β est composée d'au moins 35 membres chez les vertébrés. La famille se subdivise en deux branches: 1-celle des BMP (protéines morphogéniques de l'os)/GDF (facteurs de croissance et de différenciation); 2-celle des TGF β /activine/facteur nodal (Chang et al., 2002). Le TGF β lui-même a d'abord été décrit comme étant un facteur de stimulation de la croissance de fibroblastes en agar mou (Sporn and Roberts, 1992). Il existe maintenant cinq isoformes du TGF β (TGF β 1-5) et seuls les TGF β -1, 2 et 3 sont exprimés chez les mammifères. Le TGF β est biologiquement inactif dû à la présence d'une pro-région dite peptide de latence (LAP). Il est d'abord sécrété sous la forme d'un complexe (figure 8) (Gentry et al., 1988). Lors de la sécrétion, le LAP est clivé par une endoprotéase de type furine mais demeure lié au TGF β toujours inactif par des liens non covalents (Dubois et al., 1995). Par la suite, des protéines de liaison du TGF β , identifiées sous le nom de LTBP (membres des protéines de la matrice extracellulaire de type fibrilline), s'associent au complexe TGF β -LAP pour former un plus grand complexe (Miyazono et al., 1991). Les protéines LTBP sont nécessaires pour assurer une conformation adéquate du TGF β sécrété, qui peut être déposé dans la matrice extracellulaire *via* le LTBP et libéré au besoin par des protéases de type sérine (Koli et al., 2001). Finalement, le TGF β est activé par la dissociation du LAP régulée par la thrombospondine 1 ou l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ (figure 8) (Schultz-Cherry et al., 1994; Dubois et al., 1995; Munger et al., 1999).

Les membres de la famille du TGF β exercent de nombreuses fonctions et effets biologiques *via* des récepteurs transmembranaires dits de types I et II se distinguant par leurs propriétés

intracellulaire

extracellulaire

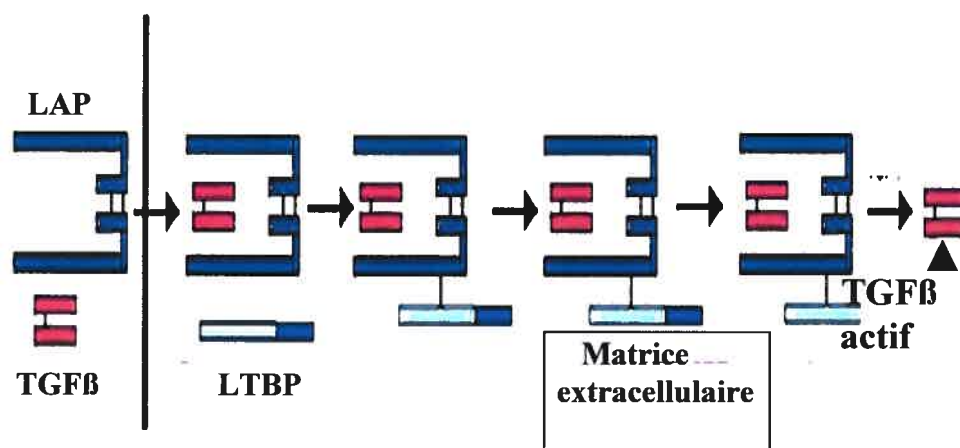


Figure 8. Mécanisme de régulation de l'activité biologique du TGF- β

Tirée et adaptée de Tabibzadeh, 2002.

structurales et fonctionnelles et tous deux dotés d'activité kinasique phosphorylant les résidus sérine/thréonine (S/TK) (Chang et al., 2002). De manière générale, les effets dépendent du type cellulaire, de leur stade de différenciation et de la présence d'autres FC et hormones (Sporn and Roberts, 1992). Plus spécifiquement, le TGF- β 1 peut agir comme facteur de stimulation de la croissance des cellules mésenchymateuses ou des fibroblastes alors qu'il exerce un effet inhibiteur sur les cellules épithéliales (Wenner and Yan, 2003), notamment prostatiques. Chez le rat, le TGF β contrecarre l'effet endogène des androgènes sur la croissance prostatique et provoque l'apoptose des cellules de l'épithélium différencié (Martikainen et al., 1990). Aussi, contrairement à la plupart des autres FC, le TGF β inhibe la prolifération des cellules épithéliales de la prostate *in vitro* et peut induire leur apoptose (Sutkowski et al., 1992; Story et al., 1993; Danielpour et al., 1994). Ces résultats d'inhibition semblent paradoxaux considérant les augmentations observées des niveaux sériques du TGF- β 1 chez les patients, corrélant avec le volume tumoral, les niveaux d'APS, la présence de métastases (Adler et al., 1999) et l'expression accrue du TGF- β 1 dans les tissus prostatiques cancéreux (Thompson et al., 1992; Truong et al., 1993; Steiner et al., 1994; Perry et al., 1997). À cet égard, les observations montrant la présence des récepteurs I et II et d'un de ses récepteurs accessoires, l'endogline (voir section 1.6.1.1), dans l'endothélium des néo-vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs appuient un rôle du TGF β dans la progression du CaP (Wikstrom et al., 1998). De tels effets sur les vaisseaux peuvent favoriser la dissémination des métastases d'autant plus que la réponse immunitaire de l'hôte contre les cellules tumorales prostatiques est supprimée (Teicher, 2001). Le TGF- β 1 augmente aussi la production de métalloprotéases qui favorisent la dégradation de la

matrice extracellulaire et stimulent les interactions entre les cellules cancéreuses et les ostéoblastes (Sehgal et al., 1996; Kostenuik et al., 1997). Quant aux cellules cancéreuses, elles verraient leur sensibilité à l'effet inhibiteur du TGF- β 1 altérée par la perte de récepteurs I et II, tel que fréquemment observée dans les CaP (Williams et al., 1996; Guo et al., 1997; Kim et al., 1998; Wikstrom et al., 1998) et associée à un mauvais pronostic (Kim et al., 1998). Le récepteur de type I est absent des cellules LNCaP, une lignée humaine du CaP qui est sensible aux androgènes (Kim et al., 1996). Dans ces cellules, la transfection de l'ADNc du récepteur I restaure l'effet inhibiteur du TGF- β 1 sur leur prolifération (Kim et al., 1996). Dans les tumeurs prostatiques de rat Dunning AT-3 et MatLyLu, c'est le récepteur II qui est supprimé alors que les cellules surexpriment le TGF- β 1 (Wikstrom et al., 1999). L'introduction d'un dominant négatif du récepteur II dans les cellules normales épithéliales de la prostate de rat induit leur transformation maligne (Tang et al., 1999). Il est suggéré que ce récepteur puisse agir comme suppresseur de tumeur prostatique. Des évidences *in vitro* suggèrent que la non-réponse des cellules cancéreuses prostatiques au TGF β s'explique par l'absence de régulation négative de la cycline Cdk2 à la phase G1/S du cycle cellulaire (Cipriano and Chen, 1998), impliquant donc que des molécules de signalisation en aval du système récepteur du TGF- β 1 peuvent modifier son effet biologique (Brodin et al., 1999).

1.6.1. Récepteurs du TGF β

La famille des récepteurs du TGF β comprend 12 membres dont 7 sont du type I et 5 du type II (Manning et al., 2002). Ces derniers sont des S/TK dont la structure comprend en N-terminal un domaine extracellulaire pour la liaison du ligand, suivi d'une portion trans-

membranaire et du domaine kinasique en C-terminal. Le récepteur de type I possède un motif particulier hautement conservé adjacent au domaine kinase, nommé GS (TTSGSGSG) (Wrana et al., 1994), qui forme une boucle hélicoïdale contenant les sites qui seront phosphorylés suite à la liaison du ligand au récepteur II (figure 9). Ceci induit un changement de conformation du domaine kinasique permettant la formation d'un complexe avec le récepteur I et la transformation du site de liaison de la molécule inhibitrice FKBP12 en un site de liaison pour les protéines effectrices Smads phosphorylées par le récepteur I. Ces dernières propagent alors le signal jusqu'au noyau (Huse et al., 2001) (figure 10).

L'activation des complexes TGF β -récepteurs est régulée par différentes protéines, qui soit inhibent la liaison du ligand au récepteur alors que d'autres la facilitent. La décorine, l'alpha 2-macroglobuline, la pro-région du précurseur du TGF β séquestrent le TGF β (Shi and Massague, 2003), contrairement au betaglycan, un récepteur membranaire accessoire qui facilite sa liaison (plus particulièrement l'isoforme β 2) au récepteur II (Massague, 1998; Brown et al., 1999). Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) augmente l'affinité de liaison du TGF β aux complexes récepteurs (Abreu et al., 2002). L'endogline (description à la section 1.6.1.1), une protéine membranaire qui partage des similarités structurales et fonctionnelles avec le betaglycan, est aussi considérée comme étant un récepteur accessoire pour certains membres de la famille du TGF β (Cheifetz et al., 1992). Finalement, des protéines intracellulaires, telles FKBP12 (Huse et al., 1999) et les Smads inhibitrices, contrôlent aussi l'activation de ces récepteurs (Shi and Massague, 2003).

De manière générale, les protéines Smads agissent comme protéines effectrices et régulatrices de la transmission directe du signal du TGF β jusqu'au noyau (figure 10).

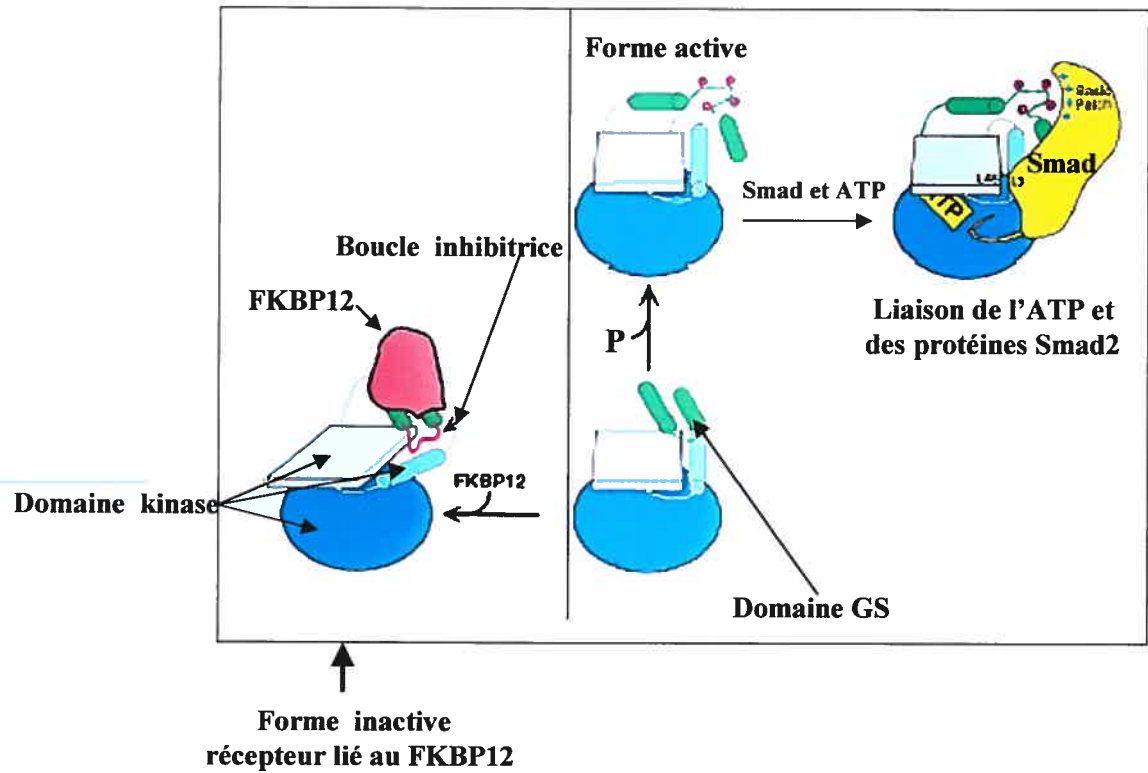


Figure 9. Modèle d'activation du récepteur I du TGF β

Le récepteur I dans sa conformation inactive est lié à la protéine FKBP12. Suite à la liaison du ligand au récepteur II et l'activation du récepteur I par phosphorylation (P), le récepteur I adopte une nouvelle conformation créant un site de liaison pour les protéines Smad. Adaptée de Huse et al., 2001.

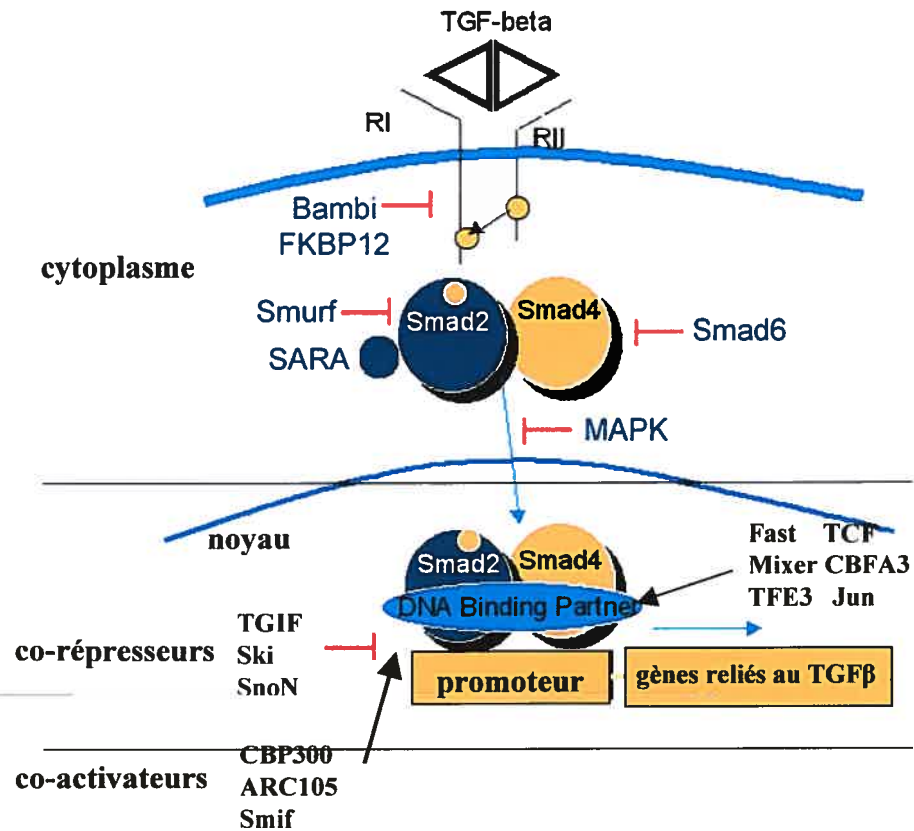


Figure 10. Schéma simplifié de la voie de signalisation du TGFβ

La liaison du TGFβ au récepteur II induit la phosphorylation du récepteur I qui active les protéines Smad qui se dissocient du complexe récepteur et s'associent à Smad4 pour être transporté dans le noyau. Ces complexes activent la transcription des gènes liés au TGFβ *via* des protéines associées à l'ADN. Tirée et adaptée de Tabibzadeh, 2000.

Brièvement, les Smad 2 et 3 interagissent avec les récepteurs et sont phosphorylées par le récepteur I activé. Ces interactions protéiques sont facilitées par des protéines auxiliaires, en l'occurrence SARA, Disabled-2, axin, ELFB-spectrin (Hocevar et al., 2001; Furuhashi et al., 2001; Tang et al., 2003). Les mécanismes moléculaires régissant ces interactions ne sont que partiellement connues mais à titre d'exemple, la phosphorylation des Smad par le récepteur I les libère de SARA, ce qui expose les motifs de liaison à Smad, assure le transport nucléaire du complexe et l'assemblage des complexes transcriptionnels dans le noyau. Ces derniers se lient à l'ADN *via* un élément spécifique de liaison Smad (SBE) (Xu et al., 2000). Ceci implique aussi des interactions des Smads avec des cofacteurs de liaison à l'ADN tels FAST, Mixer, TFE3, Jun, TCF, CBFA3 (Derynck et al., 1998; Massague et al., 2000), de même que des co-activateurs (CBP, p300, ARC105, Smif) et co-répresseurs (TGIF, Ski, SnoN) (figure 10) (Derynck et al., 1998; Massague and Wotton, 2000; Kato et al., 2002; Bai et al., 2002).

Au départ, la voie de signalisation du TGF β depuis ses récepteurs membranaires à l'activation de la transcription de gènes paraissait simple et directe. Or la démonstration de récepteurs accessoires, l'endogline et le betaglycan, de même que l'activation parallèle d'autres protéines kinases, nouvelles ou encore souvent activées par différents médiateurs de diverses voies de signalisation a grandement modifié la situation. Tel que démontré par le laboratoire d'accueil (Atfi et al., 1994), l'action inhibitrice du TGF β sur les lignées de cellules prostatiques cancéreuses humaines PC-3 et DU-145 se traduit par une diminution des niveaux des protéine tyrosine kinases (TK) src et lyn et de leur activité enzymatique, couplée à l'altération des niveaux des complexes de signalisation entre les protéines

adaptatrices SHC et Grb2 et l'activation d'une protéine kinase de type sérine/thréonine (S/TK) de 78 kiloDalton (kDa) distincte du récepteur II (Atfi et al., 1995). La kinase JNK de la famille de MAK (*mitogen activated kinase*) a aussi été reliée à l'action apoptotique du TGF β (Mazars et al., 2000). Ceci nous amène à revoir la littérature sur l'endogline, objet de la première section des travaux de cette thèse, et l'implication des kinases dans les mécanismes régulant les fonctions de cellules prostatiques (seconde partie des travaux).

1.6.1.1. Endogline

L'endogline est une protéine homodimérique de 180 kDa dont la portion transmembranaire et intracellulaire possède 71% d'homologie avec le betaglycan (Cheifetz et al., 1992). Elle a d'abord été identifiée dans des cellules leucémiques de type pré B nommées HOON (Quackenbush and Letarte, 1985) par immuno-affinité en utilisant un anticorps 44G4 dirigé contre les antigènes de la surface cellulaire. Son activité à titre de récepteur accessoire du TGF β se manifeste par sa capacité de lier les isoformes 1 et 3 du TGF β ainsi que l'activine-A, le BMP-2 et le BMP-7 (Cheifetz et al., 1992; Letamendia et al., 1998; Barbara et al., 1999).

L'importance de l'endogline a été soulevée par la découverte de mutations du gène identifié sur le chromosome 9q34 (Fernandez-Ruiz et al., 1993) et provoquant la télangiectasie hémorragique de type 1 chez l'humain. Cette maladie est un désordre autosomique dominant qui se caractérise par une dysplasie vasculaire multisystémique et des hémorragies récurrentes associées à des malformations artérioveineuses de la peau, des muqueuses, et des viscères (Haitjema et al., 1996). Ce gène est critique au niveau

développemental puisque son inactivation chez la souris cause rapidement des malformations cardiaques et vasculaires et conduit à la mort des embryons (Li et al., 1999; Arthur et al., 2000). Ces mutations affectent principalement la portion extracellulaire de l'endogline et génèrent des faibles concentrations de protéines tronquées (McAllister et al., 1994; Pece-Barbara et al., 1999; Paquet et al., 2001) qui ne peuvent se lier au complexe récepteur du TGF β .

Plusieurs observations immunohistologiques de l'endogline dans des tissus où de nouveaux vaisseaux sont formés, notamment dans les tumeurs, ont montré son association avec l'angiogenèse, correspondant à une augmentation substantielle de son expression dans les cellules endothéliales. Des études avec des modèles *in vitro* sont venues appuyer ce rôle de l'endogline: la suppression de son expression par des oligodésoxynucléotides (ODN) anti-sens dans les cellules endothéliales HUVEC résulte en une diminution importante de l'angiogenèse (Li et al., 2000). À cet égard, l'endogline est de plus en plus utilisée comme marqueur de densité des micro-vaisseaux et se compare avantageusement aux autres marqueurs pan-endothélial connus, tels le CD34, le CD31 ou le facteur de Willebrand (Kumar et al., 1999; Brewer et al., 2000; Tanaka et al., 2001) comme indicateur pour l'établissement du pronostic de survie dans différents cancers, les patients ayant une densité élevée présentant un taux de survie très court (Srivastava et al., 1988; Horak et al., 1992; Tanigawa et al., 1997). L'indice obtenu pour l'endogline des micro-vaisseaux des tumeurs prostatiques semble démontrer une plus grande spécificité que le facteur von Willebrand et corrèle avec l'immunoréactivité du TGF β dans les cellules tumorales, la somme de Gleason, l'indice de formation de métastases et la survie (Wikstrom et al., 2002).

En plus des cellules endothéliales des vaisseaux (capillaires, artérioles, veinules), l'endogline est exprimée ou détectée dans les cellules stromales et myéloïdes, les macrophages de plusieurs tissus, les pré-érythroblastes, et les syncytiotrophoblastes du placenta à terme (Quackenbush and Letarte, 1985; Gougos and Letarte, 1988; Gougos and Letarte, 1990). Par ailleurs, l'endogline est généralement absente des cellules épithéliales bien que la protéine ait été détectée dans certaines lignées cellulaires et cancers d'origine épithéliale. Ainsi, la lignée HEY dérivée d'un cancer ovarien, les cellules de mélanomes malins et les lignées prostatiques, PC-3, DU-145 et LNCaP (Jindal et al., 1995; Rokhlin and Cohen, 1995; Altomonte et al., 1996; Liu et al., 2002). Le transcrit serait aussi exprimé dans les cellules PC-3M (Liu et al., 2002).

Au niveau moléculaire, l'endogline contient dans sa portion extracellulaire un motif RGD défini par les acides aminés Arg-Gly-Asp qui lie les intégrines (Altomonte et al., 1996; Gougos and Letarte, 1990). Il est aussi retrouvé dans certaines protéines de la matrice extracellulaire dont la fibronectine (Witkowski et al., 1993). Deux isoformes de l'endogline ont été caractérisées, une forme longue L-CD105 contenant 633 acides aminés dont 47 dans la queue cytoplasmique et une forme courte S-CD105 avec 600 acides aminés et 14 résidus dans la portion cytoplasmique (Bellon et al., 1993). On ignore toujours la fonction physiologique de la forme courte.

L'expression de l'endogline à la surface des cellules influence la signalisation médiée par les récepteurs du TGF β et module les effets du TGF β . À titre d'exemples, soulignons ses effets antagonistes puisque la surexpression de l'endogline: 1-inhibe la stimulation de la synthèse de la fibronectine et de l'adhésion cellulaire dépendante de la fibronectine induits

par le TGF β ; 2-inhibe la phosphorylation du récepteur d'adhésion PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) (Lastres et al., 1996); 3-contrecarre l'effet inhibiteur du TGF β sur la prolifération des cellules pro-monocytes U-937 et l'atténue dans les myoblastes de rat où elle affecte aussi la synthèse de l'activateur du plasminogène. Dans ce modèle, la transfection de l'ADNc du betaglycan qui peut lier les isoformes 1, 2 et 3 du TGF β et présenter le ligand au récepteur de type II en formant un complexe ternaire de haute affinité (Letamendia et al., 1998), a des effets inverses, i.e. l'effet du TGF β sur la prolifération des myoblastes et la synthèse de l'inhibiteur de l'urokinase est augmenté (Letamendia et al., 1998). Ces résultats suggèrent que les récepteurs accessoires du TGF β exercent des rôles distincts. Le betaglycan augmente l'affinité de liaison des isoformes du TGF β au récepteur II. Tel que démontré dans les cellules myoblastiques L₆E₉, ceci touche plus particulièrement la forme β 2. En effet, la présence de betaglycan dans ces cellules a pour effet d'augmenter l'affinité de liaison du TGF- β 2 à un niveau similaire des autres isoformes (Massague et al., 1990). Ceci se traduit par un potentiel d'inhibition de la prolifération cellulaire similaire à celui du TGF- β 1 (Lopez-Casillas et al., 1991; Zentella and Massague, 1992). Quelques exemples de la co-existence de l'endogline et du betaglycan a été rapportée dans certains types cellulaires (Cheifetz et al., 1986; Segarini et al., 1989; Massague et al., 1990; Wong et al., 2000).

L'endogline a des effets agonistes de l'action du TGF β , notamment dans les cellules de mélanomes où l'expression de l'endogline augmente l'effet inhibiteur du TGF β sur leur prolifération, en comparaison de cellules n'exprimant pas l'endogline (Altomonte et al., 1996). Elle aurait aussi ses effets propres puisque des études récentes sur les cellules PC-

3M dérivées de la lignée prostatique parentale PC-3 ont montré que sa surexpression *in vitro* augmente l'adhésion et diminue la migration et la capacité d'invasion de ces cellules (Liu et al., 2002). L'endogline est phosphorylée de façon constitutive, principalement sur ses résidus Ser et Thr, dans les cellules endothéliales. Comme son niveau de phosphorylation diminue suite à la liaison du TGF β au récepteur II (Lastres et al., 1994), ceci indique que l'endogline est sujette à l'action de protéines kinases et notamment des récepteurs du TGF β . Ainsi, un modèle de signalisation impliquant l'endogline a récemment été proposé. La figure 11 montre les interactions de l'endogline avec les récepteurs I et II du TGF β où la liaison de l'endogline aux récepteurs I et II est reliée à l'état de phosphorylation des récepteurs. Le récepteur I interagit avec l'endogline lorsque son domaine kinase est inactif. Quant au récepteur II, l'endogline s'y associe indépendamment de son état de phosphorylation. Faisant suite à cette association, les récepteurs I et II phosphorylent le domaine cytoplasmique de l'endogline et seul le récepteur I se dissocie du complexe récepteur pour activer les molécules effectrices. Il a été montré que l'expression de l'endogline augmente la phosphorylation du récepteur I qui active par la suite les phosphorylations des diverses molécules effectrices résultant en la transcription des gènes reliés à cette voie de signalisation (Duff et al., 2003).

1.7. Fonctions cellulaires

Compte tenu des effets du TGF β sur la prolifération des cellules prostatiques ainsi que du contexte dans lequel nous avons étudié l'activation de la kinase c-tak1, revoyons brièvement les mécanismes régulant le cycle cellulaire ainsi que ceux causant la mort des cellules.

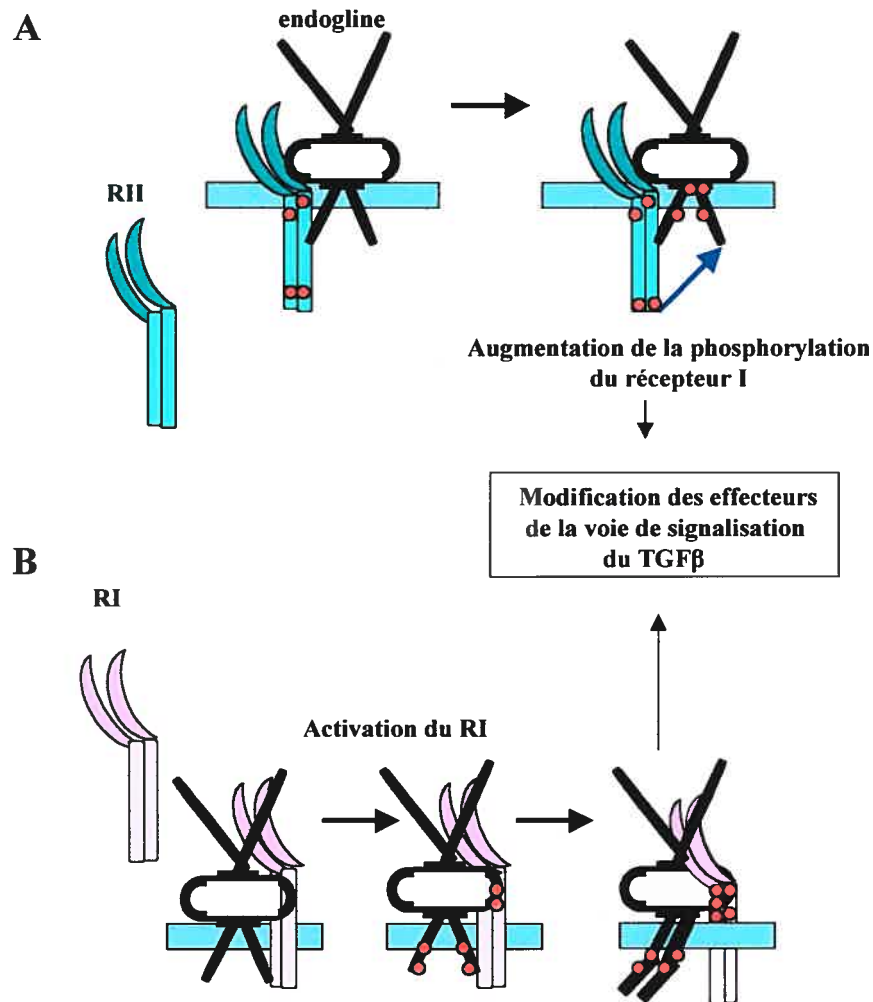


Figure 11. Modèle d'interaction de l'endogline

A) L'endogline s'associe avec le récepteur II et est phosphorylée par ce dernier. L'association récepteur II-endogline résulte en l'augmentation de la phosphorylation du récepteur I qui à son tour active les molécules effectrices. B) D'autre part, l'endogline peut aussi s'associer au récepteur I, ce dernier la phosphoryle causant la dissociation de la portion cytoplasmique de l'endogline du récepteur. Tirée et adaptée de Guerrero-Esteo et al., 2002.

1.7.1. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus fondamental qui assure le développement, la croissance et la réparation tissulaire (voir figure 12). Essentiellement, il se divise en 5 phases différentes: 1-G₀, une phase de quiescence; 2-G₁-correspondant à la synthèse des protéines nécessaires pour la réplication de l'ADN; 3-S-la synthèse de l'ADN proprement dite; 4-G₂-correspondant à la synthèse des protéines nécessaires pour la division cellulaire; et 5-M-pour mitose ou division du matériel nucléaire et générant deux cellules filles. Chacune des phases est régulée par différentes familles de protéines, soient: 1-les cyclines; 2-les protéines kinases dépendantes des cyclines (Cdk); 3-les cyclines inhibitrices des Cdk (CdkI); 4-la protéine kinase Wee qui inhibe les Cdk *via* la phosphorylation de leurs résidus Thr 14 et Tyr 15; 5-la phosphatase Cdc25C qui active les Cdk par leur déphosphorylation sur leurs résidus Thr 14 et Tyr15 et finalement; 6-les protéines kinases qui activent les Cdk (CAK) *via* leur phosphorylation sur Thr 161 ou Thr 172. Chaque phase du cycle est caractérisée par la présence d'une unité régulatrice soit la cycline D, E, A ou B (figure 12A) à laquelle s'associe une Cdk (figure 12B). Le complexe cycline-Cdk phosphoryle à son tour des protéines cibles qui assurent la complétion de la phase du cycle. Par la suite, la cycline subit des phosphorylations sélectives reconnues par le système de dégradation de l'ubiquitine/protéasome. Une autre boucle de régulation des Cdk est assurée par la phosphorylation spécifique induite par la CAK ainsi que par les CdkIs. La kinase Wee joue un rôle d'inactivation des Cdk contrairement à la protéine Cdc25C qui les activent par son activité phosphatase. Le groupe des CdkIs se subdivisent en deux familles, Cip1/Kip et

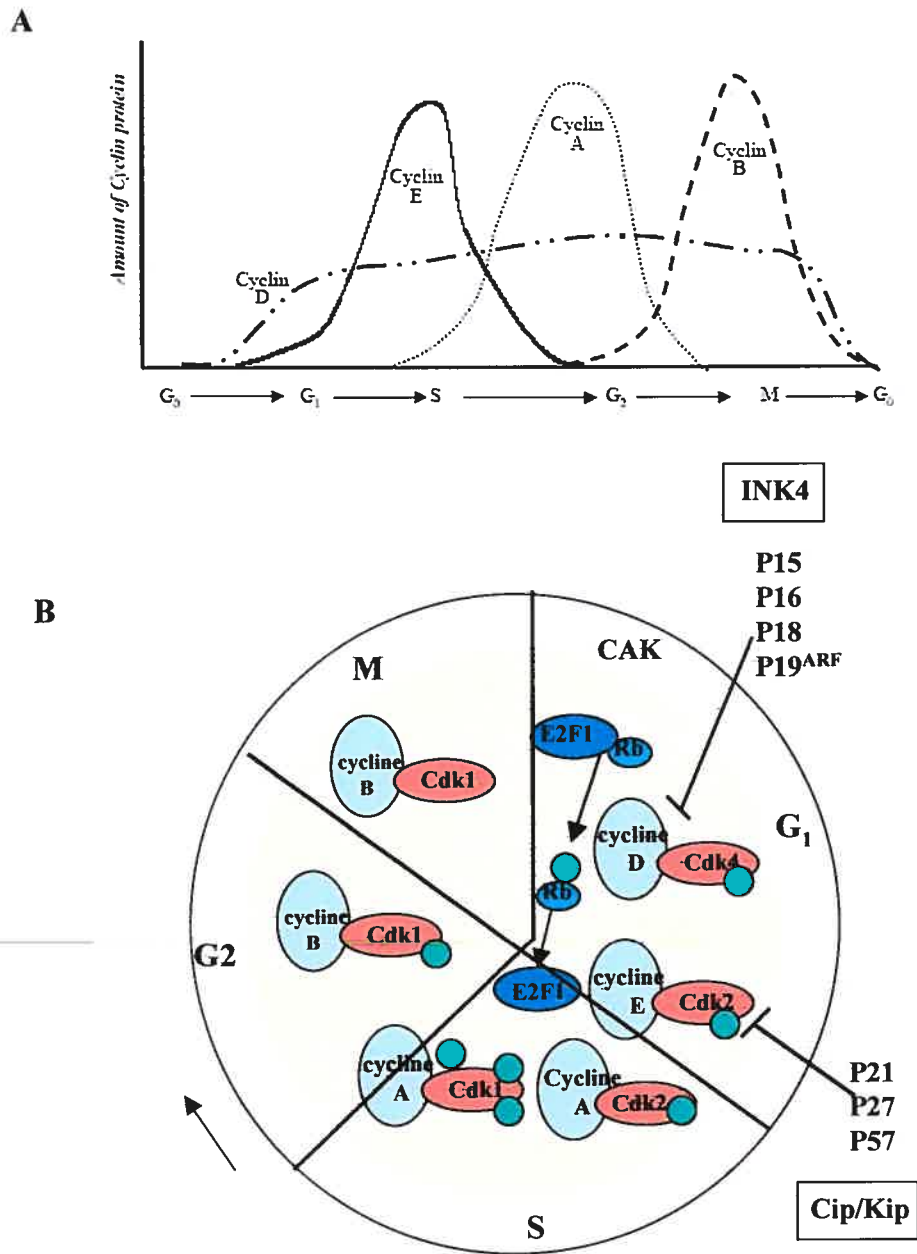


Figure 12. Schéma simplifié du cycle cellulaire

A) Répartition des différentes cyclines durant le cycle cellulaire. B) Les différents niveaux de régulation des phases du cycle cellulaire. La phosphorylation des protéines kinases est illustrée par les cercles verts. Les points de surveillance sont omis. Tirée et adaptée du site web www.cellphysiology.com/chapters/text/8part2.html.

INK4. Ces protéines sont activées en réponse à des cytokines, au TGF β et au facteur tumoral nécrosant α (TNF- α). Plus particulièrement, la famille des INK4 (p15, p16, p18, p19) cible uniquement l'inhibition du complexe cycline/Cdk relié à la phase G1. Les protéines p21, p27 et p57 de la famille des Cip/Kip peuvent inactiver tous les complexes cycline/Cdk (figure 12) (Woo and Poon, 2003).

1.7.2. Mort cellulaire

Les principaux mécanismes causant la mort cellulaire tel qu'initié par divers stimuli autant intracellulaires qu'extracellulaires sont l'apoptose et la nécrose, la première se définissant comme étant une mort génétiquement programmée alors que la nécrose consiste en un évènement pathologique sans régulation ayant comme caractéristique importante la perte de l'intégrité membranaire. Le déclenchement de l'apoptose induit des changements morphologiques notables: les cellules deviennent plus petites, elles développent des ballonnements dans leur pourtour membranaire, la chromatine et les protéines nucléaires se dégradent. Du point de vue biochimique, l'initiation de l'apoptose correspond à l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire et le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie (Hersey and Zhang, 2003). Les voies empruntées sont dites: 1-intrinsèque impliquant l'activation de la protéine Apaf-1 et les caspases initiatrices 2 et 9; et 2-extrinsèque, sollicitant les récepteurs transmembranaires de la mort FasL et TNF et les caspases initiatrices 8 et 10 (voir figure 13). Une troisième voie a été décrite, elle est indépendante des caspases et menée par la molécule AIF qui se lie à l'ADN et provoque sa destruction (Cande et al., 2002; Hersey and Zhang, 2003).

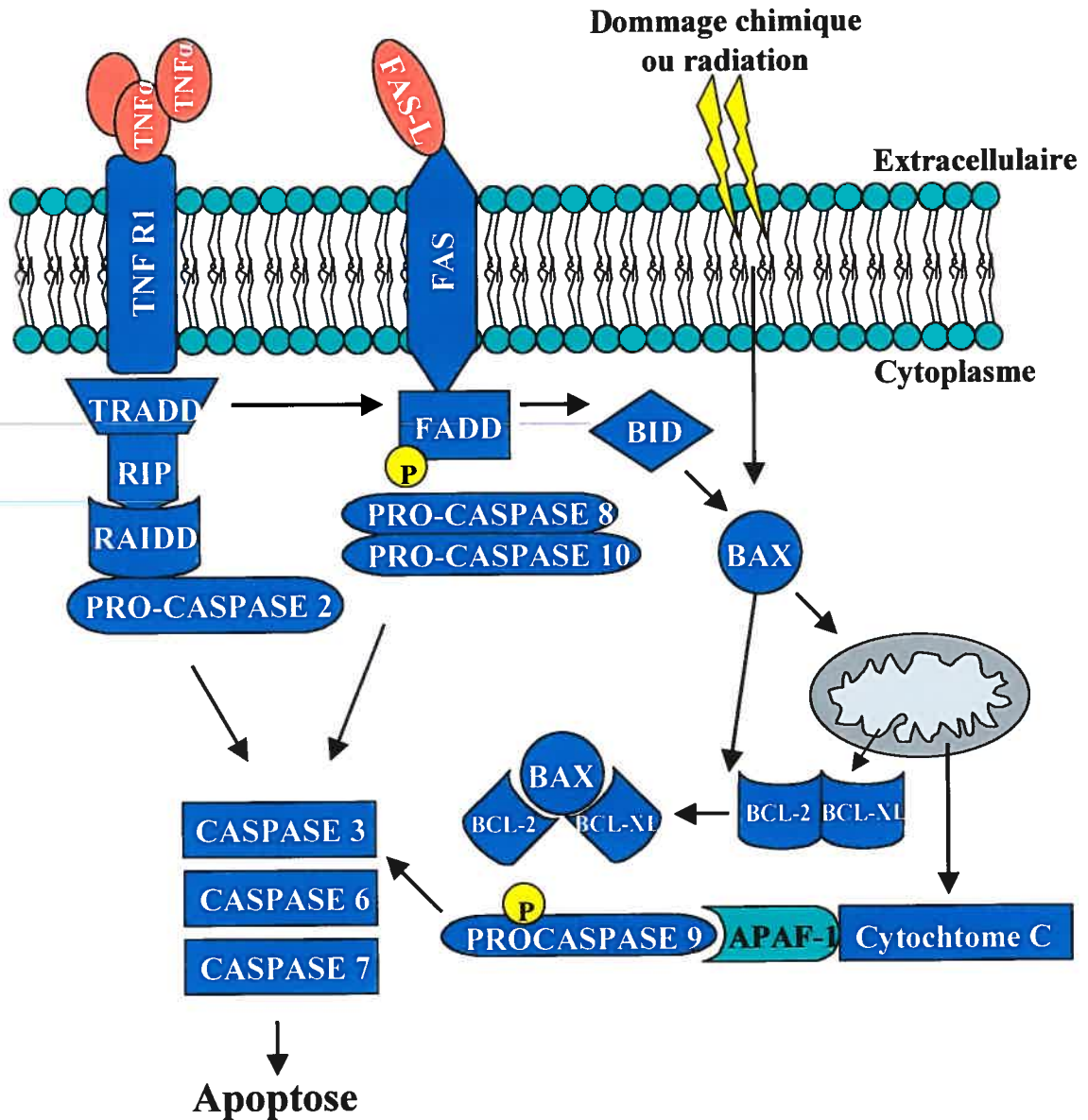


Figure 13. Représentation simplifiée des voies de l'apoptose. Tirée et adaptée du site http://www.biocarta.com/pathfiles/h_mitochondriaPathway.asp, 2000.

La voie intrinsèque implique le relâchement de l'Apaf-1 par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui est associée à la membrane externe de la mitochondrie. Par la suite, la protéine Bax pénètre dans la membrane de la mitochondrie et provoque le relâchement du cytochrome c. Il y a formation de l'apoptosome, un complexe composé du cytochrome c, de l'Apaf-1, d'une protéase (ex: la caspase 9), ainsi que de l'ATP (adénosine triphosphate). La caspase 9 active de façon séquentielle les caspases 3, 6, et 7, qui amplifient l'activité protéolytique pour la digestion des protéines structurales ainsi que la dégradation de l'ADN chromosomique (Srinivasula et al., 1998). La voie extrinsèque s'initie par la liaison du ligand au récepteur de la mort qui, par la suite, sollicite le recrutement de protéines adaptatrices, FADD ou TRADD, qui contiennent des domaines de la mort (DED) et interagissent avec des domaines similaires présents dans les pro-caspases 8 et 10. L'apoptosome est alors composé des molécules adaptatrices ainsi que des pro-caspases et initiatrices qui se transactivent et déclenchent l'activation séquentielle des caspases 3, 6, 7 (Green, 1998; Ashkenazi, 2002). Ces deux voies d'apoptose peuvent avoir une signalisation croisée. Ainsi Bid, un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 est clivé directement par la caspase-8 activée suite à sa liaison aux récepteurs de la mort. Le fragment C-terminal produit s'associe à la mitochondrie, libère le cytochrome c, et permet l'activation de l'Apaf-1, indépendamment de l'activation des caspases effectrices (Li et al., 1998). Finalement, le facteur d'induction de l'apoptose, AIF, induit l'apoptose indépendamment de l'activation des caspases. Suite à un signal d'apoptose, la membrane externe de la mitochondrie est perméabilisée et l'AIF est transporté dans le cytosol et le noyau. Ce dernier induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Les

évidences de l'induction de l'apoptose, indépendante des caspases, proviennent d'une part, d'études sur des cellules exposées à la staurosporine (Susin et al., 1999) et à des inhibiteurs des caspases *in vitro* et, d'autre part, d'études chez des souris dont les gènes de l'Apaf-1 ou des caspases 3 et 9 ont été inactivés (Susin et al., 2000).

Plusieurs mécanismes peuvent jusqu'à un certain point contrebalancer l'action d'agents induisant la mort cellulaire et par le fait même favoriser la survie des cellules. Parmi ceux-ci et en relation avec la voie de l'apoptose, soulignons la régulation des protéines anti-apoptotiques, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 et A1, assurée au niveau de la transcription, des interactions protéine-protéine et des modifications traductionnelles. La protéine Bcl-2 jouerait un rôle dans la progression du CaP. En effet, alors que les tissus cancéreux de CaP peu avancé et sensibles aux androgènes sont négatifs ou expriment faiblement la protéine, l'expression de Bcl-2 est détectée chez la majorité des spécimens de CaP réfractaire aux androgènes (Colombel et al., 1993; Krajewska et al., 1996; McDonnell et al., 1997). Parmi les hypothèses expliquant l'émergence de cellules tumorales indépendantes aux androgènes, il y a celle postulant que l'ablation des androgènes dans le CaP favoriserait la sélection de cellules capables de vivre sans hormones. À cet égard, la présence de Bcl-2 favoriserait la survie de ces cellules réfractaires (Colombel et al., 1993; McDonnell et al., 1997). Le haut niveau d'expression de Bcl-2 dans la lignée de cellules PC-3 et l'augmentation de son expression dans les cellules LNCaP privées d'androgènes appuient un rôle de Bcl-2 dans la résistance des cellules à l'apoptose (Catz and Johnson, 2001). *In vivo*, l'expression de Bcl-2 augmente suivant la castration du rat et cet effet est inhibé par la co-administration de testostérone (McDonnell et al., 1997). Des ODN anti-sens de Bcl-2

injectés à des souris castrés porteurs d'une tumeur dérivée des cellules LNCaP réduisent le volume de la tumeur de 10 à 50% alors que les tumeurs d'animaux contrôles recevant des ODN sens subissent une augmentation de 50% de leur volume, ce qui renforce l'hypothèse du rôle de Bcl-2 dans la progression du CaP (Gleave et al., 1999). Des essais cliniques en phase I et II, basés sur l'utilisation d'ODN anti-sens de Bcl-2 combinés à de drogues telles que le taxol et les agents diminuant l'expression de Bcl-2 comme l'acide 13-cis-rétinoïque et l'interféron alpha sont présentement en cours de réalisation (DiPaola et al., 1999; Friedland et al., 1999; Morris et al., 2002; Thalasila et al., 2003). L'observation de l'hétérodimérisation des protéines anti- et pro-apoptotiques a permis de développer des stratégies prometteuses, visant à introduire de petits peptides synthétiques dérivés des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak dans les cellules prostatiques tumorales. Ceci a eu pour effet d'augmenter de 40% le niveau d'apoptose *via* la perturbation des interactions des protéines Bak (pro-apoptotique) et Bcl-2 (anti -apoptotique) (Finnegan et al., 2001).

La survie cellulaire fait aussi appel à la voie de signalisation passant par la protéine kinase B ou Akt (figure 14), une S/TK elle-même couplée à de nombreuses voies de signalisation régulées par les FC et agents stimulant la prolifération cellulaire (Scheid and Woodgett, 2003). La protéine Akt est située en aval de la kinase phosphoinositide 3-K. Cette dernière phosphoryle les phosphatidylinositides conduisant à l'activation d'Akt. Ainsi la survie cellulaire est favorisée *via*: 1- la phosphorylation de Bad causant sa dissociation du complexe Bad/Bcl-X_L; 2- l'activation de IKK- α résultant en l'activation du facteur de transcription NF- κ B (voir figure 14). Les principaux aspects de cette voie reliés au cancer incluant le CaP touchent Akt elle-même et la phosphatase PTEN (ou NMCA1 ou TEP1),

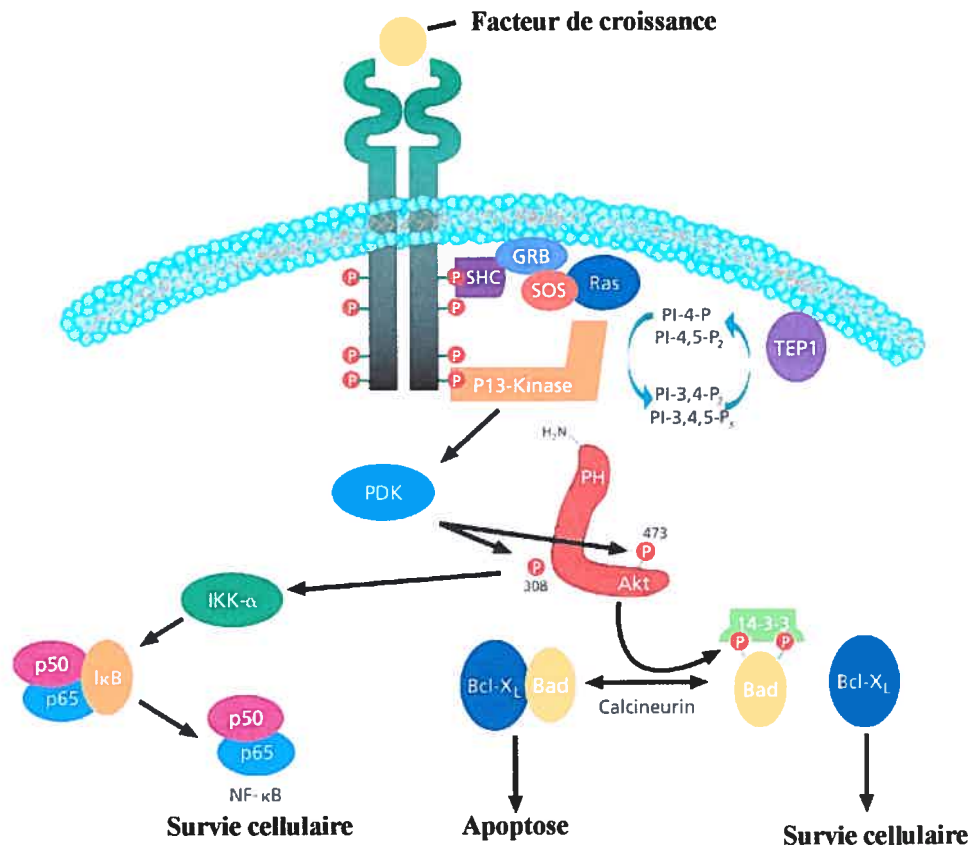


Figure 14. Voie de signalisation de la protéine kinase Akt

La protéine Akt est activée par plusieurs facteurs de croissance et de survie. Cette S/TK kinase est couplée à de nombreuses voies de signalisation régulée par les FC et agents stimulant la prolifération cellulaire. Tirée et adaptée de <http://www.sigmaaldrich.com>.

connue pour son activité sur les phosphoinositides et qui appartient à la famille des phosphatases de type tyrosine (Leslie and Downes, 2002). La protéine Akt est activée de façon constitutive dans plusieurs cancers dont le CaP (Vivanco and Sawyers, 2002). Parmi les nombreux facteurs impliqués dans cette activation constitutive et variant selon le cancer, soulignons le PDGF et *IGF-like* et des mutations dans l'oncogène Ras ou des ses effecteurs (Hersey and Zhang, 2003). Les cellules LNCaP ont une Akt hyperactive résultant de l'inactivation de la phosphatase PTEN. Dans ces cellules, l'activation de la protéine kinase C (PKC) par des esters de phorbol ou le diacylglycérol conduit à une diminution de la phosphorylation de la PKB, effet contrecarré par l'utilisation d'un inhibiteur de la PKC. De plus, la surexpression de la protéine Akt activée dans les LNCaP prévient l'apoptose induite par le PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). Ces données suggèrent un rôle déterminant de la PKB comme effecteur de la protéine kinase C (Tanaka et al., 2003). Quant à PTEN, la présence de mutations au niveau du gène indique un lien entre l'altération /abolition de son activité et son rôle dans la suppression des tumeurs (Leslie and Downes, 2002). Plus de 50% des cancers de la prostate au stade avancé sont caractérisés par la perte ou l'inactivation de PTEN (Whang et al., 1998; Vlietstra et al., 1998; McMenamin et al., 1999). L'absence de la fonction enzymatique de PTEN résulte en la présence d'une activité élevée de la kinase Akt favorisant la survie des cellules (Hudes, 2002).

1.8. Protéines kinase et microtubules

De manière générale, l'ensemble des FC actifs sur la croissance des cellules (prise dans son sens large) et incluant les cytokines, les produits de sécrétion des cellules NE et le TGF β ,

pour les cellules prostatiques, agissent *via* des récepteurs spécifiques transmembranaires qui médient le signal biologique suite à l'activation de diverses protéines kinases. Ainsi, les réactions de phosphorylation des protéines créent des sites d'ancrage permettant le recrutement et l'activation d'autres protéines et second messagers. Ceux-ci amplifient et propagent le signal jusqu'au noyau où divers facteurs de transcription, aussi phosphorylés (fréquemment mais non exclusivement sur S/T), activent les gènes. L'effet stimulateur ou inhibiteur des fonctions cellulaires induit par les FC est ainsi initié et modulé (McKeehan, 1991). Ces réactions sont réversibles et font appel à la déphosphorylation des protéines contrôlées par des phosphatases spécifiques à ces résidus. De plus, de telles kinases et phosphatases sont parties intégrantes de voies de signalisation régulées par les contacts cellulaires, les interactions des cellules avec les protéines de la matrice extracellulaire, de même que la structure de la cellule ou cytosquelette. Dans le contexte de travaux réalisés dans cette thèse, nous traiterons du cytosquelette et de l'implication de kinases et phosphatases qui régulent les microtubules.

1.8.1. Cytosquelette

Le passage des cellules dans le cycle cellulaire et l'induction de leur mort se traduisent par des changements morphologiques observés à tous les niveaux, membranes, cytoplasme, et noyau et impliquent une contribution majeure des éléments du cytosquelette. Avec la découverte de protéines de régulation des voies de signalisation impliquées dans la survie, la croissance et la mort cellulaire, divers mécanismes de contrôle du cytosquelette nous sont apparus. Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons caractérisé c-tak1, une kinase appartenant à la famille des kinases Mark (*microtubule-affinity regulated kinase*) qui se

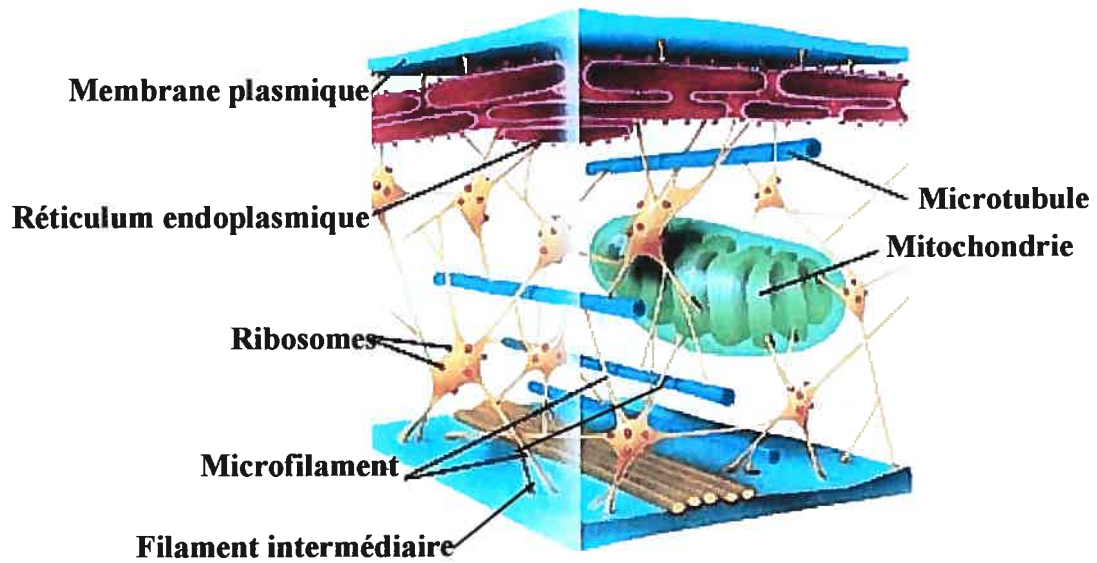
défini par son association aux protéines régulant les microtubules. Pour mieux saisir le sens de ces travaux, revoyons certains aspects de la structure cellulaire.

Chez les eucaryotes, le cytosquelette est défini par un réseau de 3 types de fibres protéiques: les microfilaments ou filaments d'actine, les filaments intermédiaires, et les microtubules. Ces différents polymères associés aux protéines motrices assurent le maintien de l'intégrité physique, la forme, la division asymétrique, le transport de constituants cellulaires, ainsi que la motilité des cellules. La figure 15A illustre l'organisation spatiale de chacun des constituants du cytosquelette en relation avec divers organelles et autres éléments structuraux de la machinerie cellulaire.

1.8.1.1. Les microfilaments ou l'actine

Bien qu'ils puissent être dispersés à l'intérieur de la cellule, les microfilaments d'actine (polymères hélicoïdaux) se concentrent surtout dans la partie corticale de la cellule (figure 15B). L'arrangement spatial de l'actine peut se présenter sous une forme compacte par des amas de filaments entrecroisés et disposés de façon parallèle ou encore, sous la forme d'un réseau lâche de polymères reliés selon un motif orthogonal. L'actine est une protéine abondante chez les mammifères où elle représente environ 5 à 10% du contenu protéique total de la cellule. Il y a 6 types d'actine se partageant une grande homologie entre elles.

Quatre formes sont associées aux différentes cellules musculaires: 1-forme α du muscle squelettique; 2-forme β du muscle cardiaque; 3-forme γ du muscle lisse et 4-forme γ du muscle entérique. Dans toutes les autres cellules, les isoformes 5 et 6 d'actine α et β font



B

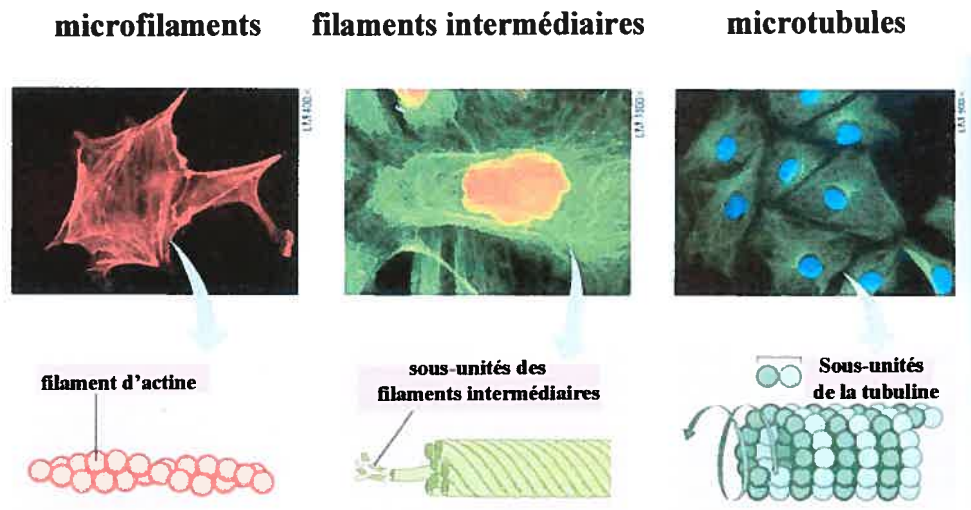


Figure 15. Organisation du cytosquelette

A) Interaction des trois types de fibres protéiques formant le cytosquelette de la cellule. B) Images en fluorescence et schématisation de ces trois composants. Tirée du site web: www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookglossM.html

partie du cytosquelette (Alberts, 1994). Chaque molécule d'actine globulaire (actine G) ou monomère présente des sites d'interaction avec d'autres monomères formant des trimères qui eux-mêmes se polymérisent en actine filamenteuse (figure 16A). Cette polymérisation nécessite la présence de protéines accessoires dites protéines de liaison de l'actine G dont, entre autres, la profiline et des protéines de recouvrement de l'actine filamenteuse (Alberts, 1994). D'autres protéines de liaison (α -actinine, filamine) assurent le lien entre les amas d'actine filamenteuse (Schoenenberger et al., 2002). Le lien entre le réseau d'actine et la membrane cytoplasmique se fait par un ensemble de jonctions entre les protéines d'adhésion focale, les intégrines, les protéines de la matrice extracellulaire et les protéines transmembranaires, auxquelles se joignent les fibres de stress (actine) (figure 16B). Finalement, l'actine joue un rôle dans la formation des différents types de protusions cellulaires telles les microvilli, pseudopodes, lamellipodes, et filopodes (Alberts, 1994).

1.8.1.2. Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires contribuent à l'architecture cellulaire. Ce sont des structures non polarisées et stables qui ressemblent à des cylindres et sont abondantes dans les cellules soumises à des stress mécaniques (figure 15B). Les 5 différents groupes de filaments intermédiaires sont présentés au Tableau 6.

De façon générale, la structure des filaments intermédiaires consiste en une partie N terminale, suivie d'une région centrale cylindrique se terminant par la portion C-terminale. La polymérisation des filaments s'effectue par l'enroulement des parties centrales, les

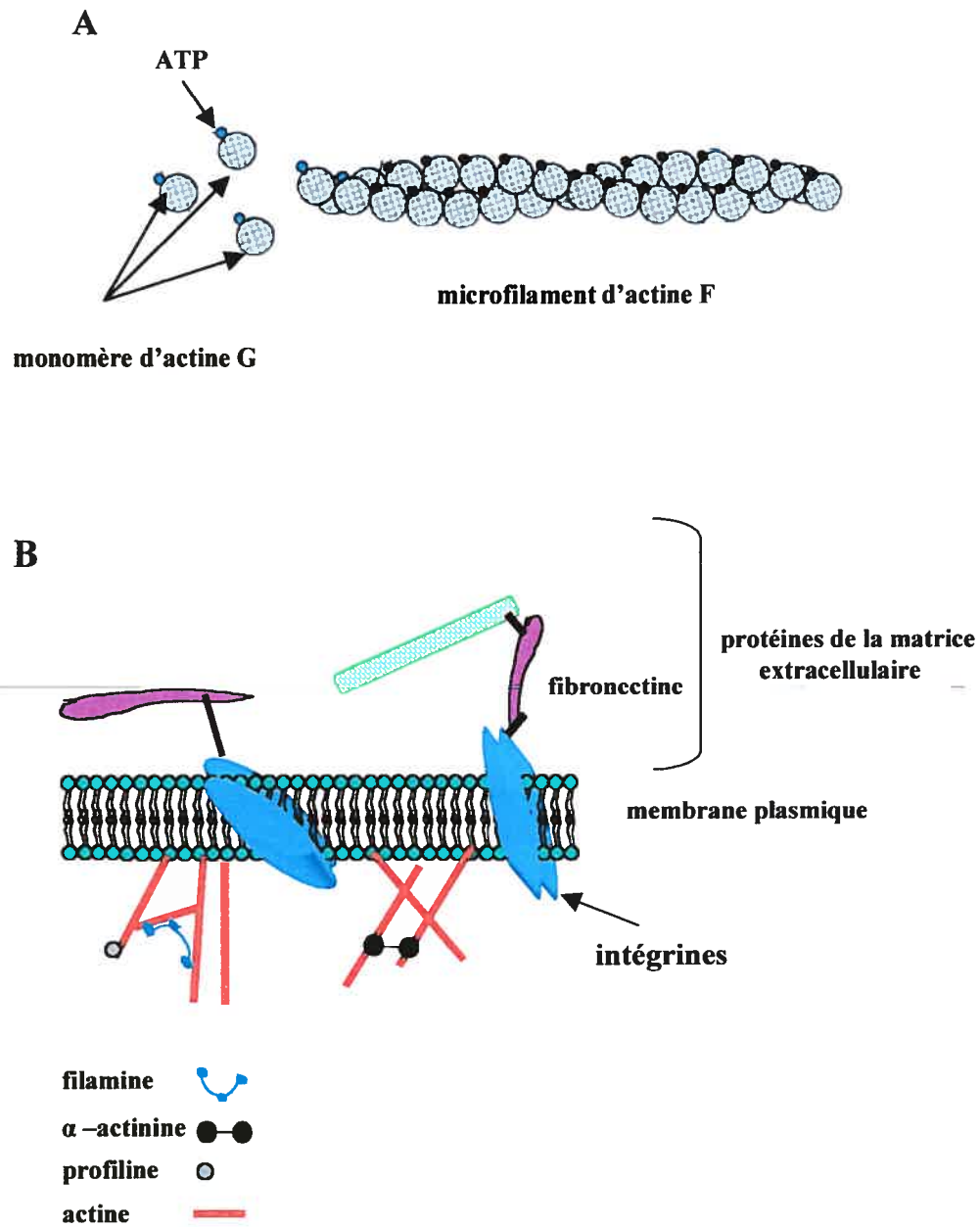


Figure 16. Structure des microfilaments d'actine

A) Polymérisation de l'actine. B) Protéines accessoires de l'actine et de liaison à la membrane plasmique.

Tableau 6. Différents membres de la famille des filaments intermédiaires

Groupes	Nom	Localisation et Type cellulaire
Type I	Kératines acides	Cellules épithéliales
Type II	Kératines basiques	Cellules épithéliales
Type III	Vimentine	Fibroblastes, cellules endothéliales, leucocytes
	Desmine	Cellules musculaires
	Facteur acide fibrillaire glial	Astrocytes, cellules gliales
	Périphérine	Fibres nerveuses périphériques
Type IV	Interneuxine filensine, phakinine	Neurofilament
Type V	lamine	Noyau cellulaire

portions N-terminale et C-terminale étant alignées (voir figure 15). Les dimères s'empilent pour donner des tétramères qui deviennent la sous-unité de base du filament. Un protofilament est constitué de 4 tétramères. Des protéines accessoires complètent la structure des filaments intermédiaires et peuvent lier les filaments à la membrane nucléaire interne (récepteur B de la lamine), aux microtubules (plectine) ou à l'actine (ankyryne) (Alberts, 1994).

1.8.1.3. Microtubules

Les microtubules sont des polymères de tubuline (unité monomérique) dont la fonction est de permettre le mouvement d'organelles, tels les chromosomes, les fuseaux mitotiques, et autres structures. La dynamique fonctionnelle des microtubules, assemblage et orientation, est contrôlée par des molécules motrices et les protéines associées aux microtubules

(MAP). Chez les mammifères, au moins 6 gènes différents codent pour chacune des sous-unités α et β de la tubuline monomérique. Ces isoformes possèdent des niveaux de stabilité différents du moins *in vitro* (Schwarz et al., 1998). Ces sous-unités forment un hétérodimère de 110 kDa et ceux-ci s'ajoutent graduellement les uns aux autres pour former le protofilament qui devient un microtubule après l'assemblage de 13 des ces protofilaments orientés de façon parallèle (figure 17). Les microtubules forment une structure polarisée, caractérisée par une extrémité (+) à croissance rapide alors que l'autre extrémité (-) est à croissance lente. Le microtubule possède une instabilité dynamique qui se traduit par des cycles alternés de polymérisation et de dépolymérisation du protofilament.

Le mécanisme d'assemblage implique l'hydrolyse du GTP (guanosyl triphosphate). Ainsi, chaque monomère de tubuline α et β lie le GTP mais ce n'est que la forme α qui possède une activité GTPase. Le modèle présenté à la figure 17B reliant l'activité d'hydrolyse du GTP avec un changement de conformation des extrémités du microtubule implique: 1-la polymérisation de la β tubuline-GTP à l'extrémité du microtubule; 2-la formation d'une pochette d'hydrolyse par l'arrimage de la sous-unité α avec la sous-unité β ; 3-l'hydrolyse du GTP qui entraîne un recourbement du microtubule; et 4-sa déstabilisation (Hyman et al., 1995; Howard and Hyman, 2003). C'est la différence entre la vitesse d'hydrolyse du GTP et celle de la liaison du GTP à la tubuline qui détermine la croissance/sauvetage ou la diminution /catastrophe des microtubules (figure 17B).

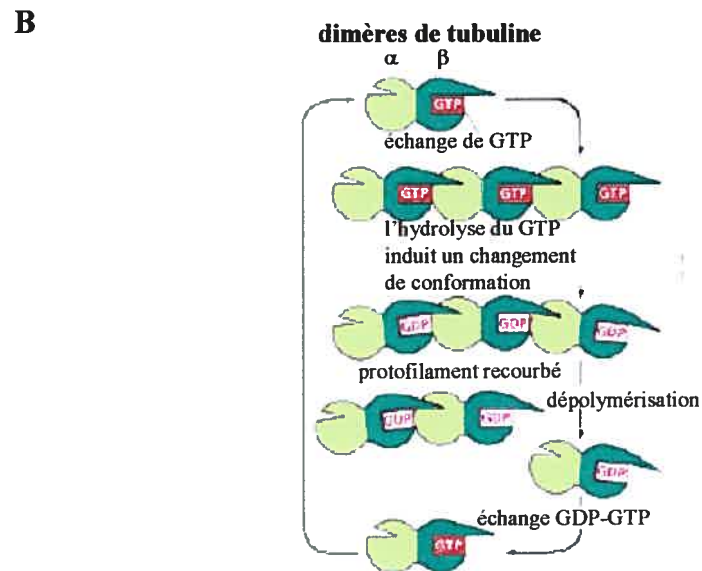
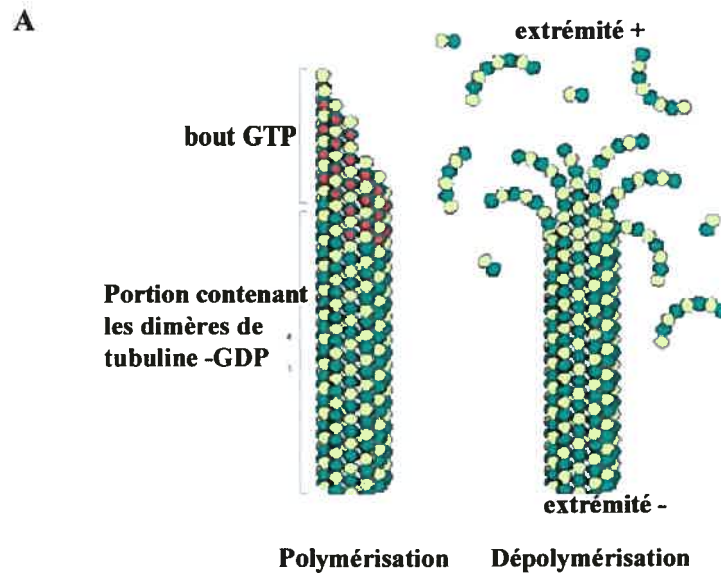


Figure 17. Dynamique des microtubules

A) La conformation des microtubules change selon l'activité d'hydrolyse du GTP. B) Le cycle de polymérisation se caractérise par l'ajout d'hétérodimères de tubuline liés au GTP et celui de la dépolymérisation par l'hydrolyse du GTP générant des dimères libres de tubuline. Tirée et adaptée du site web: calamar.univ-ag.fr/deugsv/Documents/Cours/SV1-microtubules.pdf.

1.8.2. Régulation des microtubules

La stabilité des microtubules est régulée par les protéines motrices, les protéines déstabilisatrices et stabilisatrices des microtubules, dont les MAP et autres protéines de liaison de la tubuline, qui à leur tour sont régulées, notamment par des phosphorylations et impliquant donc des phosphatases et des kinases.

1.8.2.1. Protéines motrices

Les principales protéines motrices sont la famille des kinésines, les dynéines et la dynacrine. Les kinésines jouent un rôle structural particulièrement important au cours de la division cellulaire (Walczak et al., 1998). Ainsi les kinésines des sous-familles CHO1/MKLP1 et KLP3A contribuent à la formation de la plaque équatoriale du fuseau mitotique et au processus de cytotdiérèse (télophase) (Straight and Field, 2000). Chez *C. elegans*, des petits ARN interférents des protéines homologues CHO1/MKLP1 provoquent la désorganisation des faisceaux de microtubules de la plaque équatoriale et empêchent la cytotdiérèse (Raich et al., 1998). Les kinésines assurent aussi le transport antérograde des organelles de l'extrémité (+) du microtubule vers la périphérie cellulaire. Les dynéines de poids moléculaire élevé (2 000 kDa) sont des transporteurs de structures cellulaires de l'extrémité (-) du microtubule vers le centre de la cellule. Cependant, dans la cellule, les organelles peuvent voyager dans les deux directions et la coordination de ce transport est assurée par un large complexe protéique, la dynacrine (Dell, 2003).

1.8.2.2. Protéines déstabilisatrices des microtubules

La déstabilisation des microtubules par dépolymérisation ou fragmentation implique divers groupes de protéines et est notamment requise au cours de la division cellulaire. Ainsi, les kinésines associées au centromère mitotique (MCAK) contribuent à leur déstabilisation en se liant spécifiquement à leurs extrémités (+) (Howard and Hyman, 2003) et retirant des sous-unités de tubuline *via* l'hydrolyse de l'ATP. Ces protéines induisent aussi un changement de conformation des microtubules, et ce, possiblement par l'augmentation de l'amplitude de leur recourbement (Nogales, 2000). Par ailleurs, la katanine (protéine hétérodimérique: P60/P80) fragmente les microtubules (cassure) dans leur longueur. Entre autres, ce processus physiologique est nécessaire pour assurer le relâchement des microtubules du centrosome lors de la mitose (Ahmad et al., 1999) et pour la production d'extrémités libres qui assurent le mouvement des chromosomes lors de l'anaphase (Quarmby, 2000). L'activité de cassure est assurée par la sous-unité ATPasique de P60 en absence de la sous-unité P80 (Nogales, 2000). Une autre protéine, Op18 ou stathmine, se lie alors aux dimères de tubuline ou interagit directement avec l'extrémité des microtubules pour augmenter l'activité "catastrophe", aussi nommée diminution du microtubule (Belmont and Mitchison, 1996; Howell et al., 1999).

1.8.2.3. Protéines stabilisatrices du microtubule

Les MAP regroupent diverses classes de protéines qui modulent la dynamique des microtubules en augmentant leur vitesse de polymérisation ou en les stabilisant. Les protéines TOGp/humain et son homologue chez le xénope XMAP215 de la famille Dis1 (essentielle à la division des cellules eucaryotes) favorisent la polymérisation à l'extrémité

(+) (Spittle et al., 2000) et modulent les effets de facteurs de catastrophe (Wittmann et al., 2001). CLIP-170 et CLIP-115 (principalement neuronale vs dynamique des microtubules des dendrites) sont aussi des protéines anti-catastrophes qui s'associent spécifiquement aux extrémités des microtubules. CLIP-170 assure un lien entre l'extrémité (+) des microtubules et les kinétochores (Schuyler and Pellman, 2001). De plus, comme elle se co-localise avec la dynéine et la dynactine à l'extrémité (-) du microtubule, elle pourrait être impliquée dans le transport des molécules initié par la dynéine (Akhmanova et al., 2001). Les protéines CLASP1 et CLASP2 (*CLIP-associating proteins*) stabilisent les microtubules lorsqu'elles sont surexprimées dans les fibroblastes (Akhmanova et al., 2001), possiblement en s'associant aux CLIP, tel que démontré dans les cellules motiles polarisées (Akhmanova et al., 2001). Chez l'humain, la protéine EB1 se lie aux extrémités des microtubules en processus sauvetage pour les stabiliser (Tirnauer et al., 2002). Finalement, les protéines tau et MAP2c localisées respectivement dans les axones et les dendrites, MAP4 exprimée dans les cellules non neuronales (Schoenfeld and Obar, 1994; Mandelkow and Mandelkow, 1995), et STOP (associée à la calmoduline et à diverses situations de stress) (Guillaud et al., 1998) sont des MAPs dites structurales ou filamenteuses qui favorisent la polymérisation de la tubuline et assure la stabilité des microtubules sous forme de fagots (Drechsel et al., 1992), en s'y liant de façon réversible (Drewes et al., 1998). MAP4 exerce aussi un rôle dans l'organisation du transport des organelles lors de l'interphase (cycle cellulaire), la formation des fibres du fuseau mitotique et le changement de forme des cellules lors de leur différenciation (Bulinski and Borisy, 1980; Parysek et al., 1984). La diminution de l'expression de MAP4 dans les cellules Hela modifie à la hausse la

proportion de tubuline libre comparée à la tubuline polymérisée. Le taux de synthèse de la tubuline est aussi affecté, ce qui appuie l'hypothèse de l'autorégulation de la tubuline (Nguyen et al., 1999). MAP4 contient des sites de phosphorylation sur les Ser 696 et 787, situées dans une région riche en proline au niveau du domaine de liaison des microtubules. À cet égard, le niveau de phosphorylation de MAP4 augmente durant la phase de transition G2/M du cycle cellulaire (Vandre et al., 1991) alors que la protéine demeure associée aux microtubules tout au long du cycle (Bulinski and Borisy, 1980; Olson et al., 1995). Cette phosphorylation de MAP4 affecte les propriétés des microtubules. Ainsi, les cellules exprimant des formes mutées de MAP4 (affectant sa phosphorylation) résistent davantage à l'effet de dépolymérisation des microtubules induit par le nocodazole (Chang et al., 2001) et ont un cycle cellulaire altéré. Ceci indique que la phosphorylation de MAP4 contribue à la dynamique des microtubules. Quant à la protéine STOP, régulée par la calmoduline, elle assure la stabilité des microtubules lorsque les cellules sont soumises au froid et traitées avec des drogues provoquant la dépolymérisation des microtubules (Guillaud et al., 1998).

1.8.2.4. Autres protéines de liaison de la tubuline

Parmi les protéines du choc thermique (HSP), la protéine HSP-90 se lie à la tubuline *in vitro* et favorise sa dépolymérisation (Garnier et al., 1998). Le complexe α tubuline-HSP-90 s'associe à la protéine RalBP1, qui elle-même interagit avec la protéine de choc HSF1. Cet hétéro-complexe est impliqué dans la réponse cellulaire au stress (Hu and Mivechi, 2003).

Les principales protéines kinases associées aux microtubules sont GRK2, Plk (polo), et les membres de la famille Emk/Mark/Par1. GRK2, une protéine kinase normalement liée aux

récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) (Haga et al., 1998), jouerait un rôle additionnel à celui de la régulation des RCPGs par sa co-localisation (Pitcher et al., 1998) et son action sur la tubuline dans les cellules. La GRK2 phosphoryle les dimères de tubuline ainsi que les microtubules (Haga et al., 1998). Quant à Plk, elle interagit spécifiquement avec les tubulines, β et γ dans les cellules en interphase et en mitose. *In vitro*, Plk phosphoryle le protofilament de tubuline, ce qui explique de façon moléculaire son rôle dans la formation du fuseau mitotique (Feng et al., 1999). En ce qui concerne les membres de la famille Emk/Mark/Par1 dont fait partie c-tak1, ils constituent un petit groupe de kinases dont la fonction est principalement associée au contrôle de la polarité cellulaire (Kemphues et al., 1988; Guo and Kemphues, 1995) et de la stabilité des microtubules (Drewes et al., 1997).

1.9. La famille Emk/Mark/Par1

Les protéines de cette famille de S/TK se caractérisent par la présence de plusieurs domaines (figure 18) dont une petite séquence dans la région N-terminale, suivie du domaine catalytique et d'un domaine associé à l'ubiquitine. Au centre, on retrouve un insert de longueur variable dont la fonction est inconnue. La portion C-terminale d'environ 100 acides aminés se termine par le motif ELKL (glutamate-leucine-lysine/asparagine-leucine) d'où est issu le nom de EMK de cette famille (*ELKL Motif Kinase*) (Espinosa and Navarro, 1998).

Depuis le clonage de Par-1 chez *C. elegans* (Guo and Kemphues, 1995), Emk1 chez la souris, (Inglis et al., 1993), Mark1 et Mark2 chez le rat (Drewes et al., 1997) et p78 chez

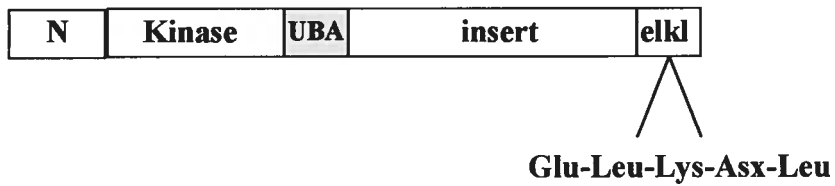


Figure 18. Structure des kinases Emk/Mark/Par1

Les membres de la famille Emk/Mark/Par1 sont caractérisés par les domaines suivants: 1- N-terminal (N); 2-kinasique; 3-associé à l'ubiquitine (UBA); 4-insert; 5-motif elkl dans la portion C-terminale.

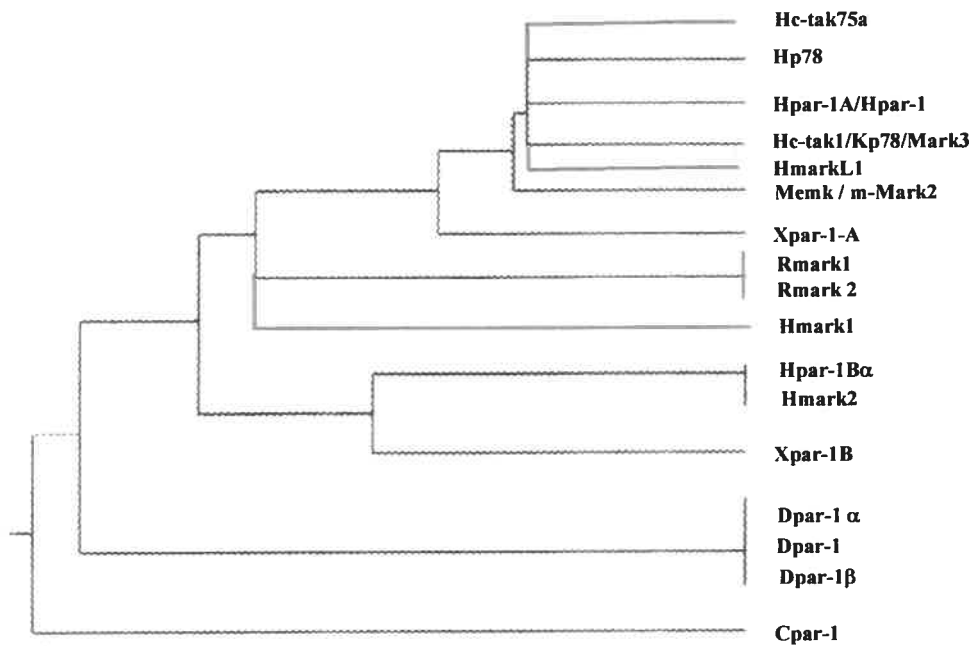
l'humain (Parsa, 1988), plusieurs autres homologues (illustrés à la figure 19) ont été identifiés chez la levure, *C. elegans*, la grenouille, la drosophile et l'humain.

1.9.1. Par-1: polarité et division asymétrique des cellules

Le rôle des kinases de la famille Emk/Mark/Par1 (voir figure 19) est encore mal connu mais la compréhension de certaines de leurs fonctions qui seraient conservées dans la phylogénie vient, entre autres, d'études chez *C. elegans* et *D. Melanogaster* qui ont permis d'attribuer aux protéines CPar-1 et DPar-1, un rôle dans l'établissement de la polarité antérieure-postérieure au stade de la première cellule de l'embryon (effectuée chez *C. elegans* après la fertilisation). L'orientation du pôle antérieur-postérieur nécessite la présence des granules P, soient des structures cytoplasmiques ayant un faible contenu en ARN qui se retrouvent uniquement dans les cellules germinales (Schisa et al., 2001) dont le patron de localisation correspond à celui de la kinase Par-1 (figure 20).

Par-1 assure aussi la division asymétrique des cellules, notamment requis au niveau du follicule germinatif afin de sélectionner la cellule qui deviendra un oocyte mature (*D. Melanogaster*; signal d'asymétrie prédéterminé) (Guo and Kemphues, 1995; Tomancak et al., 2000; Shulman et al., 2000) et pour la diversité et le devenir des cellules durant le développement (tailles différentes, synchronisme respectif de leur division, évolution, patron de clivage) (Horvitz and Herskowitz, 1992).

Ce n'est que tout récemment qu'un substrat de Par-1 a été identifié chez la drosophile, soit la protéine Osk, une phosphoprotéine localisée au pôle postérieur de l'oocyte. Cette modification post-traductionnelle d'Osk par Par-1 prévient sa dégradation et lui permet de



Il est à noter que la protéine HSTK10 est partiellement caractérisée et que la kinase p110^{mark} qui est un membre de la famille Emk/ Mark/Par-1, a été purifiée du cerveau humain mais non séquencée.

Figure 19. Dendrogramme de la famille des kinases Emk/Mark/Par1

Les séquences proviennent de la banque de données *GenBank*. Le dendrogramme a été basé sur l'alignement des séquences des domaines catalytiques. Les kinases sont identifiées selon l'espèce d'origine: H (humain), M (souris), X (*Xenopus*), R (rat), D (drosophile) et C (*C. elegans*). Les kinases chez la levure n'ont pas été incluses dans le dendrogramme. La nomenclature de ces membres étant en constante évolution, les plus récentes modifications dans leur appellation sont spécifiées. Adaptée de Ossipova et al., 2002.

C. Elegans
 établissement de la polarité
 par le spermatozoïde

D.Melanogaster
 détermination de la polarité
 via un signal émis par le noyau
 de l'ovule

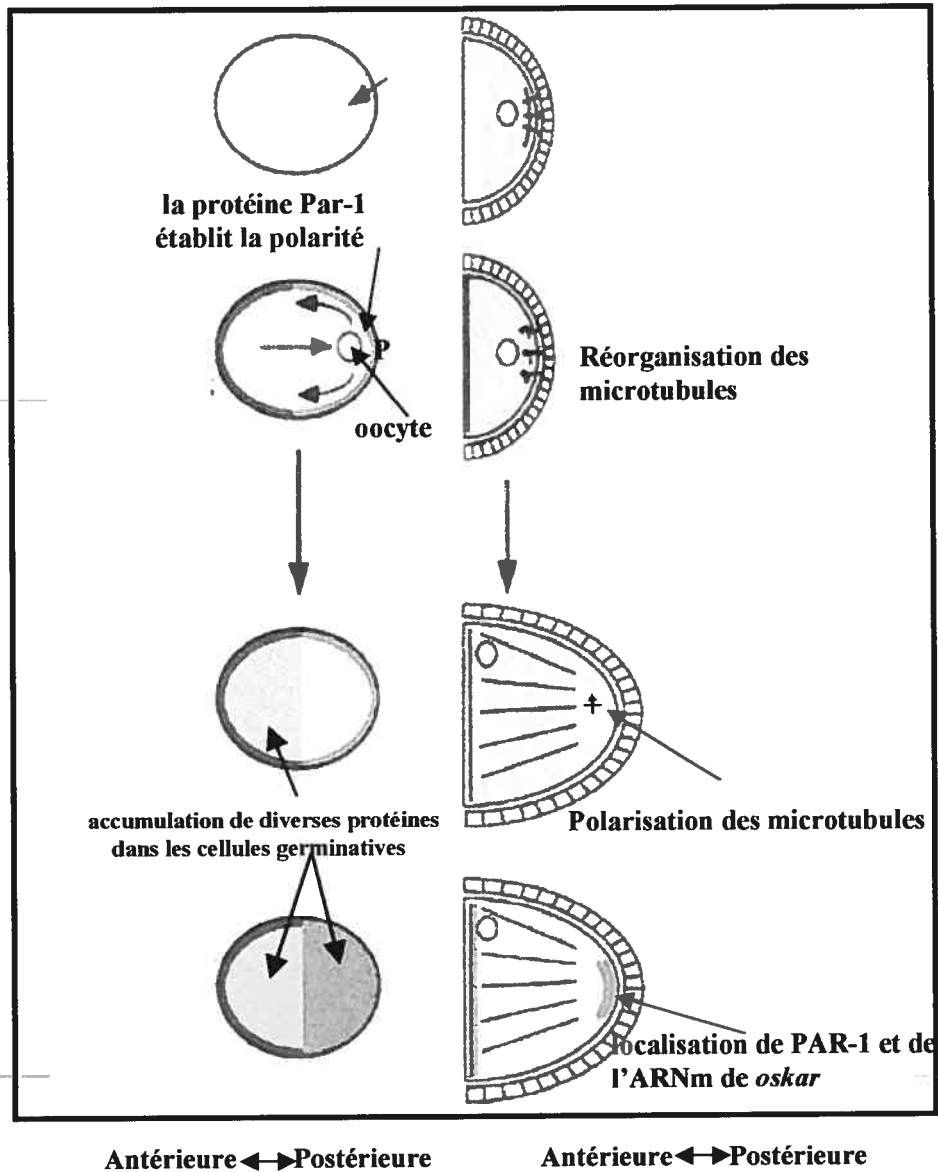


Figure 20. Établissement de la polarité chez *C.elegans* et *D.melanogaster*

La polarisation de l'embryon chez *C.elegans* et de l'oocyte chez *D.melanogaster* dépend de Par-1. Chez *D.melanogaster*, le processus nécessite la présence des microtubules. La polarisation chez *C.elegans* serait associée aux microfilaments et induit des mouvements cytoplasmiques (flèches deuxième plan, partie gauche). Tirée et adaptée de Kempfues et al., 1988.

jouer son rôle dans le *patterning* (Riechmann et al., 2002). Finalement au cours de l'oogenèse, Par-1 contrôle l'orientation des microtubules qui assure ainsi le transport des structures cytoplasmiques vers un pôle de la cellule (Huynh et al., 2001). Très récemment, il a été montré que Par-1 est associée à la signalisation induite par Wnt/ β -caténine et JNK (jun kinase). Ainsi, Par-1 phosphoryle Dsh, qui à son tour, phosphoryle des effecteurs résultant en la stabilisation de la caténine. De façon inverse, Par-1 régule négativement la voie de JNK (Sun et al., 2001).

Il a été établi que les mutations du gène *Par-1* (*homozygous Par-1 mothers*) qui inhibent l'activité du domaine kinase sont létales et causent à la fois la perte de l'asymétrie de la division, une localisation aberrante des granules P, l'orientation différente des fuseaux mitotiques et la perturbation du devenir des cellules filles (Guo and Kemphues, 1995). Ces modifications peuvent être mimées par la présence de cytochalasine D, une drogue qui modifie l'organisation des microfilaments d'actine (Mortensen and Larsson, 2003), lorsque l'embryon est soumis à de brèves périodes d'exposition (Hill and Strome, 1988; Hill and Strome, 1990; Strome and Wood, 1983). Les mécanismes par lesquels cette drogue affecte les éléments régulateurs de la division asymétrique des cellules n'ont pas été élucidés mais l'activité de phosphorylation de Par-1 semble critique. Comme le transport de l'ARN messager de la protéine Osk vers le pôle postérieur est aussi inhibé en présence de la forme mutée de Par-1, ces observations suggèrent que l'activité kinasique de Par-1 contribue à la régulation des microtubules (Tomancak et al., 2000; Shulman et al., 2000).

L'homologue humain, HPar-1, jouerait, elle aussi, un rôle dans la polarité (définie par un côté apical et une surface baso-latérale) des cellules épithéliales puisque la polarité est perturbée lorsque la protéine est dénuée de son domaine catalytique. Par ailleurs, la protéine qui se situe du côté latéral de la surface basale des cellules épithéliales (figure 21) conserve la même localisation. Alors que dans une cellule polarisée normale, la E-cadhérine est du côté latéral, l'expression de HPar-1 inactive cause une distribution inhabituelle de la E-cadhérine à leur surface apicale, résultant en une perte d'adhésion ou d'interaction cellule-cellule (Bohm et al., 1997). L'homologie structurale et fonctionnelle de Par-1 dans des espèces éloignées suggère aussi que cette kinase joue un rôle essentiel et conservé dans des processus cellulaires semblables chez divers organismes.

1.9.2. Les kinases Mark et leur activité sur les microtubules

La plupart des connaissances acquises sur les kinases Mark dans les cellules de mammifères et leur implication au niveau de la régulation des microtubules sont issues de travaux réalisés chez le rat où deux kinases codées par des gènes différents ont été identifiées, Mark1 et Mark2. L'expression de ces protéines est ubiquitaire et les tissus fœtaux possèdent les plus hauts niveaux et ce, dès la douzième semaine de gestation (Drewes et al., 1997). La surexpression des deux isoformes dans les cellules CHO modifie considérablement leur phénotype: les cellules s'arrondissent, deviennent plus petites, perdent leur adhésion au substrat et, finalement, meurent (Drewes et al., 1997). Le marquage des cellules par immunofluorescence au moyen d'une sonde de tubuline révèle alors une désorganisation partielle (Mark1) ou complète (Mark2) de la structure des

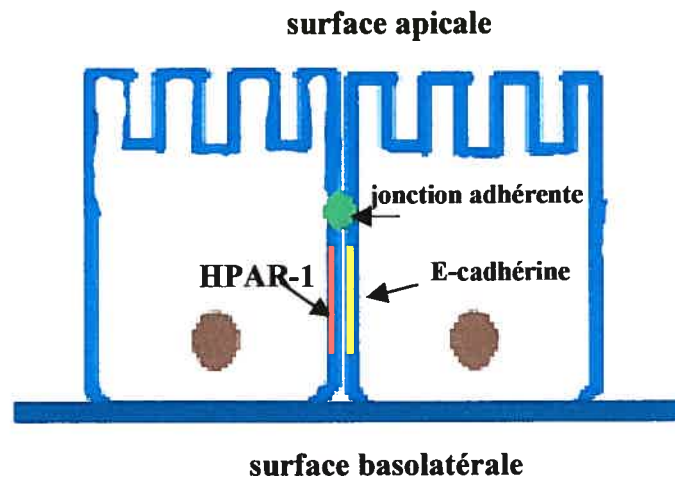


Figure 21. Polarisation de la cellule épithéliale

La polarité des cellules épithéliales est définie par un côté apical et une surface basolatérale. La kinase HPar-1 ainsi que la E-cadhérine sont localisées du côté latéral de la surface basale. Tirée et adaptée de Bohm et al., 1997.

microtubules. Cet effet peut être aboli par la surexpression de Mark1 et Mark2 inactives (mutations du domaine kinasique), indiquant que leur activité de phosphorylation participe à la régulation de l'organisation des microtubules. De plus, la surexpression des protéines stabilisatrices des microtubules, tau ou MAP2c, contrecarre la désorganisation des microtubules induite par des niveaux élevés des Marks. Ceci implique que les dommages induits par les kinases Mark affectent directement les microtubules (Ebner et al., 1999).

Les études des Mark humaines sont encore limitées mais les résultats les reliant à certaines maladies sont très prometteurs. Mentionnons d'abord la S/TK nommée p110^{mark} qui est associée à la protéine Tau dans le cerveau (Drewes et al., 1995), une MAP spécifique au tissu cérébral et dont le niveau de phosphorylation joue un rôle dans la stabilité des microtubules (Anderton, 1993; Hirokawa, 1994; Kosik and McConlogue, 1994). La protéine Tau comporte 3 ou 4 motifs caractérisés par la répétition d'une centaine d'acides aminés. Plus particulièrement, la première séquence répétitive contient un résidu Ser à la position 262 qui est préférentiellement phosphorylé par p110^{mark}. Or cette phosphorylation entraîne la dissociation de la protéine Tau des microtubules, cause leur déstabilisation (Drewes et al., 1995) et n'est observée que dans le tissu cérébral de patients souffrant d'Alzheimer (Hasegawa et al., 1992; Hasegawa et al., 1992). Ainsi, l'activité de p110^{Mark} serait directement reliée à l'organisation des microtubules et de ses protéines associées. De plus, on croit qu'elle serait responsable de l'agrégation de Tau causant un enchevêtrement des fibrilles neuronales, tel qu'observées dans la dégénérescence qui accompagne la maladie d'Alzheimer (Lee et al., 1991).

La deuxième kinase potentiellement importante dans une pathologie humaine est MarkL1 obtenue lors de l'analyse *microarray* de gènes associés à l'activité du facteur de transcription TCF1 ou LEF1 dans des hépatocytes cancéreux (Kato et al., 2001). Il est à souligner que dans certains cancers et plus particulièrement celui du colon, ce facteur de transcription est lié à une forme mutée et stable de la β -caténine qui favorise l'accumulation de complexes β -caténine mutée/LEF1 dans le noyau. Ceci entraîne l'activation constitutive du sentier de signalisation Wnt. Nous avons déjà mentionné la relation entre Par-1 et la voie de Wnt chez la drosophile. Chez l'humain, l'expression de MarkL1 est ubiquitaire mais les testicules possèdent le niveau le plus élevé du transcrit. Le gène codant pour MarkL1 est situé sur le chromosome 19q13.2. Une forme plus courte dépourvue de l'exon 16 se retrouve uniquement dans le cerveau (*Genbank #AY057448*). L'analyse de l'expression de MarkL1 par transcription réverse et amplification par polymérisation en chaîne (RT-PCR) montre une augmentation dans la majorité des cancers hépatiques (Kato et al., 2001). *In vitro*, le traitement d'hépatocytes cancéreux SNU475 avec des ODN anti-sens de MarkL1 réduit le nombre de colonies dans un essai en gel d'agar mou sans toutefois affecter la croissance des lignées cellulaires cancéreuses SNU423 et HepG2 (Kato et al., 2001). Ceci suggère un lien entre l'expression/activation de MarkL1 et la croissance de certaines lignées cancéreuses d'hépatocytes. De plus, considérant le lien structural entre l'homologue humain Par-1 et MarkL1 et l'implication de Par-1 dans la voie de Wnt chez la drosophile, il est possible que ces kinases jouent des rôles dans la voie de signalisation de Wnt de même que dans l'embryogenèse et le développement. De plus, la dérégulation de MarkL1 peut contribuer au processus de carcinogenèse hépatique (Cadigan and Nusse, 1997). MarkL1

possède aussi 62% d'homologie avec la kinase c-tak1/kp78/mark3 (décrite dans la section 1.9.2.1). Les autres kinases clonées sont Mark1, c-tak1/kp78/mark3 ainsi que c-tak75a (issue d'épissage alternatif) et STK10 qui est partiellement séquencée et résulterait de l'épissage alternatif du gène *c-tak1/kp78/mark3* (Genbank #AF170723.1). Leur structure comporte les domaines caractéristiques des membres de cette famille (montrée à la figure 18) et comporte des inserts de longueurs différentes.

Mark1 a été identifiée à partir d'une librairie d'ADNc de cerveaux humains. Le gène se situe sur le chromosome 1 et code pour une protéine qui possède 90% d'homologie avec la kinase de rat Mark1. L'analyse par RT-PCR révèle une expression ubiquitaire qui s'avère particulièrement élevée au niveau des testicules et de l'hippocampe (Nagase et al., 2000). Jusqu'à maintenant, sa fonction n'a pas été étudiée.

1.9.2.1. C-tak1/Kp78/Mark3

Les protéines c-tak1/kp78/mark3 et p78 ont été partiellement caractérisées dans le cadre d'une étude portant sur les mécanismes de régulation de la phosphatase Cdc25C, associée au cycle cellulaire (tel que mentionné à la section 1.7.1). Ainsi, l'incubation de la protéine recombinante Cdc25C avec des extraits de cellules Hela, d'œufs de *Xenopus* ou de foie de rat, a révélé la présence de Cdc25C phosphorylée. La recherche d'une kinase associée à Cdc25C dans le foie de rat a montré par immunobuvardage la présence d'un doublet de protéines de 36-38 kDa (Ogg et al., 1994). Le séquençage de la protéine de 38 kDa a révélé deux gènes homologues dans Genbank. Le premier correspond à la kinase p78 qui est perdue dans les cancers primaires du pancréas ainsi que ceux induits chimiquement chez les

rongeurs par le méthylnitrosourée (Parsa, 1988). Le deuxième correspond à Emk ou Mark2 chez la souris dont le poids moléculaire est de 85 kDa (Inglis et al., 1993). Le clonage subséquent du gène à partir d'une librairie d'ADNc de cellules B à l'aide d'amorces de nucléotides correspondant à la séquence de p78 a permis d'identifier c-tak1 (*Cdc twenty-five associated protein kinase*; Genbank # U64205) (Peng et al., 1998) qui contient un insert supplémentaire de 48 nucléotides codant pour les 16 acides aminés localisés dans la portion C-terminale de la protéine. Cette protéine correspond aussi à l'appellation de kp78 ou de mark3. Il est à noter que c-tak1 est une kinase distincte de TAK-1 qui est un membre de la famille des MAPK activé par le TGF β (Hirose et al., 1994). L'analyse par RT-PCR d'ARN de cellules Hela et Jurkat a montré que ces produits (présence de p78 et de c-tak1 à 80kDa) pourraient résulter d'épissage alternatif.

Le gène de *c-tak1* se situe au locus 14q32.3 (Ono et al., 1997). Tout comme les autres gènes de cette famille étudiés à ce jour, l'expression du gène *c-tak1* est ubiquitaire et la protéine de 80 kDa est cytoplasmique (Peng et al., 1998). La protéine c-tak1 mutée dans son domaine kinase possède une mobilité en électrophorèse plus grande (migration à 78 kDa) que la forme intacte suggérant qu'un doublet à 78 et 80 kDa reflète différents niveaux de phosphorylation. L'interaction et l'activité de c-tak1 sur Cdc25C (résidus Ser 116 /site principal et Ser 263) facilitant la liaison de la protéine 14-3-3 à Cdc25C ont été confirmées par des essais de phosphorylation *in vitro* de même que par la surexpression des protéines recombinantes dans les cellules COS-7 (Peng et al., 1998). La kinase serait aussi impliquée dans les voies de signalisation impliquant Ras, *via* la phosphorylation de KSR1 (*kinase*

suppressor of Ras; Ser 392) qui inhibe l'activation et la translocation de Ras à la membrane, aussi reliée à la protéine 14-3-3 (Muller et al., 2001).

Finalement, la recherche de substrats de c-tak1/kp78/mark3 dans les banques de données *TrEMBL* et *Swiss-Prot* à l'aide du motif $\Phi^a\text{X}\text{RxxS}^*\Phi\text{xxx}\Phi^a$ (où Φ^a est un résidu hydrophobique avec des chaînes aliphatiques, X est n'importe lequel des acides aminés, * est un site phosphorylé et Φ est un acide aminé hydrophobique) a permis de trouver un substrat additionnel, la protéine PKP2, qui partage ce motif avec Cdc25C et KSR1. Cette protéine appartient à la famille des plakophilines localisées dans les desmosomes et le noyau. PKP2 serait impliquée dans l'assemblage de desmosomes (Mertens et al., 1996). Sa phosphorylation par c-tak1 crée aussi un site de liaison pour la protéine 14-3-3 et par conséquent, influence la localisation de la protéine. Ainsi, jusqu'à maintenant, c-tak1 semble avoir un rôle dans les événements régulant la localisation des protéines affectant le cycle cellulaire ainsi que la transmission des signaux des voies de signalisation et les interactions cellule-cellule.

1.10. Hypothèses et Buts du travail

1.10.1 Première partie: Endogline

L'endogline est une protéine transmembranaire essentielle au développement des vaisseaux sanguins lors de l'embryogenèse. Elle est aussi exprimée dans les cellules immunitaires et inflammatoires chez l'humain et associée à l'angiogenèse dans les tissus adultes, notamment dans les cancers. C'est aussi un récepteur accessoire du TGF β qui, lorsque exprimé, s'associe au complexe formé des récepteurs I et II du TGF β et module les effets du

TGF β sur les fonctions (prolifération, adhésion, motilité, mort/apoptose) cellulaires. C'est dans ce contexte particulier que les travaux sur l'endogline ont été réalisés, notamment au niveau de l'utérus de souris, des cellules endothéliales humaines et des cellules épithéliales cancéreuses de la prostate humaine.

Volet 1: Endogline chez la souris

Des études préliminaires du laboratoire du Dr St-Jacques sur l'expression du transcrite de l'endogline ont démontré des niveaux particulièrement élevés dans les tissus du système reproducteur chez la souris, notamment dans l'utérus gravide et lors du cycle oestral et sa présence dans les cellules stromales des tissus utérins normaux, hyperplasiques et néoplasiques chez l'humain. *In situ*, la co-localisation de l'endogline et du TGF- β 1 sécrété dans le stroma utérin a donc suggéré que l'endogline joue un rôle dans la médiation des effets du TGF β dans l'utérus, au cours de la décidualisation, de l'implantation et de la placentation. Les objectifs de ce projet sont donc d'une part, d'investiguer le rôle de l'endogline dans la médiation des effets du TGF β au niveau des cellules stromales utérines *in vitro* et d'autre part, d'étudier la régulation de l'expression de l'endogline au niveau de ces cellules par les facteurs suivants: interleukine-1 et 6, IFN- γ , TNF- α , TGF β et PGE2 dont le rôle est primordial en période péri-implantatoire.

Volet 2: L'endogline dans les cellules prostatiques cancéreuses chez l'humain

Les FC, les cytokines, les neuropeptides, le TGF β sont autant de facteurs qui combinés aux hormones sexuelles peuvent être impliqués dans la transformation des cellules prostatiques normales en cellules cancéreuses. Leurs actions nécessitent l'activation de nombreuses voies de signalisation. Le TGF β est un facteur de croissance dont la complexité des effets

prend son origine dans la diversité d'actions selon le type cellulaire, ses modes d'action autocrine ou paracrine et son mode de signalisation médié par ses récepteurs de types I et II. Ces derniers peuvent être modulés par la présence de récepteurs accessoires tel le betaglycan et l'endogline. Plusieurs études montrent que l'endogline est associée à l'angiogenèse, un processus requis pour la formation des métastases. De plus, il appert que l'endogline pourrait être exprimée dans certains types de cellules épithéliales cancéreuses. Au moment où ce travail a été initié, une étude préliminaire rapportait l'expression de l'endogline dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines. Étant donné les travaux antérieurs du laboratoire sur le TGF β à titre d'inhibiteur de leur prolifération et de modulateur puissant de l'activation rapide de diverses protéines kinases, nous avons proposé que l'endogline module ces effets du TGF β sur les cellules prostatiques. Les objectifs sont, dans un premier temps, de caractériser l'expression de l'endogline dans les cellules prostatiques cancéreuses, puis d'investiguer l'effet de l'expression de l'endogline sur l'action du TGF β sur leur prolifération.

1.10.2. Deuxième partie: C-tak1

Caractérisation de c-tak1 dans les cellules prostatiques

Les travaux du laboratoire se basent sur l'hypothèse que les cellules souches prostatiques transformées, contrôlées par les hormones stéroïdiennes, les FC, les cytokines et les produits des cellules NE, contribuent au développement et à la progression du CaP. Or la prolifération normale de ces cellules et leur différenciation en cellules sécrétrices et NE impliquent certains de ces facteurs dont les niveaux sont grandement modifiés. Plus particulièrement, ces changements sont importants lors de la progression du CaP alors que

les cellules tumorales au phénotype peu différencié croissent malgré l'absence (ou de faibles niveaux) d'androgènes découlant des thérapies endocriniennes. Comme corollaire, il a été proposé que les molécules des sentiers de signalisation empruntés par différents facteurs de régulation de la croissance des cellules prostatiques et notamment les protéines kinases, puissent être différemment exprimées, activant les cascades de phosphorylation des protéines qui favorisent les cellules du CaP. À la recherche de candidats possibles comme marqueurs de CaP, plusieurs kinases ont été clonées à partir de cellules prostatiques souches, dont une des S/TK appartenant à la famille Marks. L'hypothèse de cette partie du travail est que cette protéine est associée au CaP. Les objectifs sont d'identifier la ou les kinases actives, de les caractériser dans les tissus et les cellules prostatiques, d'investiguer les mécanismes sous-jacents à leur régulation, et finalement d'identifier des partenaires potentiels de signalisation.

2. Matériel et méthodes

2.1. Tissus prostatiques humains

Les tissus prostatiques humains bénins et cancéreux ont été obtenus après la chirurgie du département de pathologie en conformité avec les règles établies au centre universitaire de santé McGill (CUSM/MUHC). Ils ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les prostates normales provenaient d'autopsies d'hommes âgés de moins de 50 ans et ont été récupérées dans un délai maximal de 6 heures (h) *post-mortem*. Des échantillons de tissus ont été fixés à la formaldéhyde, enrobés à la paraffine, et analysés du point de vue histologique afin d'établir sa classification (HBP ou CaP).

2.2. Tissus prostatiques de chien

Le chien représente un modèle d'excellence par ses similarités avec la prostate humaine puisqu'il développe avec l'âge une hyperplasie de la prostate et présente des lésions de type PIN ainsi que le CaP (Huggins, 1940; Chevalier et al., 1980). Le modèle canin est largement utilisé dans le laboratoire du Dr Chevalier et a été bien caractérisé. De manière générale, les prostates normales (poids variant entre 5-20 g) ont été obtenues de chiens intacts (non castrés) matures et sans distinction de race. Dans certains cas, les animaux ont subi des manipulations hormonales pour modifier les populations cellulaires de l'épithélium prostatique 4 semaines après la castration qui élimine d'abord les cellules luminales. Ainsi, afin de favoriser le renouvellement de l'épithélium luminal, les chiens normaux castrés ont reçu des androgènes (5 α -androstane-3 α ,17 β -diol) alors que les œstrogènes (17 β -estradiol-cyclopentylpropionate) ont été utilisés afin d'induire la métaplasie des cellules basales, tel

que décrit précédemment (Landry et al., 1996) et adapté de la littérature (Leav and Ling, 1968).

Dans tous les cas et immédiatement après le sacrifice et l'obtention de la prostate, la glande était pesée, nettoyée de sa capsule externe et coupée en petits morceaux sur glace. Pour chacune des prostates, des échantillons étaient fixés avec de la paraformaldéhyde afin de valider les effets des traitements hormonaux *via* l'examen histologique des tissus. Les cellules basales ont été identifiées par immunohistochimie au moyen d'un anticorps anti-cytokératine (34 β E2) (Shah et al., 1991) et les cellules sécrétrices ont été caractérisées avec des anticorps reconnaissant l'arginine estérase (don du Dr J Dubé, CHUL, Québec) et la phosphatase prostatique acide (Isaacs and Shaper, 1983). Le tissu a été utilisé soit pour l'isolation des cellules prostatiques (glandes de chiens normaux intacts) et/ou l'extraction des protéines.

2.3. Isolation et culture primaire des cellules prostatiques canines

Après que le tissu adipeux, la capsule et l'urètre prostatiques aient été enlevés, le tissu prostatique était émincé et les cellules dissociées par des traitements successifs avec 0,25% de collagénase (InVitrogen, Burlington, Ontario, Canada) à 37°C tel que décrit précédemment (Chevalier et al., 1984). Par la suite, les cellules étaient centrifugées à basse vitesse (800g) afin d'éliminer les débris. De façon générale, les cellules étaient directement mises en culture dans des pétris, à différentes densités selon les besoins expérimentaux. Les cellules étaient cultivées dans du milieu MEM (InVitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal dialysé (InVitrogen), 100 μ g/mL de streptomycine, 100 U/mL de

pénicilline et 0,1% d'amphotéricine B (Fungizone, In Vitrogen). La culture se poursuivait ainsi pendant 3 jours afin de permettre l'adhésion des cellules basales à l'aide de la vitronectine présente dans le sérum de veau fœtal dialysé (Chevalier and Chapdelaine, 1988). Il a été démontré qu'en culture primaire, les cellules basales adhèrent de façon préférentielle puis prolifèrent (Chevalier et al., 1981) en absence des stéroïdes sexuels (Chevalier et al., 1984) et ce malgré l'expression du récepteur des androgènes (Turcotte et al., 1988). Comme ces cellules prolifèrent activement en présence de FC contenus dans les sérums canin et humain (Chevalier et al., 1991; Chevalier et al., 1993), le milieu de culture était remplacé après 3 jours par du MEM contenant des antibiotiques et antifongiques et 10% de sérum de chien comme source de facteurs de croissance (Chevalier et al., 1981; Chevalier et al., 1991). Ce modèle avec ses caractéristiques de croissance androgéno-indépendante nécessitant l'apport de FC s'apparente à la situation des cellules prostatiques cancéreuses humaines indépendantes des androgènes. Des études antérieures ont permis de montrer des niveaux élevés de TK et de protéines phosphorylées sur tyrosine dans les cellules épithéliales basales en prolifération du modèle canin *in vivo* et *in vitro* (Tessier et al., 1989; Bourassa et al., 1991a; Nguyen et al., 1992; Landry et al., 1996).

Dans certaines expériences, les cellules fraîchement isolées étaient séparées par centrifugation de la suspension cellulaire contenant 27,5% de Percoll (Pharmacia, Montréal) à 20 000g pendant 30 minutes (min) de façon à former un gradient et obtenir en plus des globules rouges à la base du gradient, une bande de cellules épithéliales sécrétrices de faible densité et une autre des cellules basales, plus denses (Chevalier et al., 1980).

2.4. Lignées humaines

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées. Pour les fins de l'étude portant sur l'endogline, les cellules HOON ont été cultivées dans du RPMI-1640 (In Vitrogen) sans antibiotiques, contenant 10% de sérum de veau fœtal inactivé (Life Technologies, Gaithersburg, USA). Les fibroblastes humains provenant de résections mammaires obtenues par l'équipe du Dr. Philip du MUHC ont été mis en culture primaire dans du DMEM (In Vitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de glutamine, 100 µg/mL de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline (In Vitrogen). Les cellules 293 (fibroblastes de reins d'embryons humains) utilisées pour les transfections ont été fournies par le Dr. Durocher (IRB: Institut de Recherche en Biotechnologie, Montréal, Canada, Montréal). Elles ont été cultivées dans du DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal, 100 µg /mL de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline.

Plusieurs lignées parentales de cellules prostatiques cancéreuses humaines ont été établies à partir de métastases d'un CaP et ont été achetées de l'*American Type Culture Collection*, soient les cellules androgéno-indépendantes, PC-3 (Kaighn et al., 1979) et DU145 (Stone et al., 1978) et les cellules androgéno-sensibles LNCaP (Horoszewicz et al., 1983), qui dérivent respectivement de métastases osseuses, cérébrales, et ganglionnaires. Les lignées PC-3 et LNCaP ont permis d'obtenir d'autres sous-lignées avec des propriétés différentes et résumées au tableau 7.

Tableau 7. Principales caractéristiques des lignées des cellules cancéreuses prostatiques humaines

Nom	Origine	Expression APS	Récepteur androgène	Réponse aux androgènes	Tumorigénicité souris nue
LNCaP	ganglion	+	+	+	+/-
LNCaP-C4		+	+	+	+
LNCaP-C2		+	+	-	+
Du-145	système nerveux	-	-	-	+
PC-3	vertèbre	-	-	-	+
PC-3M		-	?	-	+
PC-3Pro4		-	?	-	+
PC-3LN4		-	?	-	+

La sous lignée PC-3M a été générée par l'injection de cellules PC-3 dans la prostate de souris nue et a produit des métastases dans le foie (Kozlowski et al., 1984). Elle a servi à produire les lignées PC-3MPro4 (isolées de la prostate) et PC-3MLN4 (métastases dans les ganglions lymphatiques) (Pettaway et al., 2000; Stephenson et al., 1992). Ces lignées ont été aimablement fournies par le Dr. I.J. Fidler (Houston, Texas, USA). La lignée LNCaP co-injectée avec des fibroblastes osseux chez la souris castrée a produit des tumeurs chimériques sous-cutanées d'où les lignées C4 et C4-2 ont été dérivées (Wu et al., 1994). Ces deux lignées nous ont été données par le Dr. L Chung (Charlottesville). Toutes ces cellules de CaP humain ont été cultivées dans du RPMI-1640 auquel était ajouté 10% de sérum de veau fœtal dialysé, 100 µg/mL de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline.

2.5. Lignée de cellules cancéreuses de prostate canine

La lignée androgéno-indépendante cancéreuse prostatique de chien, DPC1, a été établie et fournie par le Dr. Anidjar (Anidjar et al., 2001). Les cellules ont été cultivées dans le même milieu que celui des cellules humaines mais supplémenté avec 25 mM d' HEPES (acide N-(2-hydroxyméthyl)-1-piperazine éthane sulfonique) et 2 mM de glutamine.

2.6. Extraction des protéines des tissus prostatiques

De façon générale, les procédures liées à la préparation des protéines sont effectuées à 4 °C et les solutions sont toujours refroidies. Le tampon de solubilisation composé de 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM KCl, 2mM EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique), 2mM EGTA (acide éthylènebis(oxyéthylènenitrilo) tétraacétique), 5 mM de DTT, (dithiothreitol) 1 mM Na_3VO_4 et d'inhibiteurs de protéases (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'aprotinine, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptine et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pepstatine) a été ajouté aux morceaux de prostate dans une proportion de 4 volumes par gramme de tissu. La suspension était homogénéisée à l'aide d'un Polytron puis centrifugée dans un premier temps pendant 10 min à 3 000g afin d'enlever les débris cellulaires et les noyaux. Les surnageants obtenus étaient centrifugés de nouveau pendant 60 min à 105 000g afin d'obtenir la fraction membranaire dans le culot et les protéines cytosoliques solubles.

2.7. Extraction des protéines des cellules en culture

Les feuillets cellulaires préalablement placés sur glace étaient rincés trois fois avec un tampon phosphate salin (PBS) contenant 1 mM Na_3VO_4 et 100 μM de NaF. Les cellules étaient récupérées par grattage dans un tampon de solubilisation composé de 50 mM Tris-

HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 100 µM de NaF, 10 µg/mL d'aprotinine et 5 µg/mL de leupeptine. Les suspensions étaient maintenues à 4 °C pendant 30 min avec une agitation lente puis centrifugés pendant 10 min à 10 000g. Les surnageants étaient récupérés et conservés à -80 °C. La concentration de protéines de chaque échantillon a été déterminée par un essai protéique BCA (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL).

2.8. Extraction des protéines membranaires du placenta

Le placenta humain, généreusement fourni par le Dr Bégin (Hôpital Sacré-Cœur, Montréal) a été rapidement réduit en petits morceaux sur glace. Les échantillons ont ensuite été congelés à -80 °C jusqu'à leur homogénéisation au Polytron, tel que décrit ci-haut, dans un tampon de solubilisation froid composé de: 25 mM HEPES pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 200 mM KCl, 5 mM DTT, 0,1 mM Na₃VO₄ contenant des inhibiteurs de protéases (10 µg/mL d'aprotinine, 5 µg/mL de leupeptine, 5 µg/mL de pepstatine, 5 mM de benzamidine, 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl ou PMSF). Le surnageant était recueilli après une première centrifugation à 3 000g pendant 10 min et centrifugé de nouveau à 105 000g pendant 60 min. Le culot obtenu était resuspendu dans le même tampon de solubilisation mais supplémenté avec 0,5% de CHAPS (acide cyclohexylaminopropane sulfonique). Après une dernière centrifugation à 105 000g pendant 60 min, les protéines membranaires étaient recueillies dans le surnageant.

2.9. Stimulation des cellules

2.9.1. TGF β , neuropeptides, et agents chimiothérapeutiques

Le TGF β (R&D systems, Minneapolis, MN) a d'abord été dilué à une concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ dans une solution de 4 mM HCl contenant 0,1% d'albumine sérique de bœuf (BSA), aliquoté puis congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour les expériences, il a été dilué à une concentration de 40 pM dans du RPMI-1640 en absence de sérum et ajouté pour les périodes de temps indiqués aux cellules en feuillet atteignant 70 à 80% de confluence et préalablement privées de sérum pendant 24 h. Le contrôle négatif consistait en des cellules incubées dans le milieu RPMI-1640 sans le TGF- β 1. Après le traitement, les pétris étaient rapidement déposés sur la glace, le milieu était retiré, et les cellules étaient préparées pour l'extraction des protéines. Des cultures parallèles dans les mêmes conditions permettaient d'étudier les effets sur la croissance (décrit ci-après).

Les neuropeptides, tels que la bombésine (Sigma, St-Louis, MO), la calcitonine, la substance P et la katalcine (Bachem, Torrance, CA), ont été solubilisés selon les directives des fabricants et dilués selon les concentrations indiquées dans du RPMI-1640. Après 24 h de privation de sérum, les cellules étaient traitées aux neuropeptides pendant 10 min à 37°C , puis préparées pour l'extraction des protéines. Après une privation de sérum de 24 h, les cellules ont été traitées à l'interleukine 6 à 100 ng/mL pendant les temps indiqués. Différents agents chimiothérapeutiques et drogues ont été utilisés: taxol, vinblastine, vincristine, et colchicine (Sigma). Toutes les drogues étaient conservées à l'abri de la lumière. Le taxol et la vinblastine ont d'abord été solubilisés dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10 mM alors que la vincristine et la colchicine ont été

diluées dans l'eau respectivement à 10 et 100 mM. Au moment de l'expérience, les drogues étaient préparées à différentes concentrations dans le RPMI-1640 contenant 10% de sérum de veau fœtal dialysé et appliquées aux cellules prostatiques cancéreuses, ayant atteint 80% de confluence 48 h après leur ensemencement, pendant les périodes de temps indiquées. Le traitement des cellules de chien avec les drogues chimiothérapeutiques ont débuté après le jour 3 de la culture primaire. Les effets ont été mesurés sur la croissance (test au MTT) de même que sur l'activité kinasique en gel (décrits ci-après).

2.9.2. Stéroïdes sexuels

Les cellules prostatiques de chien ont été traitées avec les stéroïdes à partir du jour 3 de la culture primaire et ce, pendant 4 jours. Le traitement des cellules consistait à l'ajout de 1 µg/mL de DHT ou de 1 µg/mL d'estradiol (E2) dans du MEM enrichi ou non de 10% de sérum de chien préalablement déplété des stéroïdes sexuels sériques *via* le charbon de bois (Chevalier et al., 1984). A la fin du traitement, les cellules étaient préparées pour l'essai d'activité kinasique en gel. Des cultures parallèles ont été réalisées dans les mêmes conditions afin de déterminer les effets sur la croissance par comptage des cellules (tel que décrit ci-après).

2.10. Mesure des fonctions cellulaires

2.10.1. Prolifération cellulaire: effets du TGF-β1 et des drogues chimiothérapeutiques

Les cellules humaines PC-3, PC-3M, PC-3Pro4, PC-3LN4 en suspension dans le RPMI-1640 complet ont été ensemencées dans des pétris de 30 mm à raison de 1 500 cellules/cm².

Après 72 h d'incubation, permettant l'adhésion et l'étalement cellulaire, les cellules ont été privées de sérum pendant 24 h et par la suite, traitées avec les concentrations indiquées de TGF- β 1. Le milieu était remplacé aux deux jours. Le compte cellulaire était déterminé aux deux jours à l'aide d'un hémacymètre après la trypsinisation des cellules avec une solution de trypsine-EDTA (In Vitrogen). La viabilité cellulaire était vérifiée par l'exclusion du bleu de Trypan. Le calcul du temps de doublement a été effectué à l'aide de l'équation de la courbe de croissance exponentielle.

Pour l'étude des effets des drogues chimiothérapeutiques et la colchicine, les cellules humaines PC-3 et LNCaP et canines ont étéensemencées dans des plaques NUNC de 96 puits à des densités respectives de 1 000, 10 000, et 20 000 cellules/0,2 cm². Après leur période d'adhésion et d'étalement, les cellules étaient traitées avec les différentes drogues aux concentrations et périodes de temps indiquées. A la fin de la culture, la croissance cellulaire était évaluée par la méthode du MTT (bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl) 2,5-diphényl-tétrazolium) basée sur l'action de la déshydrogénase mitochondriale sur le substrat MTT, formant ainsi des cristaux de formazan révélés à 540 nm. Brièvement, le MTT est ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 0,5 mg/mL. Les cellules ont été ensuite incubées pendant 4 h à 37°C. Après le retrait du milieu d'incubation, les cristaux de formazan ont été solubilisés à l'aide du DMSO et l'absorbance était déterminée à l'aide d'un lecteur de plaques, utilisant la lecture d'un puits avec le DMSO seulement comme contrôle de référence. Chaque point expérimental a été effectué en sextuplicata et les expériences ont été répétées trois fois.

2.10.2. Visualisation de l'apoptose

Les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture (*Lab-Tek, Permax Chamber Slide*, Nalgene Nunc International Corp., Naperville, IL). Après la période d'adhésion, les cellules ont été exposées aux drogues chimiothérapeutiques selon la méthode décrite ci-haut. Par la suite, le milieu de culture, les chambres, et les bordures de silicone ont été retirés et les cellules ont été incubées pendant 10 à 15 min en présence de l'annexine-V-FLUOS et d'iodure de propidium (*Annexin-V-Fluos*, Roche Diagnostics). Une goutte de milieu de montage pour la microscopie (*Immuno-FluoreTM*, ICN Biomedicals, Montréal, QC, Canada) a été ajoutée afin de préserver la fluorescence, puis les chambres ont été scellées avec une lamelle. Les cellules ont été visualisées au moyen d'un microscope inversé Olympus IX-80 et le traitement des images a été effectué avec le logiciel ImageProPlus (Media Cybernics).

Les noyaux des cellules ont été visualisés par leur coloration au DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride). Les cellulesensemencées dans les chambres de culture ont été lavées dans le PBS puis perméabilisées avec du Triton 0,1% dans du PBS. Après la fixation des cellules à l'aide de la paraformaldéhyde 4% pendant 10 min à 25 °C, elles ont été incubées avec une solution de 10 µg/mL de DAPI (Roche Diagnostics) pendant 30 min. Après les lavages, les lames ont été montées à l'aide d'une solution de 50% de glycérol dilué dans le PBS. La fluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope Diaplan Leitz.

2.10.3. Synchronisation des cellules

Les cellules PC-3 en suspension dans du RPM1-1640 contenant 10% de sérum fœtal dialysé ont étéensemencées à une densité de 3 000 cellules /cm² dans des pétris de 100 mm et cultivées pendant 48 h. La synchronisation des cellules débutait par 48 h de privation de sérum, suivie d'une incubation de 24 h dans du RPM1-1640 contenant 10% de sérum auquel était ajouté soit 5 µg/mL d'aphicoline (Sigma), 150 ng/mL de nocodazole (Sigma) ou 600 µM de mimosine (Sigma) (Merrill, 1998).

A la fin du traitement, les cellules ont été lavées dans du PBS, trypsinisées et centrifugées pendant 5 min. Pour les fins d'analyse en cytométrie en flux, une aliquote de 1x10⁶ de cellules a été traitée avec 20 µg/mL de Rnase (Sigma) pendant 30 min suivie d'une incubation de 30 min avec 20 µg/mL d'iodure de propidium. Les cellules ont été analysées au cytomètre en flux et leur distribution dans le cycle cellulaire mesurée à l'aide du logiciel ModFiLT. La partie restante des cellules a été utilisée pour vérifier l'activité de c-tak1 par l'essai kinasique en gel (voir section 2.14).

2.11. Stratégies moléculaires

2.11.1. Extraction d'ARN, RT-PCR, et analyses par Northern blot

L'ARN total a été extrait à partir des cellules épithéliales prostatiques de chien en culture primaire, des cellules prostatiques DPC-1, PC-3, LNCaP et des cellules HOON en utilisant le Trizol (Life Technologies) selon les recommandations du manufacturier. Par la suite, l'ARN a été digéré avec de la DNase 1 (Promega, Nepean Ontario) à raison de 1-2 U/µg

d'ARN dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂ pendant 30 min à 37°C. La qualité de l'ARN a été vérifiée sur un gel d'agarose 0,8%.

L'ARN total a été transcrit en ADNc dans un tampon de réaction pour la reverse transcriptase (RT) 1X contenant 50 U d'enzyme Expand RT (Roche), 20 pmoles d'hexamères, 10 mM DTT, 10 mM de chacun des nucléotides dATP, dCTP, dGTP, et dTTP dans un volume de 20 µL selon un programme de 10 min à 30 °C, suivi de 45 min à 42 °C. Par la suite, les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume de réaction de 50 µL composé d'un tampon PCR 1X contenant de 1,5 mM MgCl₂, 2,6 U d'enzyme *Expand High Fidelity* (Roche Diagnostics), 0,2 mM de chacun des dNTP (désoxynucléotide triphosphate) et 0,1 mM de chacune des amorces sélectionnées.

La détermination des transcrits de p78 (*Genbank # M80359*), c-tak1 (*Genbank # U64205*) et c-tak75a (*Genbank #AF159295*) a été réalisée à l'aide de deux séries de paires d'amorces (InVitrogen) afin de: 1-discriminer entre les transcrits de c-tak1 et p78 avec la paire d'amorces S1 S (5'-CGATGAAATCACAGCTA-3' et AS (5'-CCTTCTGTTGTTGTGGCGTATC-3') correspondant respectivement aux nucléotides de 1437-1453 et 1654-1672 qui permet de générer des fragments de 235 paires de base (pb) pour c-tak1/kp78/mark3 et de 187 pb pour p78; 2-distinguer entre les transcrits c-tak75a et c-tak1/kp78/mark3 avec la paire d'amorces S2 S (5'-GTGGAGGTGAAGTATTTG-3' et AS 5'-GTTTCATATCGGCATCTAAC-3') se positionnant respectivement aux nucléotides 782-799 et 930-948 qui génère des fragments de 235 pb pour c-tak75a et 166 pb pour c-tak1/kp78/mark3. Les réactions de PCR ont été effectuées selon un programme de 40

cycles de 1 min à 94 °C, 30 secondes à 58 °C, 1 min à 72 °C, se terminant par une phase d'élongation de 7 min à 72 °C. Les produits de PCR ont été vérifiés au moyen d'une électrophorèse sur un gel d'agarose 2% et visualisés par la coloration au bromure d'éthidium.

Pour les analyses des transcrits d'endogline et de *c-tak1* par Northern, l'ARNm a été isolé et purifié au moyen de la trousse *Oligotex Direct mRNA Mini Kit* (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). L'ARNm (5 µg) a été séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1% contenant du formaldéhyde et transféré par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche Diagnostics). L'hybridation a été effectuée selon les recommandations du manufacturier (Roche Diagnostics) en utilisant une sonde d'ARNc d'*endogline* ou de *c-tak1/kp78/mark3* marquée à la digoxigénine (DIG). Les transcrits ont été révélés *via* l'utilisation d'un ensemble de détection CDP-star (Roche Diagnostics), basé sur la luminescence.

La sonde d'ARNc de l'*endogline* a été synthétisée par la transcription *in vitro* d'un fragment de 293 pb d'*endogline* (acides aminés 322-419) sous-clonée dans le vecteur pGEM3Z (Promega, Nepean, Ontario, Canada). Ce fragment a été préalablement obtenu par la digestion de l'ADNc de l'*endogline* à l'aide des enzymes de restriction *Pst-1* et *Sac1* dans le vecteur pUC13. Après linéarisation du vecteur pGEM3Z avec l'enzyme *Sac1*, l'ARN a été synthétisé à l'aide de la polymérase ARN SP6 et des dNTP incluant le nucléotide uridine-DIG triphosphate, produisant la sonde anti-sens. La sonde contrôle sens a été préparée avec la polymérase ARN T7 après la linéarisation du vecteur avec l'enzyme

Pst-I. La taille et la concentration des sondes ont été vérifiées respectivement, *via* la visualisation de la sonde sur un gel d'agarose et l'analyse par immunobuvardage avec des sondes contrôles de concentrations connues. Les sondes obtenues ont été solubilisées dans de l'eau traitée au diethylpyrocarbonate contenant 1% de sodium dodecyl sulfate (SDS) et congelées à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Les sondes d'ARNc de *c-tak1/kp78/mark3* ont été produites par la transcription d'un fragment de 557 pb (acides aminés 38-222) après linéarisation du vecteur pGEM3Z avec l'enzyme *Sall* pour la sonde anti-sens et *EcoRI* pour la sonde contrôle. Le contrôle de la quantité d'ARN présente dans la membrane a été vérifié à l'aide d'une sonde commerciale d'actine marquée à la digoxigénine (Roche Diagnostics).

2.11.2. Production de la protéine recombinante c-tak1/kp78/mark3 Myc-His

2.11.2.1. Amplification de *c-tak1/kp78/mark3*

La séquence codante complète de *c-tak1/kp78/mark3* a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces S 5'-AGCTTGGTACCGCCGCGCCATGTCCACTAGGACCCCAT-3' (correspondant aux nucléotides 376-394) comprenant un site de restriction pour l'enzyme *KpnI* et AS 5'-ACTCGAGCGGCCGCAGCAGCTTTAGCTCATTGGCAAT-3' (correspondant aux nucléotides 2542-2559) incluant un site de restriction pour l'enzyme *NotI* (InVitrogen). La taille de l'amplicon attendu est de 2,2 kb. La réaction de PCR a été réalisée en utilisant le système *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics) selon un programme de 1 cycle de 2 min à 94 °C, 30 secondes à 25 °C, 2 min à 72 °C; 10 cycles de 15 secondes à 94 °C, 30 secondes à 62 °C, 2 min à 72 °C, avec une augmentation

de la phase d'élongation de 20 secondes à chacun des cycles, se finalisant par un temps d'élongation de 7 min à 72 °C. Le produit amplifié a été digéré à l'aide des enzymes *KpnI* et *Not I* et cloné dans le vecteur pcDNA3.1 Myc-His (Invitrogen).

2.11.2.2. Expression de la protéine dans les cellules de mammifères

Les cellules 293 ont été transfectées de façon transitoire en utilisant la lipofectamine (Life Technologies) avec le vecteur pcDNA3.1Myc-His contenant l'ADNc de *c-tak1kp78/mark3* ainsi que le vecteur pcDNA3.1 Myc-His vide comme contrôle négatif. Les cellules ont été lysées 48 h après la transfection pour extraire les protéines afin d'analyser l'expression de *c-tak1/kp78/mark3* par immunobuvardage et l'essai kinasique en gel.

2.11.3. Clonage d'un fragment de c-tak1/Kp78/mark3 dans le vecteur de fusion génique

Afin de produire la protéine de fusion, un fragment de *c-tak1/kp78/mark3* a d'abord été introduit dans le vecteur de fusion génique. Ce dernier de la taille de 1253 pb a été produit par PCR à l'aide de la paire d'amorces S 5'-GCGCAGCTTGAATTCCCATGAAGAAGATGAACTCAAACC-3' comprenant un site de restriction *EcoRI* et AS 5'-GCGCACTCGAGTCGACTTACAGCTTTAGCTCATTGGCAAT-3' (positions des nucléotides S 1306-1328 et AS 2542-2559) ayant un site de restriction *Sall*, à partir du vecteur pCR-Script SK (+) (Stratagene, La Jolla, CA) dans lequel était cloné l'ADNc de *c-tak1/kp78/mark3*. Les conditions de PCR sont identiques à celles décrites précédemment utilisant le programme suivant: 2 min à 94 °C, 30 secondes à 25 °C, 2 min à 72 °C et 9 cycles de 15 secondes à 94 °C, 30 secondes à 58 °C, 2 min à 72 °C, suivis de 4 cycles de 15 secondes à 94 °C, 30 secondes à 58 °C, 2 min à 72 °C augmentant de 20 secondes par cycle

pour se terminer par une élongation de 7 min à 72 °C. La taille du fragment obtenu a été vérifiée sur un gel d'agarose de 1% puis les bandes correspondant au fragment ont été excisées et éluées du gel en utilisant la trousse *GeneClean* (BIO 101 Vista CA). Le fragment a été par la suite cloné dans le vecteur de fusion PGEX-4T-3 et transformé dans les bactéries compétentes XL150 blue (Stratagene). Des pétris d'agar-ampicilline ont été inoculés avec les bactéries transformées et incubés pendant une nuit à 37 °C. Les colonies ont été retirées et placées individuellement dans une solution de LB composée de 1% de tryptone, 0,5% d'extrait de levures et 0,5% de NaCl en présence de 50 µg/mL d'ampicilline pendant 18 h sous agitation à 37 °C. Les plasmides de chacune des cultures bactériennes ont été isolés au moyen d'un kit de purification *Qiaprep Spin Miniprep* (Qiagen). L'ADN purifié a été analysé sur un gel d'agarose 0,8% après la digestion des plasmides avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *Sall*. Les cultures bactériennes dont les plasmides ont intégré c-tak1/kp78/mark3 ont été conservées dans du glycérol (1:1, v/v) à -80 °C.

2.11.3.1. Induction du vecteur PGEX-4T-3-c-tak1/Kp78/mark3

Les bactéries contenant le vecteur PGEX-4T-3-c-tak1/kp78/mark3 ont été incubées dans 5 mL de LB supplémenté avec 50 µg/mL d'ampicilline pendant 18 h. Par la suite, cette culture a été ajoutée à 500 mL de LB contenant l'ampicilline et incubée à 30 °C jusqu'à l'atteinte de la phase de croissance logarithmique (densité optique à 600 nm de 0,6-0,7). L'expression de la protéine de fusion a été induite avec les concentrations d'isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG) suivantes: 0,1, 0,3, 0,5, 1, 10 et 100 mM pendant 2 ou 4 h jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 1,2-1,3. Après une centrifugation à 3 000g pendant 10 min, les culots de bactéries ont été resuspendues dans 5mL de PBS, congelées à

-80 °C pendant au moins 1 h, dégelées, et lysées sur glace par sonication pendant 10 secondes et ce, à quatre reprises. Du Triton-X-100 a été ajouté à une concentration finale de 1% et la solution a été agitée doucement pendant 20 min. Le lysat a été clarifié par centrifugation. Le culot a été solubilisé dans une solution d'urée 8 M, 50 mM Tris-HCl; pH 8.0 et 1 mM EDTA. L'induction de l'expression de la protéine de fusion a été vérifiée dans le surnageant et le culot par visualisation du gel d'électrophorèse au bleu de Coomassie.

2.11.4 Établissement de la lignée stable Tet-On

La transfection stable des cellules PC-3 a été effectuée à l'aide du *Superfect* selon le protocole fourni par la compagnie en utilisant 40 µg du plamide pTet-On contenant un élément de résistance au G418. La sélection des cellules résistantes débutait 2 jours après la transfection par l'ajout de 1 200 µg/mL de G418 et le milieu était remplacé aux 4 jours. Après 1 mois de culture, des colonies étaient apparues et ont été récupérées de façon isolée à l'aide des cylindres de clonage. Chaque colonie a étéensemencée dans un pétri de 30 mm et multipliée afin de tester son potentiel d'induction en réponse à la présence de doxycycline. Ceci fut vérifié par la capacité d'induction des clones par un essai de la β-galactosidase suivant leur transfection transitoire avec le plasmide pBI-G qui exprime le gène rapporteur de la β-galactosidase. Le jour suivant la transfection, un groupe contrôle de cellules transfectées a été incubé sans doxycycline et 1 µg/mL de doxycycline a été ajouté au deuxième groupe de cellules provenant du même clone. Par la suite, 48 h après la transfection transitoire, les cellules ont été lavées au PBS puis récupérées par grattage. Après une courte centrifugation à 4 °C, le surnageant a été retiré et le culot de cellules a été resuspendu dans un tampon contenant 0,1% Triton X-100. L'essai enzymatique consistait

en 30 μ L d'extrait cellulaire, 66 μ L d'o-nitrophényl- beta-D-galactopyranoside (ONPG) 1X (4 mg/mL), 3 μ L de tampon Mg 100 X ($MgCl_2$ 10 mM, 50 mM β -mercaptoéthanol), et 210 μ L de tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7.4. Le contrôle positif a été préparé avec 1 μ L d'enzyme β -galactosidase (Sigma), 66 μ L d'ONPG, 3 μ L de tampon Mg et 229 μ L de tampon phosphate. Le contrôle négatif consistait en un mélange de 66 μ L d'ONPG, 3 μ L de tampon Mg, et 230 μ L de tampon phosphate. Les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 30 min et la densité optique (lue immédiatement) à 410 nm a été exprimée en U/mg protéines. Les clones stables Tet-On (30) ont été utilisés pour transférer l'ADNc de c-tak1/kp78/mark3.

2.11.4.1. Développement des lignées doubles stables Tet-On c-tak1/kp78/mark3

L'introduction des vecteurs pTRE-c-tak1/kp78/mark3 et pTK-Hyg permettant la sélection des nouveaux clones *via* l'hygromycine a permis d'établir des clones PC-3 doubles stables. Auparavant, l'insert c-tak1/kp78/mark3 a été cloné dans le vecteur pTRE au site de restriction Sac II suivi de la ligation du vecteur et de la transformation dans les bactéries compétentes. Les plasmides recombinants ont été identifiés au moyen de leur digestion par les enzymes de restriction *SacII*. La procédure de la co-transfection des lignées cellulaires inductibles avec le vecteur pTRE-c-tak1/kp78/mark3 et le vecteur de sélection pTK-Hyg était identique à celle décrite pour celle du vecteur Tet-On. Cependant, la sélection des clones résistants était effectuée par l'ajout dans le milieu de 100 μ g/mL d'hygromycine. Les clones obtenus ont été testés en présence et en absence de doxycycline pour l'induction de l'activité kinasique de c-tak1/kp78/mark3. Les clones retenus (15) ont été congelés dans une solution de 90% sérum de veau fœtal et 10 % de DMSO à -170 °C.

2.12. Production des anticorps avec des peptides de synthèse

Les peptides synthétiques SHGDGRQEVTSTRSGARC correspondant aux acides aminés 20-39 de la séquence de c-tak1/kp78/mark3, de p78 et de c-tak75a ainsi que LDASDSSSSNLSLAK spécifique à c-tak1/kp78/mark3 ont été couplés à des chaînes de polylysine pendant leur synthèse (IRB, Montréal, Canada). Ils ont été utilisés pour produire des anticorps polyclonaux chez le lapin (2 animaux femelles par peptide), après avoir prélevé des échantillons de sérums pré-immuns. Les peptides (émulsion de 1 mg dans l'adjuvant complet de Freund) ont été injectés par voie sous-cutanée. Des doses de rappel (émulsion de 500 µg avec l'adjuvant incomplet de Freund) ont été administrées à des intervalles de deux semaines. Des vérifications périodiques du titre des anticorps par des essais immuno-enzymologiques (ELISA) ont été effectuées et les lapines ont été sacrifiées lorsque le titre a atteint au moins un million (généralement moins de 3 mois).

2.12.1. ELISA

Le test ELISA permet de mesurer la valeur du titre des anticorps *via* la détection des complexes anticorps-antigène par un anticorps secondaire couplé à une enzyme. Dans le cas présent, les peptides ou antigènes (0,5 µg) dilués dans un tampon glycine 5 mM pH 9.2 ont d'abord été fixés dans les puits d'une plaque à 96 puits pendant une nuit à 4 °C. Après 3 lavages au PBS, les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de PBS contenant 3% de BSA/PBS pendant 60 min. Les sérums immuns, aux concentrations indiquées, ont été ajoutés dans les puits et incubés pendant 1 h à 25 °C. Suivant 3 lavages au PBS, l'anticorps secondaire (IgG anti-lapins levés chez le cobaye couplés à l'enzyme peroxydase au RAIFORT; dilution 1/2 000, Pierce) a été ajouté et incubé pendant 1 h à 25

°C. Les complexes immuns ont été révélés à l'aide d'une solution contenant le substrat soit le o-phénylenediamine dihydrochloride (4%), 30% de peroxyde d'hydrogène dans le tampon glycine, pH 2. La réaction était arrêtée par l'ajout de 25 µL par puit d'acide sulfurique 4,5 N. Les produits des réactions ont été lus à 450 nm au moyen d'un lecteur de plaques ELISA.

2.12.2. Purification des anticorps

Dans certaines situations, les immunoglobulines G (IgG) ont été purifiées sur une colonne de protéine G ou A selon qu'il s'agira respectivement d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux. La colonne était d'abord équilibrée avec un tampon TTBS composé de: 0,3 M NaCl, 20 mM TrisHCl, pH 7.8, 0,1% (v/v) Tween-20 et 0,01% NaN₃ contenant du NaCl à une concentration finale de 0,5 M. Le sérum ou les surnageants d'hybridomes contenant les anticorps monoclonaux étaient absorbés dans la résine pendant 1 h. La colonne était par la suite lavée dans 3 volumes de TTBS. Les anticorps ont été élués à l'aide du tampon glycine 0,2 M, pH 2.8, contenant 0,02% NaN₃ et recueillis dans des tubes contenant un tampon de neutralisation 1 M Tris, pH 8.5. Chacune des fractions était lue au spectrophotomètre à 280 nm et les fractions correspondant au pic d'éluion ont été regroupées en une seule aliquote. Par la suite, la fraction contenant les anticorps a été concentrée à l'aide de filtres de centrifugation de type Centricon (Millipore, Nepean, Ontario, Canada). La quantité d'IgG a été évaluée par le dosage de protéines à l'aide d'une trousse de dosage BCA. Les anticorps purifiés ont été conservés en aliquotes à -80 °C. Les titres des anticorps étaient évalués à l'aide du test ELISA décrit dans la 2.12.1.

2.12.3. Vérification de la spécificité des anticorps

La spécificité des anticorps obtenus a été vérifiée à l'aide de la protéine recombinante c-tak1/kp78/mark3 par immunobuvardage et essai d'activité kinasique en gel.

2.13. Analyse de l'expression des protéines

2.13.1. Détection d'antigènes de surface: l'endogline

La détection de l'endogline à la surface de la cellule a été réalisée par cytométrie en flux avec un cytomètre de type *dual-laser FACSCalibur™ flow cytometer* (Becton Dickison). Les cellules ont d'abord été récupérées par trypsinisation rapide, lavées dans du PBS, et centrifugées à 2 000g pendant 3 min. Par la suite, les cellules ont été incubées avec l'anticorps 44G4 (fourni par le Dr Sylvie St-Jacques) à une concentration de 10 µg/mL pendant 30 min à 4 °C. Les cellules ont été lavées de nouveau avec le PBS 3 fois puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine à une dilution de 1/50 (v/v) pendant 20 min à 4 °C. Après les derniers lavages avec le PBS, les cellules ont été transférées dans un tube d'analyse et la fluorescence a été mesurée. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel d'acquisition et d'analyse des données *CellQuest™*.

2.13.2. Détection des protéines totales

2.13.2.1. Immunoprécipitations

Pour minimiser les interférences non spécifiques, les extraits protéiques (500 µg) étaient d'abord incubés avec 20 µL de billes de protéine G sépharose (50% v/v, Pharmacia) pendant 1 h pour ensuite récupérer le surnageant après centrifugation à 10 000g. Les extraits étaient par la suite incubés soient avec les anticorps primaires (12,5 µL d'antisérum

mark, 2,5 μ L d'anticorps anti-myc (clone 9E10.2, InVitrogen), 20 μ L d'anticorps anti-Cdc25C (Transduction Laboratories, Lexington, KY) pendant une nuit, à 4 °C. Les IgG pré-immuns de lapin (sérums pré-immuns prélevés au laboratoire), de souris (Sigma), utilisés à la même concentration que les anticorps servaient de contrôle. Une suspension de protéine G sépharose (20 μ L; 50% v/v) était ajoutée aux extraits et l'incubation se poursuivait pendant 2 h à 4 °C. Les complexes immuns étaient récupérés par centrifugation à 10 000g, lavés trois fois avec le tampon d'extraction des protéines cytosoliques et resuspendus dans le tampon de Laemmli pour l'analyse par électrophorèse.

2.13.2.2. Électrophorèse

Les échantillons provenant d'extraits protéiques totaux (30 μ g) ou d'immunoprécipités étaient dilués dans le tampon d'électrophorèse (62,5 mM Tris-HCl 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% β -mercaptoéthanol et 0,001% de bleu de bromophénol) et chauffés à 100 °C pendant 3 min. Les protéines étaient par la suite déposées sur un gel d'acrylamide de concentration de 4% (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,1% SDS) puis séparées sur un gel d'acrylamide (375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0,1% SDS) de concentrations variées selon la protéine étudiée (7,5% pour c-tak/kp78/mark3, Cdc25C et la tubuline; 9% pour l'endogline, 5% pour la protéine MAP4). Le tampon d'électrode (SDS-PAGE) était constitué de 192 mM glycine, 50 mM Tris, 0,1% SDS et les protéines ont été séparées avec un courant électrique de 25 mA/gel.

Dans certaines expériences, l'électrophorèse se déroulait façon semblable mais en conditions non dénaturantes, i.e. en absence de SDS et de β -mercaptoéthanol, autant dans

les échantillons que dans les gels d'acrylamide. De plus, certains échantillons ont été traités dans un tampon d'électrophorèse non réducteur soit en absence de β -mercaptoéthanol, avec ou sans étape de chauffage.

2.13.2.3. Transfert des protéines

La séparation des protéines terminée, le gel d'acrylamide était rincé dans le tampon de transfert (192 mM glycine, 25 mM Tris, 20% méthanol) et les protéines étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, Life Science, Mississauga, Ontario, Canada) à 100 mA pendant 1 h à 4 °C. Dans certains cas, lors du transfert de protéines de haut poids moléculaire, 0,1% de SDS était ajouté au tampon de transfert et le temps de transfert était augmenté de 2 h. La migration et le transfert des protéines ont été vérifiés par la coloration de la membrane au rouge de Ponceau S (0,2% (p/v), 3,5% d'acide trichloracétique (TCA) puis les membranes ont été décolorées avec le tampon TTBS (0,05% Twen-20, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl).

2.13.2.4. Immunobuvardage

Les sites non spécifiques étaient bloqués par l'incubation de la membrane dans une solution de 5% de lait écrémé dans du TTBS pendant 1 h sous agitation douce. Les membranes ont été incubées avec les anticorps appropriés (voir le tableau 8 pour les concentrations) pendant 2 h à 25 °C avec agitation, exception faite des anticorps anti-endogline nécessitant 18 h d'incubation à 4 °C. Après trois lavages dans la solution TTBS, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de RAIFORT était ajouté et la membrane était incubée de nouveau pendant 1 h. Faisant suite aux lavages dans le tampon TTBS, les bandes ont été révélées

avec un système de chimiluminescence (ECL, Amersham Bio Sciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) selon les recommandations du manufacturier. Le signal a été capté au moyen de films Kodak.

Tableau 8. Immunobuvardages: types et concentrations d'anticorps

Protéine	Type	Concentration	Compagnie
Cdc25C	IgG lapin	0,2 µg/mL	Santa Cruz
Tubuline	IgG ₁ souris	1,0 µg/mL	Sigma
Myc	IgG ₁ souris	1/2000*	InVitrogen
MAP4	IgG souris	0,25µg/mL	Transduction Laboratories

* La concentration initiale est non fournie par la compagnie. Une dilution 1/2 000 a été utilisée.

2.14. Activité kinasique

Une technique permettant d'étudier l'activité de kinases dans un gel d'acrylamide a été élaborée dans le laboratoire (Durocher et al., 1992). Brièvement, elle consiste après l'électrophorèse des protéines (totales ou immunoprécipités) à débarrasser le gel du SDS *via* deux lavages dans une solution de 50 mM imidazole, 28 mM d'acide iminodiacétique, le premier contenant 20% de 2-propanol et l'autre sans 2-propanol mais contenant 10 mM de β-mercaptoéthanol. Les protéines présentes dans le gel sont alors dénaturées avec 8 M de guanidine-HCl pendant 90 min puis renaturées pendant 18 h à 4 °C dans une solution de renaturation (25 mM imidazole, 14 mM acide iminodiacétique, 20 mM KCl, 10 mM β-mercaptoéthanol, 0,04% Tween-20, 10% sucrose (p/v)). L'ajout de 300 µCi d'ATP-γ³²P (3 000 Ci/mmmole, Amersham) dans un tampon de phosphorylation (10 mM HEPES_{pH} 7.4, 10 mM β-mercaptoéthanol, 20 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 100 µM Na₃VO₄) pendant 2 h

permettait alors de mettre en évidence l'activité de phosphorylation des kinases renaturées. L'excès de phosphate radioactif était enlevé par des lavages successifs (4 volumes de 1000 mL) au moyen d'une solution de 5% (p/v) TCA, 1% (p/v) $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1% (p/v) NaH_2PO_4 . Les gels ont été par la suite équilibrés dans du méthanol 10% (v/v), colorés au bleu de Coomassie 0,1% (p/v) dans 10% méthanol et 10% acide acétique, puis séchés. La quantité d'IgG déposée sur gel après immunoprécipitation a été vérifiée par coloration au bleu de Coomassie. Les gels ont été soumis à l'autoradiographie et/ou à l'analyse par *phosphoimaging*. L'analyse densitométrique a été effectuée à l'aide du logiciel *ImageQuant* (Molecular Dynamics).

2.15. Analyse des acides aminés phosphorylés

Afin de déterminer la nature des enzymes renaturées, les bandes ont été découpées du gel et homogénéisées dans 1% SDS. Les protéines ont été précipitées pendant la nuit dans 6 volumes d'acétone froide, puis récupérées par centrifugation à 14 000g pour l'hydrolyse acide (6 N HCl, 90 min à 110 °C). Les acides aminés phosphorylés ont été purifiés sur des colonnes Sep-Pak C-18 et QMA (Millipore), tel que décrit (Durocher and Chevalier, 1994) puis après l'ajout de chacun des acides aminés phosphorylés (pSérine, pTyrosine, pThréonine) non marqués (4 µg) comme traceurs, ils ont été séparés par électrophorèse bi-dimensionnelle (première dimension pH 1.9 dans 2,5% d'acide formique, 7,8% d'acide acétique; deuxième dimension, pH 3.5 dans 0,5% de pyridine, 5% d'acide acétique) sur couche mince. La présence des acides aminés standards et ceux phosphorylés marqués a été respectivement déterminée par coloration à la ninhydrine et l'exposition des plaques de cellulose à un film en présence d'un écran intensifiant (Durocher and Chevalier, 1994).

2.16. Analyse des interactions protéine-protéine

Les expériences de co-immunoprécipitations ont été réalisées sur des échantillons préalablement incubés avec des billes de protéines G sépharose afin d'éliminer les interactions non spécifiques des protéines avec les billes. Le tableau 9 résume les différentes combinaisons d'analyse des immunoprécipités qui ont été réalisées par immunodétection couplée ou non à l'essai kinasique de c-tak1/kp78/mark3.

Tableau 9. Combinaison des anticorps pour l'analyse des interactions protéine-protéine

Interaction protéine-protéine	Immunoprécipitation	Immunodétection	Essai kinasique
C-tak1/kp78/mark3-tubuline	anti-mark	tubuline	+
	anti-tubuline	+	oui
C-tak1/kp78/mark3-MAP4	anti-mark	MAP4	+
	*anti-MAP4	-	
C-tak1/kp78/mark3-Cdc25C	anti-Cdc25C	+	oui
	anti-mark	Cdc25C	+

*** L'anticorps anti-MAP4 ne fonctionne pas pour l'immunoprécipitation**

2.17. Analyses statistiques

Les variations de niveaux de c-tak1/kp78/mark3 ont été analysées à l'aide du logiciel *ImageQuant* (Molecular Dynamics) et comparé en utilisant le test t *Student two-tailed*. Les différences sont considérées significatives lorsque $P < 0,05$. Les courbes de cytotoxicité et les temps de doublement des cellules ont été analysés à l'aide du logiciel *Prism* selon

respectivement l'équation de la courbe dose-réponse et l'équation de la courbe de croissance exponentielle. Les courbes de croissance des cellules ont été comparées par l'analyse de la covariance (*Anova two-way*) et les effets de FC sur la prolifération cellulaire ont été évalués par le test de variance (*Anova one-way*).

3. Résultats

La section résultats se divise comme suit:

Expression de l'endogline

Volet 1: Le rôle de l'endogline dans les cellules stromales de l'utérus de souris

L'endogline est un récepteur du TGF β dont l'expression peut moduler les effets du TGF β .

Les résultats du volet 1 sont présentés dans l'article suivant: *Characterization of endoglin on mouse uterine stromal cells.*

Volet 2: L'endogline dans les cellules prostatiques

Typiquement, l'endogline est exprimée dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules du système immunitaire. L'expression différentielle de l'endogline dans les cellules prostatiques cancéreuses pourrait expliquer les effets du TGF β sur leur croissance dans le CaP. Ces travaux ont permis aussi d'identifier la présence de l'endogline dans des cellules microvasculaires humaines et ont favorisé un travail en collaboration avec le Dr Philip dont l'article publié: *Endoglin expression on human microvascular endothelial cells: association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- β signalling receptors* a été placé en annexe I à la fin de cette thèse.

Caractérisation de c-tak1/kp78/mark3

Études de l'expression, de la régulation et de partenaires de signalisation de la kinase c-tak1/kp78/mark3 dans les cellules prostatiques.

3. 1. Expression de l'endogline

Les travaux sur l'endogline ont été réalisés dans le contexte de son rôle de récepteur accessoire du TGF β , qui lorsque exprimé, s'associe au complexe formé des récepteurs I et II du TGF β et module les effets du TGF β sur les fonctions cellulaires.

3.1.1. Volet 1: Le rôle de l'endogline dans les cellules stromales de l'utérus de souris

Les études préliminaires du Dr St-Jacques indiquant des niveaux particulièrement élevés du transcrit de l'endogline dans les cellules stromales des tissus utérins ainsi que sa co-localisation *in situ*, avec le TGF- β 1 sécrété dans le stroma utérin ayant suggéré un rôle de l'endogline dans la médiation des effets du TGF β dans l'utérus, nous avons développé un modèle d'étude chez la souris.

Les résultats de ces travaux ont été publiés dans un article identifié sous le titre de *Characterization of endoglin on mouse uterine stromal cells* et sont présentés ci-après. Brièvement, les cellules stromales utérines de souris ont été isolées et cultivées pendant 3 jours pour ensuite être purifiées en se basant sur le critère de l'expression de l'endogline à leur surface *via* leur affinité envers l'anticorps MJ17/18 spécifique à l'endogline de souris. L'analyse de l'expression de l'endogline par cytométrie en flux a révélé que 60% des cellules exprimaient l'endogline à leur surface. Nous avons effectué le tri de ces cellules et généré une population de cellules hautement purifiée, où 99% des cellules étaient positives pour l'expression de l'endogline. Ces cellules ont été ré-ensemencées et les anticorps ont été relâchés après quelques heures de culture. Nous avons démontré que ces cellules en

culture primaire conservent l'expression de l'endogline pendant 10 jours, période pendant laquelle les études fonctionnelles de l'endogline ont été réalisées.

Les premiers tests sont de vérifier la capacité de l'endogline exprimée à la surface des cellules stromales à lier le TGF- β 1 et de former un complexe avec les récepteurs I et II. Pour ce faire, un marquage par affinité des cellules est réalisé à l'aide du ^{125}I -TGF- β 1, suivi du pontage chimique des complexes formés et de l'analyse des protéines marquées après électrophorèse. L'autoradiographie révèle 4 bandes majeures de PM de 49, 67, 80-90 et > 150 kDa. Des essais de compétition avec le TGF- β 1 non marqué montre que seuls les complexes de 67, 80-90 et 150 kDa sont spécifiques. Leurs caractéristiques de migration et PM apparents rappellent ceux des récepteurs I, II et une large bande pouvant contenir à la fois le betaglycan et l'endogline (figure 3 de l'article publié). L'immunoprécipitation des complexes marqués avec l'anticorps anti-endogline MJ17/18 confirme la présence de l'endogline dans les complexes récepteurs du TGF β .

Le second aspect consiste à investiguer le rôle potentiel de l'endogline dans l'effet induit par le TGF β sur la prolifération des cellules stromales de souris. Les résultats d'incorporation de la thymidine tritiée en présence du TGF- β 1 montrent un patron de réponse biphasique. L'exposition des cellules stromales de souris à une concentration de 0,2 ng/mL de TGF β résulte en une augmentation de 20% de la synthèse de l'ADN et atteint un maximum de 60% en présence de 10 ng/mL (figure 4 de l'article publié). L'ajout de l'anticorps anti-endogline abolit cette stimulation de la synthèse d'ADN par le TGF β . La spécificité de l'effet du TGF β sur la stimulation de la synthèse de l'ADN est donc confirmée par l'utilisation d'anticorps bloquant la fonction du FC. Finalement, le traitement

des cellules stromales utérines avec différentes concentrations de TGF- β 1 ne modifie pas le niveau d'expression de l'endogline à la surface de ces cellules (figure 5 de l'article publié). Ma contribution a consisté à 1-isoler les cellules stromales de souris et les caractériser. Ces résultats constituent la figure 1 (a et b); 2-les purifier par cytométrie en flux, ce qui est représenté par la figure 2; et 3-mettre au point l'essai permettant la liaison du TGF β marqué avec l'endogline et son couplage au système récepteur, tel que présenté à la figure 3.

3.1.1.1. *Characterization of endoglin on mouse uterine stromal cells*

Ouellette M.-J., Hamel L., Tremblay N., Lamothe M., St-Jacques S. J. *Reprod. Fertil.*, 117, 229-239 (1999)

Characterization of endoglin on mouse uterine stromal cells

M.-J. Ouellette^{1,2}, L. Hamel³, N. Tremblay³, M. Lamothe¹ and S. St-Jacques^{2,4*}

¹Unité de Recherche en Ontogénie et Reproduction, Centre de Recherche du Centre Hospitalier, Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4G2; ²Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada;

³Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4; and ⁴Département d'Obstétrique et Gynécologie, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada

During the oestrous cycle and early pregnancy, the uterus undergoes a variety of morphological and physiological modifications involving uterine cell proliferation and differentiation as well as extensive tissue remodelling. Transforming growth factor β (TGF- β) has powerful effects on these events and thus is thought to have a critical role in uterine physiology. Endoglin is a transmembrane glycoprotein that binds TGF- β 1 and - β 3 and interacts with TGF- β signalling receptors to modulate many effects of this growth factor in different types of cell. Studies in mice revealed the highest concentrations of endoglin in the reproductive tract, notably on stromal cells of cyclic and pregnant uteri. The objective of the present study was to investigate the role of endoglin expressed on uterine stromal cells in binding TGF- β and in the cellular responses induced by this growth factor. Highly purified populations of uterine stromal cells were isolated by cell affinity to the monoclonal antibody MJ7/18, which is specific to mouse endoglin. Affinity labelling of these cells with ¹²⁵I-labelled TGF- β followed by immunoprecipitation with endoglin-specific polyclonal 1256:4b antiserum indicated that endoglin expressed at the surface of uterine stromal cells binds TGF- β 1 and interacts with TGF- β signalling receptors. Treatment of uterine stromal cells with different concentrations of TGF- β 1 induced a biphasic proliferative response and addition of MJ7/18 as well as neutralizing TGF- β antibodies showed endoglin to be a modulator of TGF- β -induced stromal cell proliferation. Given the importance of TGF- β in the regulation of uterine physiology, these results indicate a role for endoglin during uterine tissue remodelling and decidualization.

Introduction

The endometrium is a dynamic tissue that responds to steroids, cytokines and growth factors to accommodate, regulate and sustain developing embryos. Among these cytokines and growth factors, transforming growth factor β (TGF- β) appears to be critical to endometrial functions (for review see Godkin and Doré, 1998). TGF- β and its receptors are present in both cyclic and pregnant uteri in different species (Tamada *et al.*, 1990; Manova *et al.*, 1992; Chegini *et al.*, 1994; Roelen *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1994; Das *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 1998). Cyclic growth and tissue remodelling of the uterus occur throughout reproductive life during the oestrous cycle and trophoblastic invasion (Iwahashi *et al.*, 1996). TGF- β stimulates DNA synthesis in endometrial stromal cells, whereas it inhibits uterine epithelial cell proliferation (Rotello *et al.*, 1991; Hammond *et al.*, 1993; Marshburn *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1994; Dumont *et al.*, 1995). Tissue remodelling involves controlled enzymic degradation of extracellular matrix (ECM) (Bischof *et al.*, 1993; Rodgers *et al.*, 1994) as well as dynamic

temporal and spatial patterns of integrin expression, mirroring the changes in ECM proteins (Tabibzadeh, 1992; Lessey *et al.*, 1994). TGF- β stimulates the synthesis of laminin and collagen IV by endometrial stromal cells (Ueda *et al.*, 1992) and induces the expression of the α 1 β 1 collagen-laminin receptor at the surface of these cells (Grosskinsky *et al.*, 1996). TGF- β produced in the uterine stroma under the influence of progesterone mediates the suppression of epithelial metalloproteinases (Bruner *et al.*, 1995). Similarly, TGF- β 1 significantly influences the plasminogen-activating system in endometrial stromal cells (Ueda *et al.*, 1992; Sandberg *et al.*, 1997; Casslén *et al.*, 1998). During implantation, endometrial TGF- β 1 regulates the invasion of trophoblastic cells by modulation of their proteolytic activity and by promoting differentiation of invasive trophoblast into non-invasive multinucleated giant cells (Graham and Lala, 1992). Furthermore, TGF- β is a key molecule for the local suppression of immune effector cells in the uterus and thus for protection of the fetoplacental unit from rejection (Clark *et al.*, 1990).

TGF- β exerts its biological effects by binding to highly specific cell surface receptors including type I and type II receptors (T β RI and T β RII), as well as the type III receptor betaglycan (for review see Miyazono, 1997). T β RI and T β RII are related transmembrane serine-threonine kinases that

*Correspondence address: Ontogénie et Reproduction, Centre de Recherche du Centre Hospitalier, Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, 2705 boul. Laurier, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4G2.
Received 20 November 1998.

associate in the presence of ligand to mediate TGF- β signals (Wrana *et al.*, 1992). Betaglycan, a membrane-anchored proteoglycan without an intracellular kinase domain, presents the ligand to T β RII, thus enhancing cell responsiveness (Lopez-Casillas *et al.*, 1991, 1993). TGF- β first binds to T β RII, which is constitutively autophosphorylated. T β RI is then recruited into the complex and phosphorylated by T β RII to initiate downstream signalling cascades (Ventura *et al.*, 1994; Wrana *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995). Activated T β RI phosphorylates Smads (*Drosophila*, mothers against dpp homologues) proteins, a family of downstream targets, which translocate to the nucleus in which they may induce gene transcription (Massagué, 1996; Heldin *et al.*, 1997).

Endoglin, also known as CD105 (Letarte *et al.*, 1994), is a homodimeric transmembrane glycoprotein that is structurally related to betaglycan and binds TGF- β 1 and - β 3 with high affinity (Gougos and Letarte, 1990; Lopez-Casillas *et al.*, 1991; Cheifetz *et al.*, 1992). In the presence of ligand, endoglin forms heteromeric complexes with T β RI and T β RII and, despite the absence of signalling motif, modulates cellular responses to TGF- β in different types of cell (Yamashita *et al.*, 1994; Lastres *et al.*, 1996; Caniggia *et al.*, 1997). Transfection of endoglin cDNA into the U-937 monocytic line totally abrogated the inhibition of cellular proliferation and the associated increase in *c-myc* transcript induced by TGF- β 1 (Lastres *et al.*, 1996). Exposure of human villous explants from first trimester pregnancy to endoglin monoclonal antibody 44G4, neutralizing TGF- β antibodies, or endoglin antisense oligonucleotides, stimulated trophoblast cell outgrowth and migration (Caniggia *et al.*, 1997). The discovery that endoglin is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1, an autosomal dominant disorder characterized by multisystemic vascular dysplasia and recurrent haemorrhage (McAllister *et al.*, 1994), confirms the importance of this molecule in the mediation of TGF- β effects *in vivo*. These findings identify endoglin as an important accessory protein of the TGF- β receptor complex.

Although endoglin is characteristically expressed on vascular endothelial cells (Gougos and Letarte, 1988; O'Connell *et al.*, 1992; Letarte *et al.*, 1994), estimation of its relative concentration in mouse tissues by semi-quantitative RT-PCR revealed highest expression in tissues of the reproductive tract, notably in the uterus in which endoglin co-localizes with TGF- β secreted in the stroma (St-Jacques *et al.*, 1994). Given the importance of TGF- β in uterine physiology (Flanders *et al.*, 1991; Godkin and Doré, 1998) and the regulatory functions attributed to endoglin in the mediation of cell responses induced by TGF- β (Lastres *et al.*, 1996; Caniggia *et al.*, 1997), the purpose of this study was to determine whether endoglin expressed by mouse uterine stromal cells interacts with TGF- β receptors and participates in cell proliferation induced by TGF- β .

Materials and Methods

Animals

Randomly bred female CD1 mice at 5–10 weeks of age (Charles River Laboratories, St Constant, Québec) were used

to provide uterine cells. Experiments were carried out in accordance with the procedures described in the guidelines for the care and use of laboratory animals as approved by the institution's animal care committee.

Isolation and culture of uterine cells

Cells were isolated from mouse uterine horns by a combination of enzymic and mechanical dispersion techniques adapted from protocols described in the literature (Chegini *et al.*, 1992; Hammond *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995). Mice were killed by CO₂ inhalation, and uterine horns were excised and opened into Dulbecco's modified Eagle medium: nutrient mixture F12 (D-MEM/F-12) (Gibco BRL, Burlington, Ontario). Epithelial cells were recovered by enzymic digestion (60 min at 37°C) with 1 mg collagenase type I ml⁻¹ (Sigma, St Louis, MO) in D-MEM/F12. A second enzymic digestion was performed by adding fresh collagenase solution to the tissues and shaking (140 rpm) for 30 min at 37°C. The resulting suspension consisted of epithelial and stromal cells. Stromal cells were recovered by crushing the remaining tissues on a metal sieve (200 μ m). Cells were resuspended in D-MEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PDI Bioscience, Aurora, Ontario) and 1% (v/v) penicillin (5000 U)-streptomycin (5 mg ml⁻¹) solution (Sigma), and cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Characterization of uterine cells

Epithelial and stromal cells were seeded at 1.5 and 2.0 \times 10⁴ cells per well, respectively, in tissue culture chamber slides (Nunc, Napierville, Québec) and allowed to attach for 48 h. Slides were washed with Dulbecco's PBS (DPBS) and cell membranes were permeabilized by a 5 min incubation in a solution of acetone:methanol (1:1). After washes with DPBS, slides were incubated for 2 h at 37°C with polyclonal rabbit anti-mouse vimentin or rabbit anti-human panCytokeratin (ICN, Montréal, Québec) diluted 1:25 in PBS. Normal rabbit serum was used as a control. The cells were washed in PBS and incubated for 60 min at 37°C with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) diluted 1:25 in PBS. Slides were washed with PBS and immunostaining was observed using a fluorescence microscope.

Preparation of endoglin-positive uterine stromal cell populations

Stromal cells isolated by enzymic digestion were cultured for 3 days in D-MEM/F12 supplemented with 10% FBS. Near-confluent monolayers were detached with trypsin-EDTA (Gibco BRL), washed twice and resuspended in PBS (5 \times 10⁶ cells ml⁻¹). Cells were then incubated for 30 min at 4°C with MJ7/18 hybridoma supernatant containing mouse endoglin monoclonal antibody (mAb) (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA; Ge and Butcher, 1994).

The cells were washed in PBS and incubated for 20 min at 4°C with FITC-conjugated goat anti-rat IgG (8 µg ml⁻¹) (Sigma). After incubation, the cells were washed, resuspended in PBS (5 × 10⁶ cells ml⁻¹), and sorted by flow cytometry. Endoglin-positive stromal cells were recovered and maintained in D-MEM/F12 supplemented with 10% FBS. These cells were used for affinity labelling and proliferation assays after a first passage.

TGF-β affinity labelling and immunoprecipitation

Affinity labelling was performed as described by Mitchell *et al.* (1992). Briefly, endoglin-positive cells were seeded at 2 × 10⁵ cells per well in a 12-well plate. Near-confluent cell monolayers were washed for 30 min with ice-cold binding buffer (DPBS with Mg²⁺ and Ca²⁺, pH 7.4, containing 0.1% BSA; Sigma) and incubated on ice for 4 h with 100 pmol ¹²⁵I-labelled TGF-β1 I⁻¹ (Mandel, Guelph, Ontario) with or without 4 nmol competing unlabelled TGF-β1 I⁻¹. The receptor-ligand complexes were crosslinked with 2 mmol bis(sulfosuccinimidyl)suberate I⁻¹ (Pierce, Rockford, IL). Cells were washed with DPBS and solubilized in a buffer containing 1% (v/v) Triton-X100, 10% glycerol, 1 mmol EDTA I⁻¹, 20 mmol Tris-HCl I⁻¹, pH 7.4, and a mixture of proteolytic inhibitors containing 1 mmol phenylmethylsulfonylfluoride I⁻¹, 20 µg aprotinin ml⁻¹, 20 µg soybean trypsin inhibitor ml⁻¹ and 25 mmol benzamide I⁻¹ (Boehringer Mannheim, Laval, Québec). Cell lysates were either analysed directly by SDS-PAGE or were immunoprecipitated overnight with 40 µg rabbit polyclonal antibody 1256:4b raised against human endoglin (Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario) (Gougos and Letarte, 1990) or preimmune serum. Immune complexes were precipitated for 2 h at 4°C with protein G-Sepharose (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec) slurry consisting of 50% packed beads in DPBS and 1% (v/v) Triton-X100. Extracts and radiolabelled endoglin complexes were fractionated on 4–12% SDS-PAGE under non-reducing and reducing conditions and visualized by autoradiography.

[³H]thymidine incorporation assay

Proliferation of endoglin-positive uterine stromal cells in response to TGF-β was studied by evaluating [³H]thymidine incorporation into trichloroacetic acid-precipitable material using a method adapted from protocols for human endometrial stromal cells (Tang *et al.*, 1994; Dumont *et al.*, 1995). Cells were seeded at 2.5 × 10⁴ cells per well in 96-well microtitre culture plates (Falcon, Toronto, Ontario) in D-MEM/F12 supplemented with 10% FBS. At 24 h after plating, cells were washed with Mg²⁺- and Ca²⁺-free PBS and incubated in 2% FBS-supplemented D-MEM/F12 medium in the presence of different concentrations of TGF-β1 (0–10 ng ml⁻¹) with or without 15 µg per well of mAb MJ7/18, Pan specific TGF-β neutralizing antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN), or non-immune rat IgG (Sigma). After 48 h, 0.2 µCi [³H]thymidine (NEN, Mississauga, Ontario) was added to each well and the incubation was continued for a further 18–24 h. Cells were then detached with

trypsin-EDTA, harvested onto filter paper discs with a multiple cell harvester (Fisher Scientific Ltd, Neapan, Ontario), and the incorporated radioactivity was measured by liquid scintillation counting. Two assays were performed in triplicate using three different cell preparations.

Statistical analysis

Increases in stromal cell proliferation induced by TGF-β1 were analysed individually using *t* tests. A modified *t* test (in which variances are pooled) was used to compare unilaterally, at each concentration of TGF-β1 tested, differences in the increase in cell proliferation between groups with and without antibodies. The same test was also performed to confirm the stimulatory effect of MJ7/18 antibody at a TGF-β1 concentration of 2 ng ml⁻¹.

Results

Isolation of uterine cells expressing endoglin

A protocol derived from established procedures (Chegini *et al.*, 1992; Hammond *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995) was used to prepare primary cultures of uterine cells from mature randomly cyclic mice. Uterine epithelial cells were recovered after a first digestion step with collagenase. Cells attached over a period of 72 h after plating and showed a typical cuboidal morphology (Fig. 1a). They were specifically stained with antibody directed against cytokeratin (Fig. 1c), which is a marker for epithelial cells (Chegini *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995). Stromal cells were released after additional enzymic digestion followed by grinding of the remaining uterine tissue. Live cells attached to the culture dishes within 18 h, whereas other contaminating cells, such as dead cells and epithelial cells, were eliminated by replacement of the culture medium. These cells showed a typical fibroblast-like morphology (Fig. 1b) and expressed high concentrations of vimentin (Fig. 1d), a marker for fibroblastic cells (Chegini *et al.*, 1992; Mani *et al.*, 1992; Mulholland *et al.*, 1992). They did not express cytokeratin. At the time of plating, both types of cell showed a cell viability > 95%.

Flow cytometric analysis of viable stromal cell populations (Fig. 2a) revealed that approximately 60% of these cells express endoglin at their surface, as determined by labelling with mAb MJ7/18, which is specific to mouse endoglin (Fig. 2b). Highly purified populations of endoglin-positive uterine stromal cells were then isolated by cell sorting (Fig. 2c) to perform functional studies. Antibodies bound to the cell surface were released after a few hours in culture and endoglin expression was stable for up to 10 days, as determined by flow cytometry using mAb MJ7/18 (data not shown). The doubling time of these cells was 48 h when seeded at 1 × 10⁴ cells cm⁻². The populations of endoglin-positive cells showed a typical fibroblast-like morphology, expressed high concentrations of vimentin, and did not contain any macrophages or endothelial cells, which are both endoglin-expressing cells, as confirmed by immunostaining

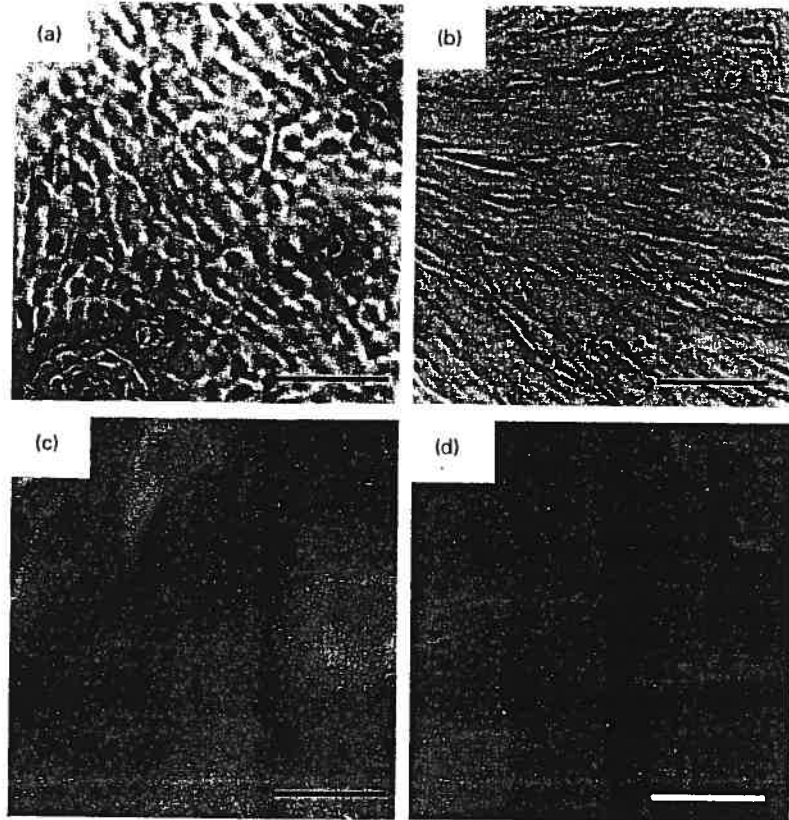


Fig. 1. Isolation and culture of mouse uterine cells. Epithelial cells were recovered after enzymic digestion of mouse uterine horns with collagenase type I. Stromal cells were isolated after an additional enzymic digestion followed by grinding and sieving of the remaining uterine tissues. After a few days in culture, epithelial cells showed a typical cuboidal morphology (a), while stromal cells showed a fibroblast-like morphology (b). Characterization of both types of cell by immunocytochemistry with antibodies specific to cytokeratin and vimentin revealed the expression of cytokeratin by epithelial cells (c) and vimentin by stromal cells (d). Scale bars represent 200 μ m (a, b) and 50 μ m (c, d).

with antibodies specific for F4/80 antigen and von Willebrand factor, respectively (data not shown).

Expression of endoglin at the surface of uterine stromal cells and binding of TGF- β 1

Endoglin-positive uterine stromal cells were affinity labelled with 125 I-labelled TGF- β 1 and TGF- β -receptor complexes were analysed electrophoretically after chemical crosslinking and cell membrane solubilization. Autoradiograms of labelled complexes analysed by SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 3a, lane T) revealed four major bands of apparent relative molecular masses of 49, 67, 80–90 and > 150 kDa. Competition experiments using unlabelled TGF- β 1 confirmed the specificity of the labelling of the 67, 80–90 and > 150 kDa complexes (Fig. 3b, lane T). The apparent molecular mass, binding specificity, and migration pattern of these binding complexes are characteristic of T β RI, T β RII and betaglycan (Massagué and Like, 1985; Cheifetz *et al.*, 1986; Cheifetz *et al.*, 1988). The similar intensity of the 49 kDa band in the presence of an excess of unlabelled ligand indicated that

this radiolabelled complex was not specific. Immunoprecipitation of affinity labelled complexes with the polyclonal anti-human endoglin serum 1256:4b, previously shown to react with mouse endoglin (St-Jacques *et al.*, 1994), was performed after affinity crosslinking to determine whether TGF- β complexes contained endoglin. The antiserum precipitated a major radiolabelled band of 167 kDa in non-reducing conditions (Fig. 3a, line NR), which migrated as an affinity labelled band of 96 kDa after reduction (Fig. 3a, line R). Faint bands, likely to correspond to T β RII and T β RI, co-immunoprecipitated with endoglin in the presence of ligand (Fig. 3a, lines NR and R). These complexes are not detected in the presence of an excess of unlabelled ligand (see Fig. 3b, lines R and NR). Free 125 I-labelled TGF- β 1 migrated at 26 kDa and non-specific labelling was observed at the top of the gels.

Role of endoglin in the proliferation of uterine stromal cells in response to TGF- β 1

Uterine stromal cell proliferation was measured using a [3 H]thymidine incorporation assay. Results were expressed

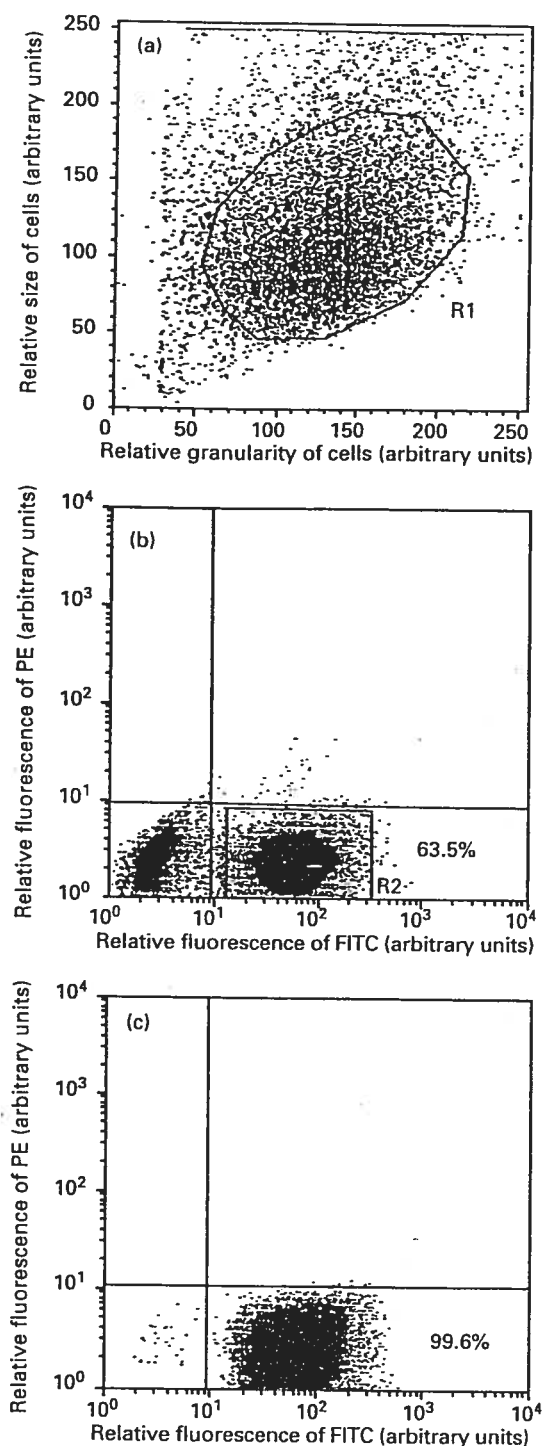


Fig. 2. Flow cytometric analysis of mouse uterine stromal cell population with monoclonal antibody (mAb) MJ7/18. A viable stromal cell population isolated by collagenase digestion (a) was immunolabelled with mAb MJ7/18 specific to mouse endoglin. R1 represents the selected cell population. Approximately 60% of these cells expressed endoglin on the surface (b) as determined by incubation with rat anti-mouse endoglin followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat IgG. Sorting of these cells allowed the isolation of a highly purified population (> 99%) of endoglin-positive uterine stromal cells (c). Cells that did not express endoglin are in the lower left-hand box (b,c). PE: phycoerythrin.

as a percentage increase compared with cell proliferation in the absence of TGF- β 1 and statistical analyses were performed on these values to take into consideration variations in basal cell proliferation rate among the different cell populations studied. The results are summarized (Fig. 4). A biphasic curve of cell proliferation was observed in response to TGF- β 1 (Fig. 4a). [3 H]thymidine incorporation into DNA was significantly increased by approximately 20% after treatment with 0.02 ng TGF- β 1 ml $^{-1}$ ($P < 0.025$). Although TGF- β 1 significantly stimulated cell proliferation at 0.2 ng ml $^{-1}$ ($P < 0.05$), great variability was observed between responses in the three different cell preparations. At a concentration of 2 ng ml $^{-1}$, TGF- β 1 had no significant effect on cell proliferation. Thymidine incorporation was stimulated by approximately 20% at a concentration of 5 ng ml $^{-1}$ ($P < 0.025$) and by approximately 60% at 10 ng ml $^{-1}$ ($P < 0.005$).

mAb MJ7/18 was added to endoglin-positive cells in the presence of the ligand to determine whether endoglin had a role in the proliferation of uterine stromal cells in response to TGF- β 1 (Fig. 4b). In the presence of mAb MJ7/18, the increase in DNA synthesis induced by TGF- β 1 at concentrations of 0.02 ($P < 0.005$) and 10.0 ng ml $^{-1}$ ($P < 0.025$) was significantly inhibited. Conversely, at 2 ng ml $^{-1}$, TGF- β 1 had no effect, whereas the addition of anti-endoglin significantly increased the rate of thymidine incorporation ($P < 0.025$). The specificity of the action of TGF- β on [3 H]thymidine incorporation was confirmed by using TGF- β neutralizing antibodies ($P < 0.01$ and 0.05). Since the expression of both T β RII and endoglin shows cyclic variation in the uterus (Takahashi *et al.*, 1994; M-J. Bergeron, C. Brown, M-J. Ouellette and S. St-Jacques, unpublished), high standard deviations result from the comparison of cell populations isolated from randomly cyclic mice.

Effect of TGF- β 1 on the expression of endoglin at the surface of uterine stromal cells

Since the expression of endoglin is stimulated by TGF- β 1 on activated monocytes (Lastres *et al.*, 1996) and bone marrow stromal cells (Robledo *et al.*, 1998), its expression at the surface of uterine stromal cells treated with different concentrations of TGF- β 1 was verified by flow cytometric analysis. Cells were incubated with TGF- β 1 for 48 h and the expression of endoglin was studied using mAb MJ7/18 and FITC-conjugated anti-rat IgG, as described for the preparation of endoglin-positive uterine stromal cells. Flow cytometric analysis showed that incubation with 0–5 ng TGF- β 1 ml $^{-1}$, concentrations known to stimulate the expression of endoglin in other types of cell (Lastres *et al.*, 1996; Robledo *et al.*, 1998), for 48 h did not affect either the percentage of endoglin-positive cells or the expression of endoglin (Fig. 5).

Discussion

Unlike most normal adult tissues, cyclic growth and remodelling occur within the uterus. Luminal and glandular epithelial cells, stromal cells and endothelial cells undergo

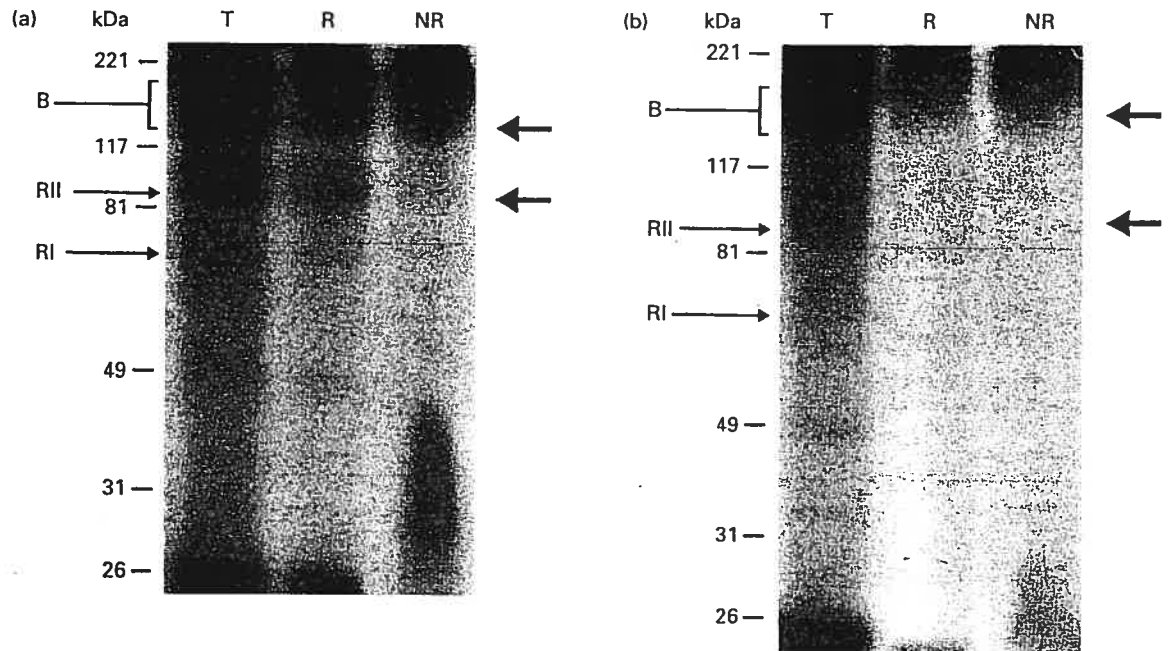


Fig. 3. Analysis of ^{125}I -labelled transforming growth factor β (TGF- β) affinity labelled membrane proteins of mouse uterine stromal cells. Endoglin-positive uterine stromal cells were affinity labelled with ^{125}I -labelled TGF- β 1 and TGF- β -receptor complexes were analysed electrophoretically after chemical crosslinking. Endoglin- ^{125}I -labelled TGF- β 1 complexes were identified after immunoprecipitation with polyclonal anti-human endoglin serum. Autoradiograms of Triton-X100 extracts of affinity labelled cells analysed by SDS-PAGE under reducing conditions (a, lane T) revealed four major bands of apparent relative molecular masses of 49, 67, 80–90 and > 150 kDa. In the presence of unlabelled TGF- β 1, radiolabelled complexes of 67, 80–90 and > 150 kDa have been competed for by the specific ligand (b, lane T), and are likely to correspond to type I transforming growth factor β receptor (T β RI), T β RII and betaglycan (B). The 49 kDa radiolabelled band that has not been competed for is not specific for the ligand. Non-specific labelling was observed at the top of the gels. Polyclonal endoglin antiserum precipitated a major radiolabelled band of 167 kDa under non-reducing conditions (a, lane NR) and of 96 kDa after reduction (a, lane R). Faint bands, probably corresponding to T β RII and T β RI, co-immunoprecipitated with endoglin in the presence of ligand (a, lanes NR and R). These complexes are not detected in the presence of excess unlabelled ligand (b, lanes R and NR) confirming their specificity for TGF- β 1. Free ^{125}I -labelled TGF- β 1 migrated at 26 kDa.

periods of proliferation, migration, differentiation and apoptosis. TGF- β has potent effects on these processes and is thus thought to play a pivotal role in uterine physiology (Flanders *et al.*, 1991; Shull and Doetschman, 1994; Godkin and Doré, 1998). Endoglin, a TGF- β -binding membrane glycoprotein, is highly expressed in mouse uterine stroma (Gougos and Letarte, 1990; Cheifetz *et al.*, 1992; St-Jacques *et al.*, 1994). The present study demonstrated that endoglin is expressed at the surface of uterine stromal cells, binds TGF- β 1, interacts with signalling TGF- β receptors and participates in the proliferation of stromal cells induced by this growth factor.

The specific localization of endoglin enabled the development of a highly reproducible and straightforward technique for the isolation and culture of endoglin-positive uterine stromal cells suitable for functional studies. In the mouse uterus, endoglin is expressed in the stroma, whereas epithelial and muscular cells are totally negative (St-Jacques *et al.*, 1994). Freshly isolated uterine epithelial and stromal cells showed characteristic morphology and immunocytochemical staining for intermediate filaments (Chegini *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995). However, after 3 days

in culture, immunocytochemical analysis of stromal cell populations revealed that only 60% of cells expressed endoglin at the surface. Contaminating epithelial cells, usually estimated as approximately 5% (Biggsby *et al.*, 1986; Jacobs and Carson, 1991; Chegini *et al.*, 1992), are unlikely to account for this relatively high proportion of endoglin-negative cells. Indeed, immunohistochemical studies revealed that the expression of endoglin varies during the oestrous cycle (M-J. Bergeron, C. Brown, M-J. Ouellette and S. St-Jacques, unpublished). Since randomly cyclic mice were used for the isolation of uterine cells, it is likely that endoglin-low or endoglin-negative stromal cells isolated from mice in dioestrus, proestrus or metoestrus account for the lower than expected proportion of endoglin-positive cells observed after a few days in culture. It is critical that homogeneous populations of endoglin-positive uterine stromal cells are used in functional studies. Therefore, highly purified populations of stromal cells expressing endoglin were prepared by affinity to the monoclonal antibody MJ7/18, which is specific for mouse endoglin (Ge and Butcher, 1994).

Affinity labelling of endoglin-expressing stromal cells

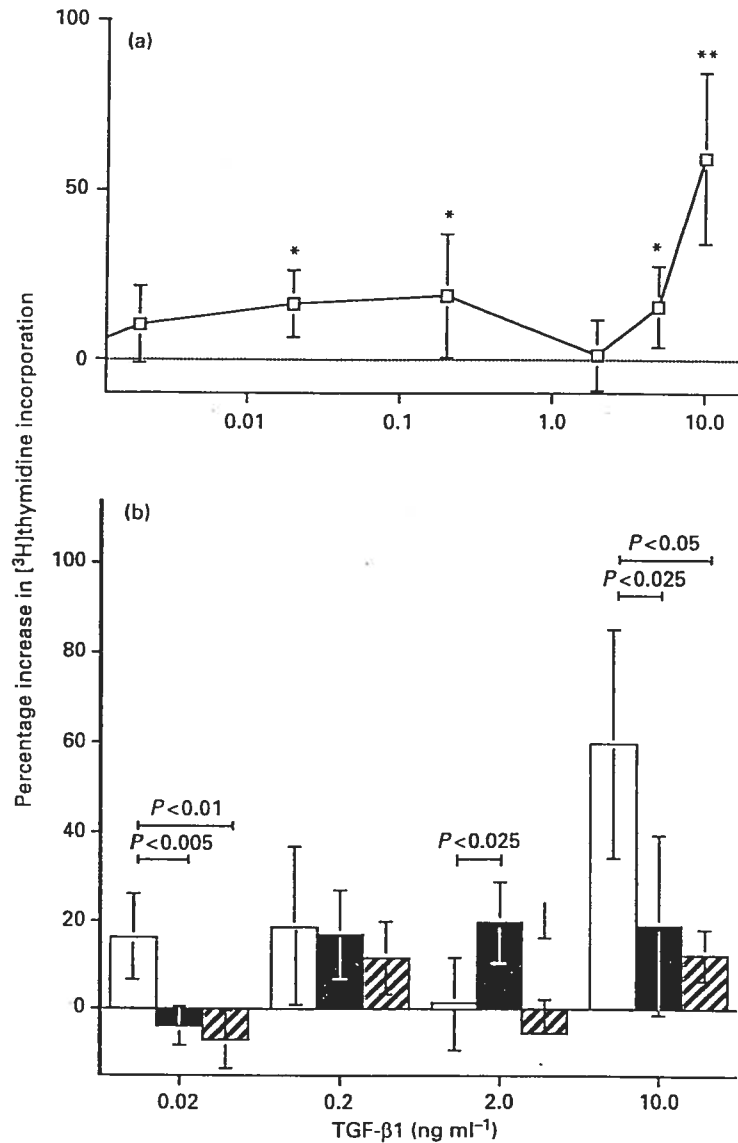


Fig. 4. [³H]thymidine incorporation into the DNA of endoglin-positive mouse uterine stromal cells after treatment with transforming growth factor β1 (TGF-β1) in the presence or absence of antibodies specific to mouse endoglin or TGF-β. (a) A biphasic curve of cell proliferation was observed in response to TGF-β1. Thymidine incorporation was significantly increased by approximately 20% after incubation with TGF-β1 at concentrations of 0.02 ($P < 0.025$) and 0.2 ng ml⁻¹ ($P < 0.05$). No stimulation was observed at 2.0 ng ml⁻¹. Thymidine incorporation was stimulated by approximately 20% at a concentration of 5 ng TGF-β1 ml⁻¹ ($P < 0.025$) and by approximately 60% at 10 ng TGF-β1 ml⁻¹ ($P < 0.005$). (b) Increases in DNA synthesis induced by TGF-β1 at concentrations of 0.02 and 10.0 ng ml⁻¹ were significantly inhibited by mAb MJ7/18 ($P < 0.005$ and 0.025) and TGF-β neutralizing antibodies ($P < 0.01$ and 0.05). At 2 ng ml⁻¹, TGF-β1 had no effect, while the addition of anti-endoglin significantly increased the rate of thymidine incorporation ($P < 0.025$). Values represent means \pm SEM; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$. □, TGF-β1; ■, TGF-β1 + mAb MJ7/18; ▨, TGF-β1 + anti-TGF-β.

using ¹²⁵I-labelled TGF-β1 revealed the presence of TβRI, TβRII and betaglycan. Immunoprecipitation of total cell lysates with polyclonal anti-endoglin serum indicated that endoglin expressed by uterine stromal cells binds TGF-β1 and interacts with TβRI and TβRII. Endoglin-¹²⁵I-labelled

TGF-β1 complexes migrated to endoglin monomer and dimer immunoprecipitated from TGF-β1 affinity labelled mouse fibroblast NCTC-2071 cells analysed under reducing and non-reducing conditions, respectively (St-Jacques *et al.*, 1994). Monomeric endoglin migrated slightly above TβRII and

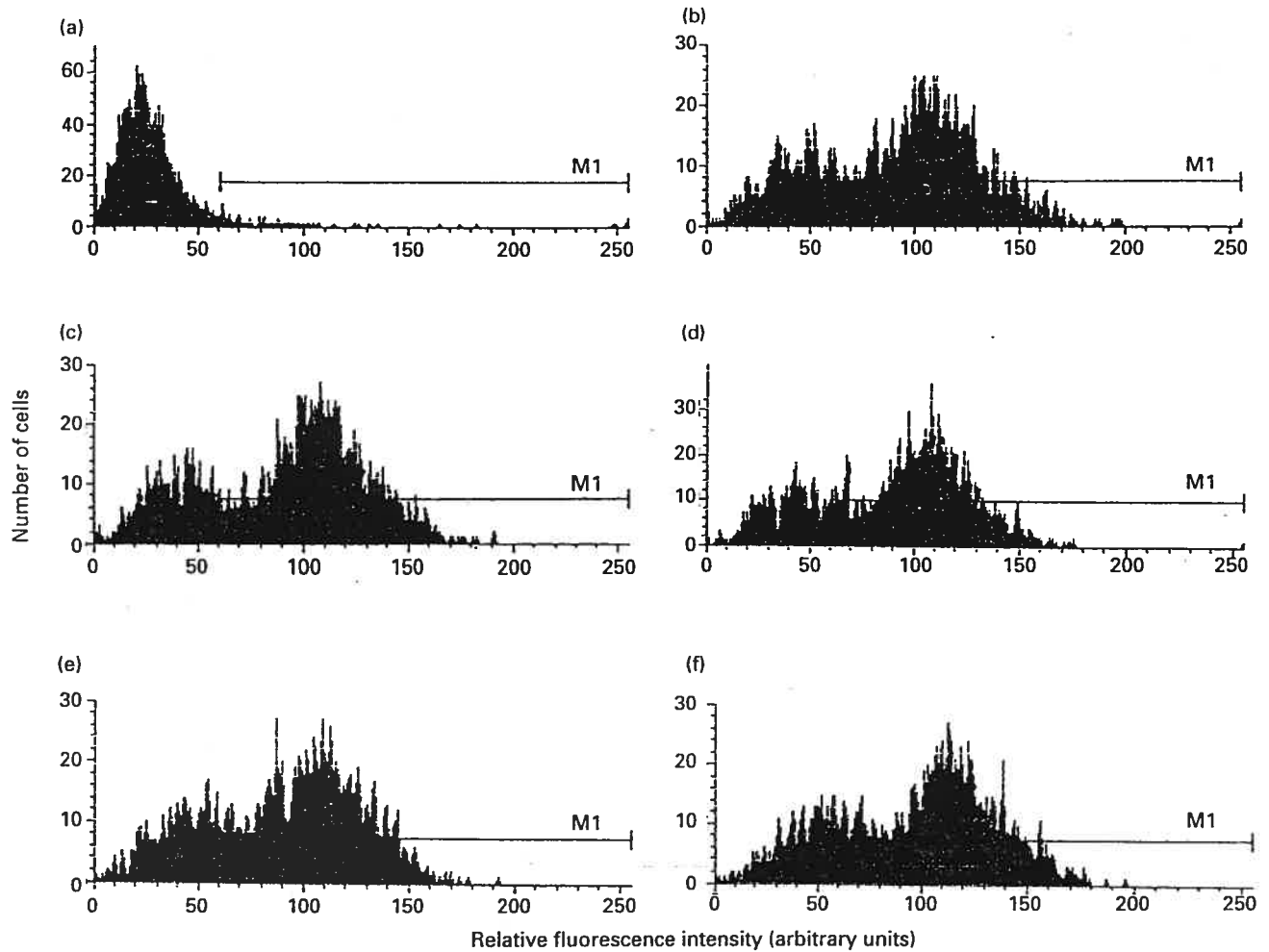


Fig. 5. Flow cytometric analysis of endoglin expression at the surface of mouse uterine stromal cells after treatment with different concentrations of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1). Freshly isolated stromal cells were incubated with increasing concentrations of TGF- β 1 for 48 h and the expression of endoglin was evaluated by flow cytometry using mAb MJ7/18. Although no staining is observed with control non-immune rat IgG (a), approximately 60% of uterine stromal cells expressed endoglin on their surface (b). Treatment of uterine stromal cells with (c) 0.0, (d) 1.0, (e) 2.0 and (f) 5.0 ng TGF- β 1 ml⁻¹ did not affect the expression of endoglin. M1 represents the area of relative fluorescence intensity corresponding to cells expressing endoglin, as determined by comparing the pattern of non-specific fluorescence after incubation of cells with negative control (rat IgG) with that after incubation with anti-endoglin (MJ7/18).

was visualized best by comparing the specific non-reduced and reduced immunoprecipitates. Furthermore, co-immunoprecipitation of faint bands corresponding to T β RI and T β RII indicated that endoglin and the TGF- β signalling receptors interact with each other on the surface of uterine stromal cells in the presence of ligand, as reported for pig endothelial cells (Yamashita *et al.*, 1994), human bone marrow stromal cells (Robledo *et al.*, 1996) and pre-B leukaemic cells (Zhang *et al.*, 1996). These results indicate that endoglin on uterine stromal cells may function as a modulator of the effects of TGF- β , as demonstrated in U-937 monocytic cells (Lastres *et al.*, 1996) and invading cytotrophoblast (Caniggia *et al.*, 1997).

T β RI, T β RII and betaglycan are synthesized and expressed by uterine stromal and epithelial cells in cyclic uterus and decidua of different species (Chegini *et al.*, 1994; Roelen *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1994; Das *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 1998). Five

TGF- β binding proteins have been identified on human endometrial stromal cells (Dumont *et al.*, 1995). However, although the presence of T β RI, T β RII, and betaglycan as well as two glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins were reported by Dumont *et al.* (1995), endoglin-¹²⁵I-labelled TGF- β complexes were not detected. Since endoglin is expressed in the stroma of human endometrium (S. St-Jacques, P. DesRosiers, C. Nielly, M. Lamothe and D. Provencher, unpublished), the absence of TGF- β -labelled endoglin complexes might be explained by the fact that endoglin could not be readily detected in total cell lysates without immunoprecipitation (Cheifetz *et al.*, 1992). After chemical crosslinking, endoglin-TGF- β 1 complexes co-migrated with T β RII under reducing conditions and with the 180 kDa GPI-anchored protein under non-reducing conditions (Cheifetz *et al.*, 1992; Dumont *et al.*, 1995; Robledo *et al.*, 1996). Since endoglin, T β RI and T β RII were co-

precipitated by antibodies to either endoglin or T β RII in the presence of ligand in other types of cell (Yamashita *et al.*, 1994; Robledo *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996), detection of endoglin-TGF- β 1 complexes would be expected after immunoprecipitation of affinity labelled human endometrial cell lysates with anti-T β RII. However, immunoprecipitated complexes were analysed after electrophoresis under reducing conditions (Dumont *et al.*, 1995) which do not allow T β RII-TGF- β 1 and endoglin-TGF- β 1 complexes to be distinguished. Further studies are required to verify that endoglin expressed on human endometrial cells binds to TGF- β 1 and interacts with signalling receptors.

Overall, the results of the present study demonstrate that treatment of endoglin-positive mouse uterine stromal cells with TGF- β 1 significantly stimulates DNA synthesis, as reported for human endometrial stromal cells (Hammond *et al.*, 1993; Marshburn *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1994; Dumont *et al.*, 1995). Furthermore, a biphasic curve of proliferation in response to the growth factor was observed: there was a slight increase in thymidine incorporation at the lower concentrations investigated, followed by an absence of response at 2 ng ml⁻¹, and a stimulation at higher concentrations of TGF- β 1. Similarly, Tang *et al.* (1994) observed that TGF- β 1 did not have an effect on the proliferation of human endometrial cells at 1 ng ml⁻¹, whereas lower concentrations (\leq 0.5 ng ml⁻¹) exerted a stimulatory effect. However, the increase in thymidine incorporation into mouse uterine stromal cells in response to concentrations of TGF- β 1 < 0.5 ng ml⁻¹ was smaller than that reported for human cells (Hammond *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1994). This difference might be explained by species variation and the phase of the cycle at which uterine tissues were isolated. A bimodal proliferative response to TGF- β 1 was observed in human smooth muscle cells, chondrocytes and fibroblasts (Battegay *et al.*, 1990).

Significant inhibition of [³H]thymidine incorporation was observed in the presence of mAb MJ7/18 after treatment of stromal cells with 0.02 and 10.0 ng TGF- β 1 ml⁻¹. Interestingly, at 2 ng TGF- β 1 ml⁻¹, anti-mouse endoglin significantly stimulated stromal cell proliferation, whereas the growth factor alone had no effect. Since endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1 (Lastres *et al.*, 1996; Caniggia *et al.*, 1997), the obstruction of endoglin molecules by specific antibodies might alter the stromal cell proliferative response to the growth factor. Thus, the present study indicates that endoglin is involved in the regulation of uterine stromal cell proliferation in response to TGF- β 1.

The expression of endoglin is upregulated by TGF- β 1 on activated monocytes (Lastres *et al.*, 1996) and bone marrow stromal cells (Robledo *et al.*, 1998). Since TGF- β 1 is synthesized and secreted by uterine stromal and epithelial cells in the mouse uterus (Tamada *et al.*, 1990; Manova *et al.*, 1992; Roelen *et al.*, 1994; Das *et al.*, 1997), the effect of this growth factor on the expression of endoglin on mouse uterine stromal cells was investigated. The results demonstrate that treatment of freshly isolated cells with TGF- β 1 has no effect on the expression of endoglin at the surface of uterine stromal cells.

In preparation for implantation, a wave of fibroblast-like cell proliferation is observed in the uterine stroma to increase the

fibroblast population capable of undergoing decidualization (Moulton and Koenig, 1984; Abrahamsohn and Zorn, 1993). It has been proposed that TGF- β 1 may act to stimulate stromal cell proliferation in preparation for decidualization (Marshburn *et al.*, 1994). On the basis of the critical functions attributed to TGF- β in the uterus (Godkin and Doré, 1998), the high expression of endoglin in the endometrial stroma (St-Jacques *et al.*, 1994), and the demonstration that endoglin is involved in the mediation of cellular effects of this growth factor on uterine stromal cells, it is likely that endoglin is an important regulator of the actions of TGF- β in the uterine stroma.

The authors wish to thank Michelle Letarte from the Hospital for Sick Children of Toronto, Canada, for providing the rabbit polyclonal antibody 1256:4b raised against human endoglin, and Eugene Butcher of Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA, for providing the rat monoclonal anti-mouse endoglin MJ7/18. They also thank Marie-Josée Bergeron for helpful discussion and review of the manuscript. This work was supported by grant MT-12703 from the Medical Research Council of Canada. S. St-Jacques is a Junior Scholar from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (960141-103).

References

- Abrahamsohn PA and Zorn TMT (1993) Implantation and decidualization in rodents *Journal of Experimental Zoology* 266 603-628
- Ando N, Hirahara F, Fukushima J, Kawamoto S, Okuda K, Funabashi T, Gorai I and Minaguchi H (1998) Differential gene expression of TGF- β isoforms and TGF- β receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface *American Journal of Reproductive Immunology* 40 48-56
- Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF and Ross R (1990) TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop *Cell* 63 515-524
- Bigsby RM, Cooke PS and Cunha GR (1986) A simple efficient method for separating murine uterine epithelial and mesenchymal cells *American Journal of Physiology* 251 E630-E636
- Bischof P, Redar M, Gindre P, Vassilakos P and Campana A (1993) Localization of alpha 2, alpha 5 and alpha 6 integrin subunits in human endometrium, decidua and trophoblast *European Journal of Obstetrics and Gynaecology and Reproductive Biology* 51 217-226
- Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM and Osteen KG (1995) Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium *Proceedings National Academy of Sciences USA* 92 7362-7366
- Caniggia I, Taylor CV, Knox JW, Lye SJ and Letarte M (1997) Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants *Endocrinology* 138 4977-4988
- Casslén B, Sandberg T, Gustavsson B, Willén R and Nilbert M (1998) Transforming growth factor β 1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and progesterone, and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 *Biology of Reproduction* 58 1343-1350
- Chegini N, Rossi MJ and Masterson BJ (1992) Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF β -receptors in human endometrial tissue: localization and *in vitro* action *Endocrinology* 130 2373-2385
- Chegini N, Zhao Y, Williams RS and Flanders KC (1994) Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), TGF- β 2, TGF- β 3, and type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [¹²⁵I]TGF- β 1 binding sites *Endocrinology* 135 439-449
- Cheifetz S, Like B and Massagué J (1986) Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor- β *Journal of Biological Chemistry* 261 9972-9978
- Cheifetz S, Andres JL and Massagué J (1988) The transforming growth factor-

- β receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor *Journal of Biological Chemistry* 263 16 984–16 991
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J and Letarte M (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor in human endothelial cells *Journal of Biological Chemistry* 267 19 027–19 030
- Chen R-H, Moses HL, Maruoka EM, Derynck R and Kawabata M (1995) Phosphorylation-dependent interaction of the cytoplasmic domains of the type I and type II transforming growth factor- β receptors *Journal of Biological Chemistry* 270 12 235–12 241
- Clark DA, Flanders KC, Banwatt D, Millar-Book W, Manuel J, Stedronska-Clark J and Rowley B (1990) Murine pregnancy decidua produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor- β 2 *Journal of Immunology* 144 3008–3014
- Das SK, Lim H, Wang J, Paria BC, BazDresch M and Dey SK (1997) Inappropriate expression of human transforming growth factor (TGF)- α in the uterus of transgenic mouse causes downregulation of TGF- β receptors and delays the blastocyst attachment reaction *Journal of Molecular Endocrinology* 18 243–257
- Dumont N, O'Connor-McCourt MD and Philip A (1995) Transforming growth factor- β receptors on human endometrial cells: identification of the type I, II and III receptors and glycosyl-phosphatidylinositol anchored TGF- β binding proteins *Molecular and Cellular Endocrinology* 111 57–66
- Flanders KC, Marascalco BA, Roberts AB and Sporn MA (1991) Transforming growth factor β : a multifunctional regulatory peptide with actions in the reproductive system. In *Growth Factors in Reproduction* pp 23–37. Springer-Verlag, New York
- Ge AZ and Butcher EC (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF- β ligand *Gene* 138 201–206
- Godkin JD and Doré JJE (1998) Transforming growth factor β and the endometrium *Reviews of Reproduction* 3 1–6
- Gougos A and Letarte M (1988) Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line *Journal of Immunology* 141 1925–1933
- Gougos A and Letarte M (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells *Journal of Biological Chemistry* 265 8361–8364
- Graham CH and Lala PK (1992) Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control *Biochemistry and Cell Biology* 70 867–874
- Grosskinsky CM, Yowell CW, Sun J, Parise LV and Lessey BA (1996) Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells *in vitro*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 2047–2054
- Hammond MG, Oh S-T, Anners J, Surrey ES and Halme J (1993) The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 168 1131–1138
- Heldin CH, Miyazono K and ten-Dijke P (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins *Nature* 390 465–471
- Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M and Nakano R (1996) Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium *Journal of Reproduction and Fertility* 108 147–155
- Jacobs AL and Carson DD (1991) Proteoglycan synthesis and metabolism by mouse uterine stroma cultured *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* 266 15 464–15 473
- Lastres P, Letamendia A, Zhang H *et al.* (1996) Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1 *Journal of Cell Biology* 133 1109–1121
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW and Sun J (1994) Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy *Fertility and Sterility* 62 497–506
- Letarte M, Greaves A and Vera S (1994) CD105 (endoglin) cluster report. In *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigen* pp 1756–1759. Oxford University Press, Oxford
- Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS and Massagué J (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system *Cell* 67 785–795
- Lopez-Casillas F, Wrana JL and Massagué J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor *Cell* 73 1435–1444
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW *et al.* (1994) Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1 *Nature Genetics* 8 345–351
- Mani SK, Julian J, Lampelo S and Glasser SR (1992) Initiation and maintenance of *in vitro* decidualization are independent of hormonal sensitization *in vivo*. *Biology of Reproduction* 47 785–799
- Manova K, Paynton BV and Bachvarova RF (1992) Expression of activins and TGF- β 1 and - β 2 RNAs in early postimplantation mouse embryos and uterine decidua *Mechanisms of Development* 36 141–152
- Marshburn PB, Arici AM and Casey ML (1994) Expression of transforming growth factor- β 1 messenger ribonucleic acid and the modulation of deoxyribonucleic acid synthesis by transforming growth factor- β 1 in human endometrial cells *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 170 1152–1158
- Massagué J (1996) TGF- β signaling: receptors, transducers and MAD proteins *Cell* 85 947–950
- Massagué J and Like B (1985) Cellular receptors for type β transforming growth factor. Ligand binding and affinity labelling in human and rodent cell lines *Journal of Biological Chemistry* 260 2636–2645
- Mitchell EJ, Fitz-Gibbon L and O'Connor-McCourt M (1992) Subtypes of betaglycan and of type I and type II transforming growth factor- β (TGF- β) receptors with different affinities for TGF- β 1 and TGF- β 2 are exhibited by human placental trophoblast cells *Journal of Cellular Physiology* 150 334–343
- Miyazono K (1997) TGF- β receptors and signal transduction *International Journal of Hematology* 65 97–104
- Moulton BC and Koenig BB (1984) Uterine deoxyribonucleic acid synthesis during preimplantation in precursors of stromal cell differentiation during decidualization *Endocrinology* 115 1302–1307
- Mulholland J, Aplin JD, Ayad S, Hong L and Glasser SR (1992) Loss of collagen type VI from rat endometrial stroma during decidualization *Biology of Reproduction* 46 1136–1143
- O'Connell PJ, McKenzie A, Fiscaro N, Rockman SP, Pearse MJ and D'Apice AJF (1992) Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule *Clinical and Experimental Immunology* 90 154–159
- Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo AG, Bernabéu C, Sanchez-Madrid F and Teixido J (1996) Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells *British Journal of Haematology* 93 507–514
- Robledo MM, Ursa MA, Sanchez-Madrid F and Teixido J (1998) Associations between TGF-beta1 receptors in human bone marrow stromal cells *British Journal of Haematology* 102 804–811
- Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F and Osteen KG (1994) Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones *Journal of Clinical Investigations* 94 946–953
- Roelen BA, Lin HY, Knezevic V, Freund E and Mummery CL (1994) Expression of TGF-betas and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo *Developmental Biology* 166 716–728
- Rotello RJ, Lieberman RC, Furchio AF and Gerschenson LE (1991) Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor β 1 in cultured uterine epithelial cells *Proceedings National Academy of Sciences USA* 88 3412–3415
- Sandberg T, Eriksson P, Gustavsson B and Casslén B (1997) Differential regulation of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene expression by growth factors and progesterone in human endometrial stromal cells *Molecular Human Reproduction* 3 781–787
- Shull MM and Doetschman T (1994) Transforming growth factor- β 1 in reproduction and development *Molecular Reproduction and Development* 39 239–246
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N and Letarte M (1994) Molecular characterization and *in situ* localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor- β binding protein of endothelial and stromal cells *Endocrinology* 134 2645–2657
- Tabibzadeh S (1992) Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle *Human Reproduction* 7 876–882
- Takahashi T, Eitzman B, Bossert NL, Walmer D, Sparrow K, Flanders KC, McLachlan J and Gray Nelson K (1994) Transforming growth factors β 1, β 2 and β 3 messenger RNA and protein expression in mouse uterus and vagina during estrogen-induced growth: a comparison to other estrogen-regulated genes *Cell Growth and Differentiation* 5 919–935
- Tamada H, McMaster MT, Flanders KC, Andrews GK and Dey SK (1990) Cell type-specific expression of transforming growth factor- β 1 in the mouse uterus during the periimplantation period *Molecular Endocrinology* 4 965–972
- Tang X-M, Zhao Y, Rossi MJ, Abu-Rustum RS, Ksander GA and Chegini N (1994) Expression of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms and TGF- β type II receptor messenger ribonucleic acid and protein, and the effect of TGF- β s on endometrial stromal cell growth and protein degradation *in vitro*. *Endocrinology* 135 450–459
- Ueda M, Ueki M, Tsurunaga T, Yamada T, Okamoto Y, Seiki Y, Iwai E and Sugimoto O (1992) *In vitro* study on the effect of sex steroid and growth

- factor on growth and laminin, collagen IV, and tissue plasminogen activator production of normal endometrial cells and endometrial cancer cells in culture *Acta Obstetrica Gynaecologica Japonica* 44 1219-1226
- Ventura F, Doody J, Liu F, Wrana JL and Massagué J (1994) Reconstitution and transphosphorylation of TGF- β receptor complexes *EMBO Journal* 13 5581-5589
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang X-F and Massagué J (1992) TGF β signal through a heteromeric protein kinase receptor complex *Cell* 71 1003-1014
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F and Massagué J (1994) Mechanism of activation of the TGF- β receptor *Nature* 370 341-347
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Morén A, ten Dijke P and Miyazono K (1994) Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor- β *Journal of Biological Chemistry* 269 1995-2001
- Zhang H, Shaw ARE, Mak A and Letarte M (1996) Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)- β receptor complex of human pre-B leukemic cells *Journal of Immunology* 156 565-573
- Zhang L, Rees MC and Bicknell R (1995) The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on estrogen and progesterone challenges *Journal of Cell Sciences* 108 323-331

3.1.2. Volet II: L'endogline dans les cellules prostatiques humaines

Typiquement, l'endogline est exprimée dans les cellules endothéliales, les fibroblastes, et les cellules du système immunitaire. Elle est généralement absente des cellules épithéliales mais sa présence a été détectée dans les cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire (Henriksen et al., 1995; Evangelou et al., 2000). Des évidences de la régulation de son expression dans les 3 lignées parentales de cellules prostatiques cancéreuses humaines (PC-3, DU145 et LNCaP) ont été suggérées par une étude de l'effet d'inhibiteurs de phosphatases agissant sur les résidus pSérine/pThréonine et pTyrosine (acide okadaïque et orthovanadate de sodium) et de kinases S/TK et TK (staurosporine et génisteine) (Rokhlin and Cohen, 1995). Les données paradoxales quant à l'action du TGF β dans la prostate normale et le CaP nous amènent à proposer qu'une expression différentielle de l'endogline dans les cellules prostatiques cancéreuses puisse expliquer les effets du TGF β sur leur croissance dans le CaP.

3.2. Effet du TGF β sur la prolifération des lignées prostatiques humaines

Le TGF β peut exercer des effets différents sur les fonctions cellulaires selon le type de cellules et l'expression différentielle de ses récepteurs. A cet égard, le TGF β est connu comme étant un inhibiteur de la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses PC-3 et DU145 (Ritchie et al., 1997) alors que l'absence de réponse des cellules LNCaP est attribuée à une anomalie des récepteurs de signalisation (Guo and Kyprianou, 1998). La concentration optimale du TGF- β 1 sur les cellules PC-3 a été déterminée au laboratoire (Atfi et al., 1994) Comme l'un de nos objectifs est de corrélérer l'action du TGF β sur la croissance des cellules à leur phénotype et à l'expression de l'endogline, nous avons

déterminé l'activité de ce FC sur les différentes sous-lignées de cellules PC-3 humaines. Les courbes de la prolifération sont présentées à la figure 22. Nous démontrons que les 4 lignées répondent au TGF- β 1 par un effet d'inhibition dont l'effet devient apparent entre les jours 2 et 4 du traitement sauf pour la lignée PC-3M où l'inhibition par le FC est plus hâtive. L'histogramme de la figure 23A montre le pourcentage maximal d'inhibition obtenue pour chacune des lignées. Les cellules PC-3 sont inhibées de 43% et sont suivies dans l'ordre croissant d'inhibition par les cellules PC-3M et PC-3Pro4 qui répondent de façon similaire au TGF- β 1 avec respectivement 67 et 62% de réduction du nombre de cellules, et finalement les cellules PC-3LN4 sont les plus affectées avec 78% d'inhibition. Comparée à la lignée PC-3, l'effet d'inhibition du TGF- β 1 sur la prolifération de chacune des lignées est statistiquement significatif avec un $P < 0,01$ (figure 23B). Les temps de doublements des cellules prostatiques calculés selon les équations des courbes de croissance de type exponentiel sont résumés dans le tableau 10.

En absence de TGF- β 1, les cellules PC-3 et PC-3Pro4 ont un temps moyen de doublement de 31 heures alors que les cellules PC-3LN4, plus agressives, accomplissent un cycle de division en 23 heures. Paradoxalement, les cellules PC-3M sont plus lentes que la lignée parentale PC-3, prenant 50 heures pour se diviser. L'effet du TGF- β 1 sur la prolifération cellulaire se traduit par une augmentation moyenne de 12 heures du temps de doublement pour les cellules PC-3 et PC-3Pro4 alors que les cellules PC-3LN4 et PC-3M nécessitent respectivement 29,5 et 3 heures de plus. Les essais de prolifération n'ont pas été effectués sur les cellules DU-145, LNCaP C-4 et C4-2 ni sur les cellules LNCaP, ces dernières ne

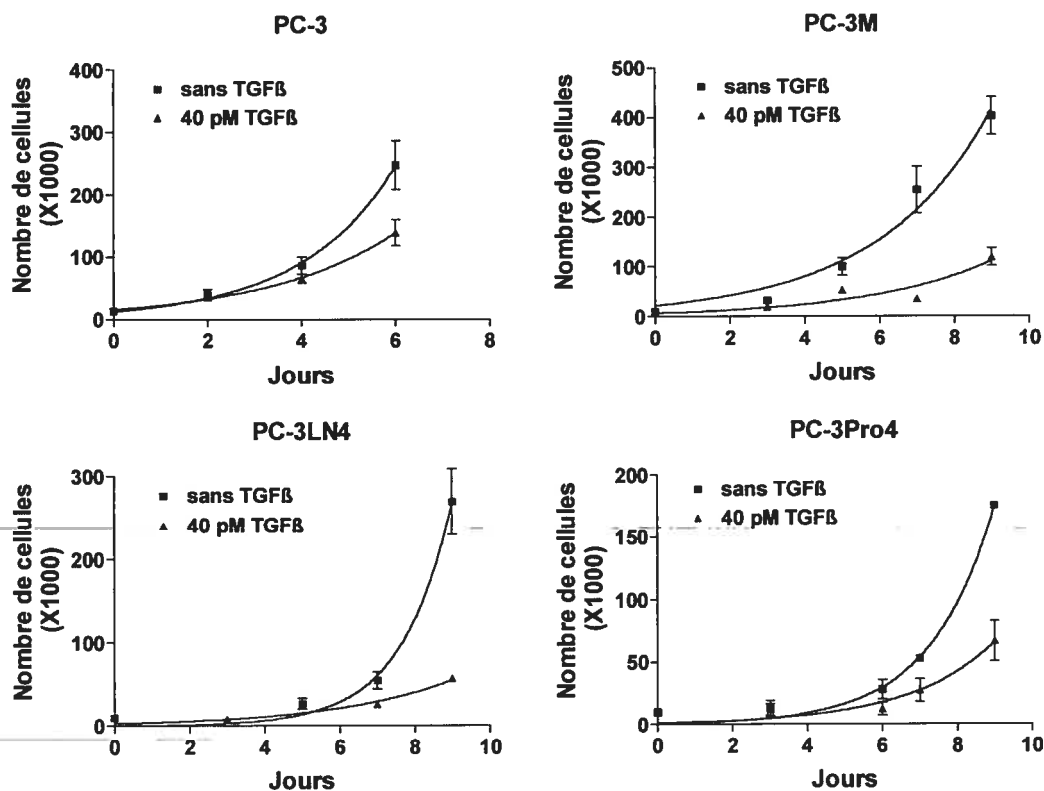
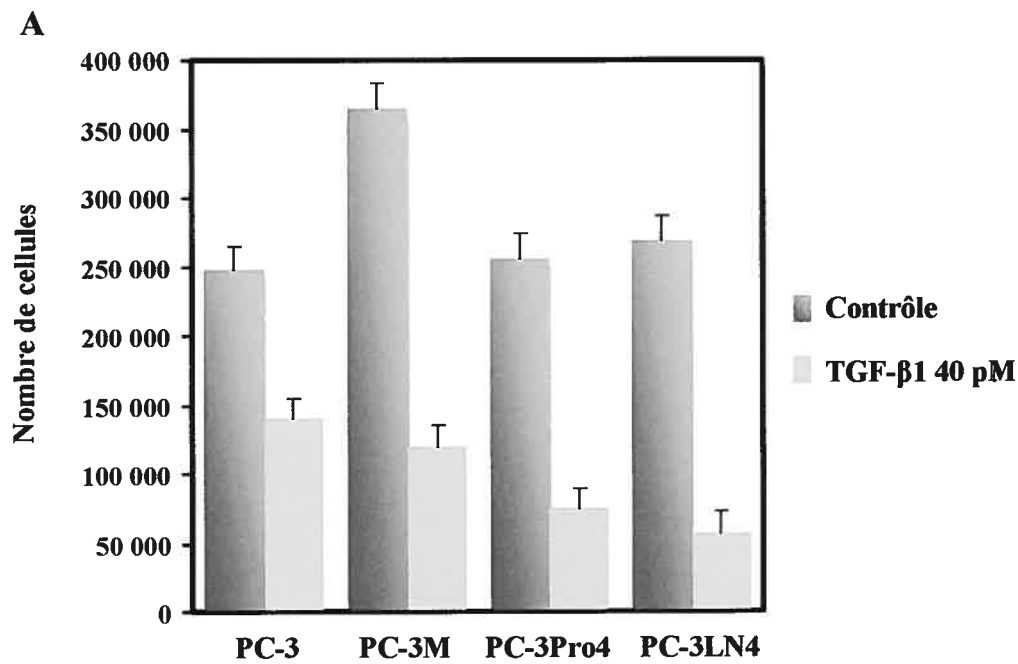


Figure 22. Cinétique d'inhibition de la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses humaines par le TGFβ

Les cellules PC-3 et leurs sous-lignées sont traitées au TGF-β1 (40 pM) en présence de sérum (voir Méthodes) pendant les périodes de temps indiquées. Les cellules sont comptées à l'hémacymètre en triplicata. Exemple type de 3 expériences montrant les nombres moyens de cellules avec leur déviation standard.



B

Lignée cellulaire	(%) inhibition
PC-3	43,4 ± 0,9
PC-3M	67,2 ± 6,0*
PC-3Pro4	61,7 ± 7,6*
PC-3LN4	78,7 ± 3,9*

*P<0.01 vs PC-3; n=3

Figure 23. Effet maximal du TGF-β1 sur la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses humaines.

A) Histogramme montrant l'inhibition de la prolifération des différentes sous-lignées de cellules PC-3 par le TGF-β1 après 9 jours. B) Analyse statistique de l'inhibition de leur prolifération par le TGF-β1. Les différences sont statistiquement significatives pour chacune des lignées prostatiques étudiées selon l'analyse par le *Student t test two-tailed*.

Tableau 10. Temps de doublement (heures) des cellules prostatiques cancéreuses humaines (*moyenne de 3 expériences)

Nom	sans TGF β -1	40 pM TGF β	augmentation
PC-3	34	46	1,4
PC-3M	50	53	1,1
PC-3Pro4	28	38	1,4
PC-3LN4	23	52	2,3

répondent pas à l'effet inhibiteur du TGF β en accord avec les données de la littérature (Guo and Kyprianou, 1999). Par ailleurs, les cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire répondent aussi à l'effet inhibiteur du TGF β (figure 24). L'analyse statistique (moyenne de deux expériences) montre un effet inhibiteur significatif du TGF β sur leur prolifération ($P < 0,0001$). Cependant, le profil de croissance diffère de celui des cellules cancéreuses qui est de type exponentiel, reflet de la perte d'inhibition de contact. Les cellules canines normales prolifèrent pendant environ 192 heures suivi d'un ralentissement de la croissance. Les cellules traitées au TGF β sont sensibles à son effet à partir du jour 4 de culture correspondant au début de leur phase de prolifération. L'inhibition représente un maximum de 40% et se poursuit jusqu'à 12 jours de traitement et possiblement par extrapolation les cellules s'arrêtent de croître par inhibition de contact. Selon une estimation du temps de doublement, les cellules normales prennent environ 96 heures pour se diviser. Ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur du TGF β varie de pair avec les propriétés tumorigéniques des cellules. Ainsi, il semble exister un lien entre l'amplitude de

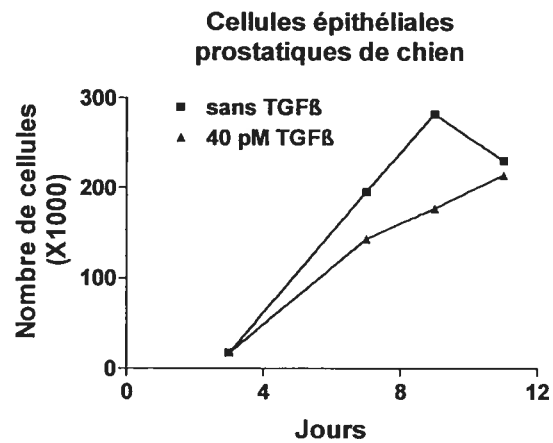


Figure 24. Effet du TGF-β1 sur la prolifération des cellules prostatiques normales de chien

Les cellules prostatiques épithéliales de chien sont traitées avec 40 pM de TGF-β1 en présence de sérum de chien à partir du troisième jour de culture. Aux temps indiqués, les cellules sont comptées à l'aide d'un hémacymètre en triplicata. L'expérience a été répétée deux fois.

l'effet inhibiteur du TGF β sur la prolifération des cellules épithéliales prostatiques et le potentiel de formation des tumeurs des lignées prostatiques, l'intensité de l'effet d'inhibition étant moindre dans la situation des cellules normales. Les tumeurs prostatiques sont composées de cellules cancéreuses de différents phénotypes, évoluant du plus vers le moins différencié selon les stades de progression du CaP et la perte de réponse aux thérapies hormonales. Tel que mentionné, l'endogline n'est généralement pas exprimée dans les cellules des épithéliums normaux. Au moins deux études ont montré l'expression de l'endogline dans des cellules épithéliales cancéreuses; la première par immunohistochimie dans les cellules cancéreuses ovariennes chez l'humain et la deuxième par cytométrie en flux à la surface des cellules PC-3, DU-145 et LNCaP. Comme ceci suggère que l'endogline s'associe à la transformation cellulaire, nous avons voulu confirmer l'expression rapportée de l'endogline dans les lignées parentales et vérifier sa présence dans les différentes autres sous-lignées de CaP humain par cytométrie en flux, immunobuvardage, et analyse d'ARN.

3.3. Recherche de l'endogline

3.3.1. Recherche de l'endogline à la surface des cellules

L'endogline étant une molécule de surface, sa présence dans les cellules épithéliales prostatiques a été vérifiée dans un premier temps par cytométrie en flux. L'anticorps utilisé est le 44G4, celui-là même qui a permis d'identifier l'endogline (Quackenbush and Letarte, 1985). Il est dirigé contre les molécules de surface des cellules HOON et provient du surnageant de la culture d'hybridomes. Les fibroblastes humains et les cellules HOON ont été utilisés comme contrôles positifs de la technique. La figure 25 est un exemple

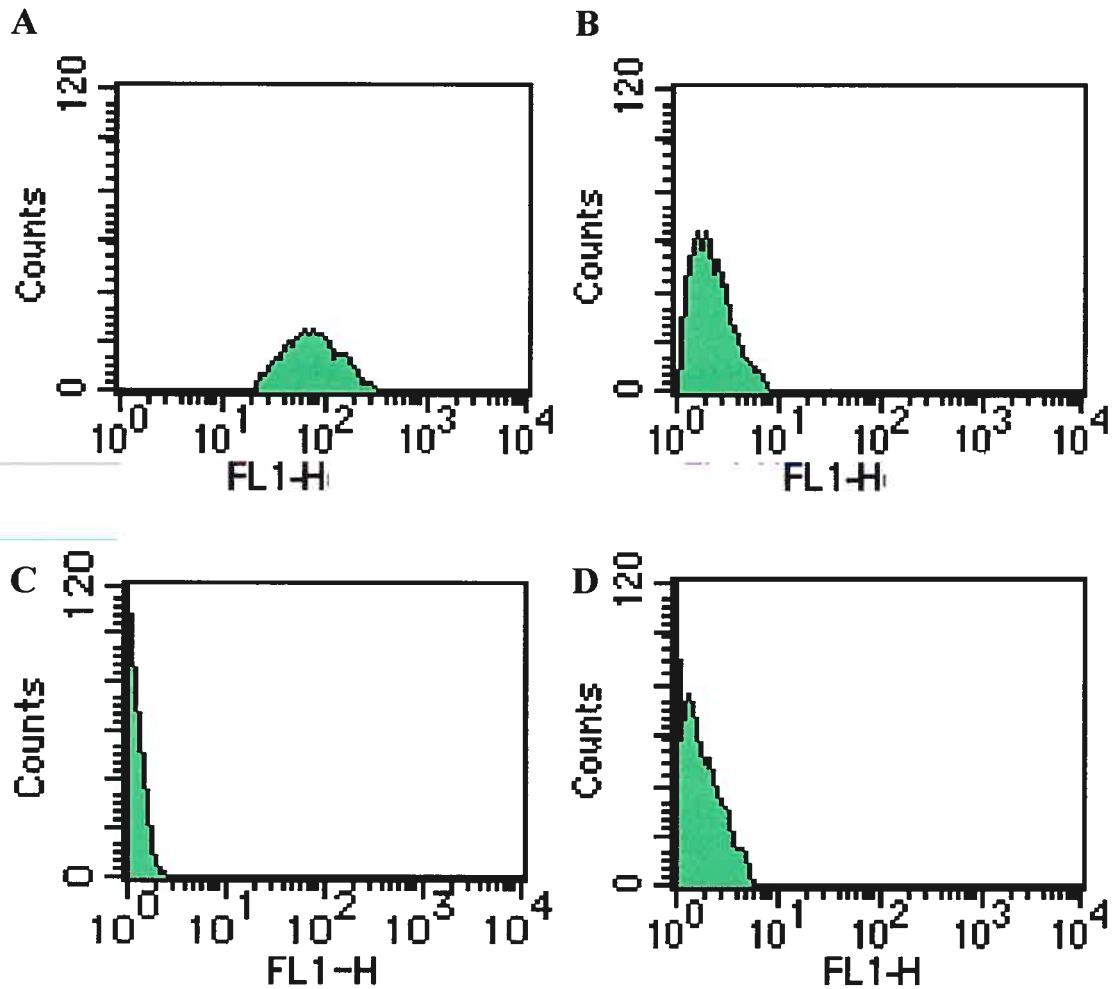


Figure 25. Contrôle de l'analyse de l'expression de l'endogline par cytométrie en flux.

Les fibroblastes humains expriment l'endogline à leur surface. Les histogrammes représentent les cellules incubées avec les anticorps (A) 44G4 et l'anti-souris couplé à la FITC, de même que (B) les IgG₁ de souris correspondant à l'isotype de l'anticorps 44G4 (C) sans anticorps primaire et secondaire et (D) seulement un anti-souris couplé à la FITC.

représentatif des résultats. L'intensité de la fluorescence de l'histogramme de la figure 25A montre que l'anticorps reconnaît l'endogline exprimée à la surface des fibroblastes humains en culture primaire. Des résultats semblables (non montrés) sont obtenus avec les cellules HOON. La figure 25B montre l'absence de marquage des fibroblastes lorsqu'en présence d'un anticorps contrôle de même isotype que le 44G4, indiquant la spécificité de marquage du 44G4. Tels que le démontrent les parties C et D de la figure 25, les cellules incubées sans anticorps ou en présence d'anticorps anti-souris couplés à la fluorescéine (FITC) n'émettent pas de fluorescence significative. Comme ceci confirme la validité de cette méthode, elle est ensuite appliquée aux cellules des lignées PC-3 et LNCaP. L'analyse des diagrammes montrés à la figure 26 (A et B) révèle que ces deux lignées n'expriment pas l'endogline à leur surface. Des essais semblables ont été réalisés et reproduits avec les lignées PC-3M, PC-3MPro4 et PC3-3MLN4, les cellules prostatiques de chien au jour 3 de culture, et les cellules DU-145. Les sous-lignées C-4 et C-4-2 n'ont pas été testées. Pour chacun des types cellulaires, les contrôles pour mesurer l'autofluorescence et le marquage spécifique par l'anticorps ont été vérifiés. Selon ces données de cytométrie en flux avec l'anticorps 44G4, et contrairement à l'étude de Rokhlin (Rokhlin and Cohen, 1995) indiquant l'expression de l'endogline à la surface dans les cellules PC-3, DU-145 et LNCaP, aucune des lignées cancéreuses testées n'exprime l'endogline. Comme il est possible que l'endogline faiblement exprimée dans les diverses lignées montrant pourtant des réponses différentes au TGF β soit non accessible, nous avons ensuite réalisé des expériences pour l'étudier par immunobuvardage à partir des protéines solubilisées.

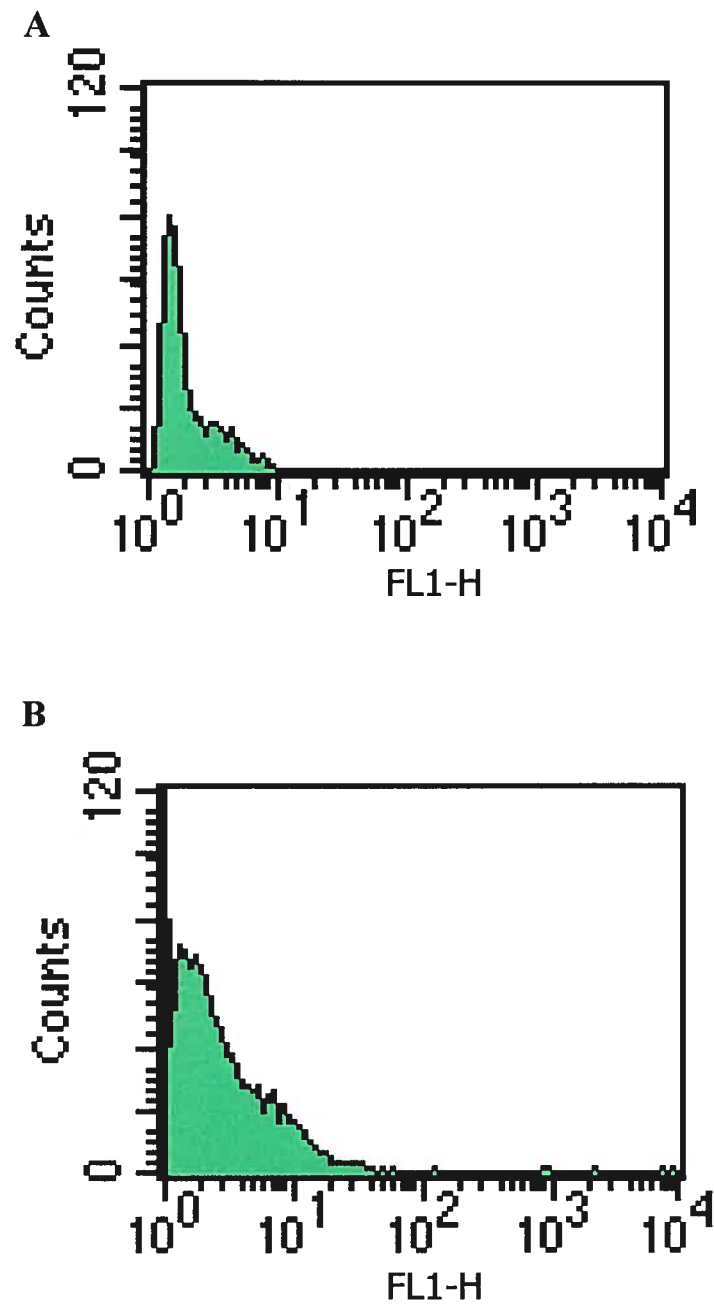


Figure 26. Analyse représentative de la recherche d'endogline à la surface des cellules cancéreuses prostatiques humaines

Les cellules PC-3 (A) et les cellules LNCaP (B) sont incubées avec l'anticorps 44G4 et marquées par immunofluorescence indirecte avec un anti-souris couplé à la FITC.

3.3.2. Recherche de l'endogline par l'expression de la protéine totale

L'endogline est une glycoprotéine existant sous forme de monomères de 90-95 kDa, aussi assemblés en homodimères de 180 kDa par un pont disulfure. Sous sa forme réduite, elle se présente donc comme un monomère. Au début de ces études, les essais d'immunobuvardage ont été réalisés en utilisant le seul anticorps disponible, le 44G4. Nous avons donc partiellement purifié l'endogline du placenta humain ainsi que des cellules HOON pour obtenir des contrôles positifs afin de vérifier la spécificité moléculaire de cet anticorps en immunobuvardage, à la fois en conditions non réductrices et réductrices. Les résultats de la figure 27 montrent qu'en présence de 50 µg d'endogline semi-purifiée, l'anticorps 44G4 ne reconnaît pas l'endogline homodimérique, ni l'endogline monomérique. Les cellules PC-3 affichent un patron de détection similaire. Nous avons donc purifié les anticorps 44G4 eux-mêmes et utilisé des concentrations croissantes pour tenter de détecter l'endogline placentaire. Les résultats de la figure 28 montrent que dans ces conditions d'essais, le 44G4 purifié détecte une bande à 180 kDa correspondant à l'endogline homodimérique, à raison de 10 µg/mL d'anticorps purifié requis pour reconnaître la protéine. Afin de déterminer les meilleures conditions d'immunodétection de l'endogline avec cet anticorps et de mieux préciser sa spécificité, des essais d'immunoprécipitation, suivis d'immunobuvardage des protéines par l'anti-endogline 44G4 ont été réalisés, notamment en utilisant les cellules HOON. Bien que l'anticorps 44G4 purifié reconnaisse l'endogline placentaire (figure 28), il ne détecte pas l'endogline dans l'immunoprécipité des cellules HOON, tant sous sa forme homodimérique que monomérique (figure 29). Des bandes non spécifiques apparaissent dans les

Immunobuvardage: 44G4 4X

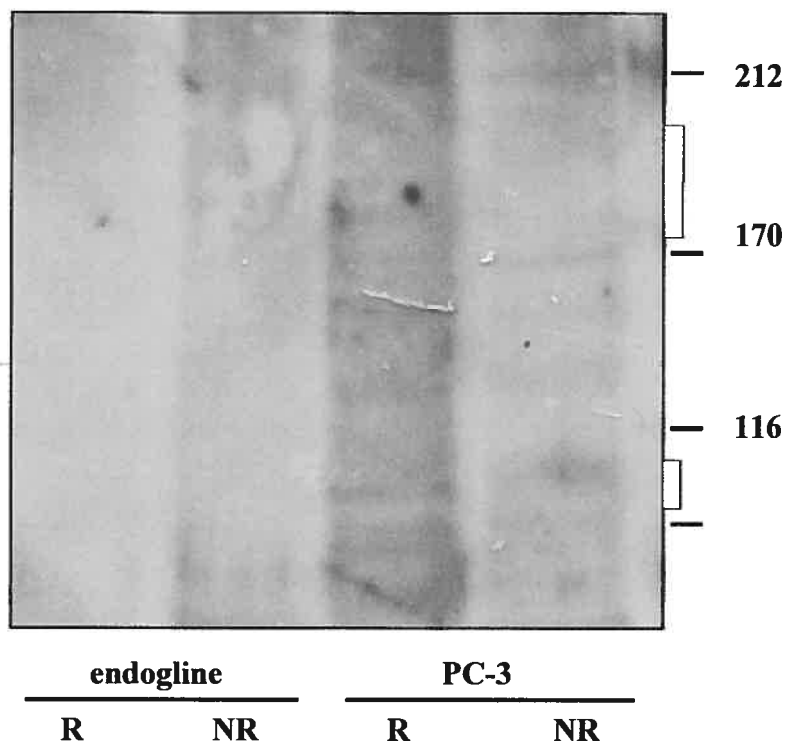


Figure 27. Détection de l'endogline par l'anticorps 44G4.

Cinquante μg d'endogline semi-purifiée du placenta et 50 μg d'extrait protéique total de cellules PC-3 ont été dilués dans le tampon de Laemmli, en conditions non réductrices (NR) et réductrices (R) puis séparés par SDS-PAGE. Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, l'endogline a été immuodéctée à l'aide d'un anticorps anti-endogline 44G4. La membrane a été exposée pendant 10 minutes. Les zones attendues pour la détection de l'endogline homodimérique et monomérique sont identifiées par les crochets. L'expérience a été répétée trois fois.

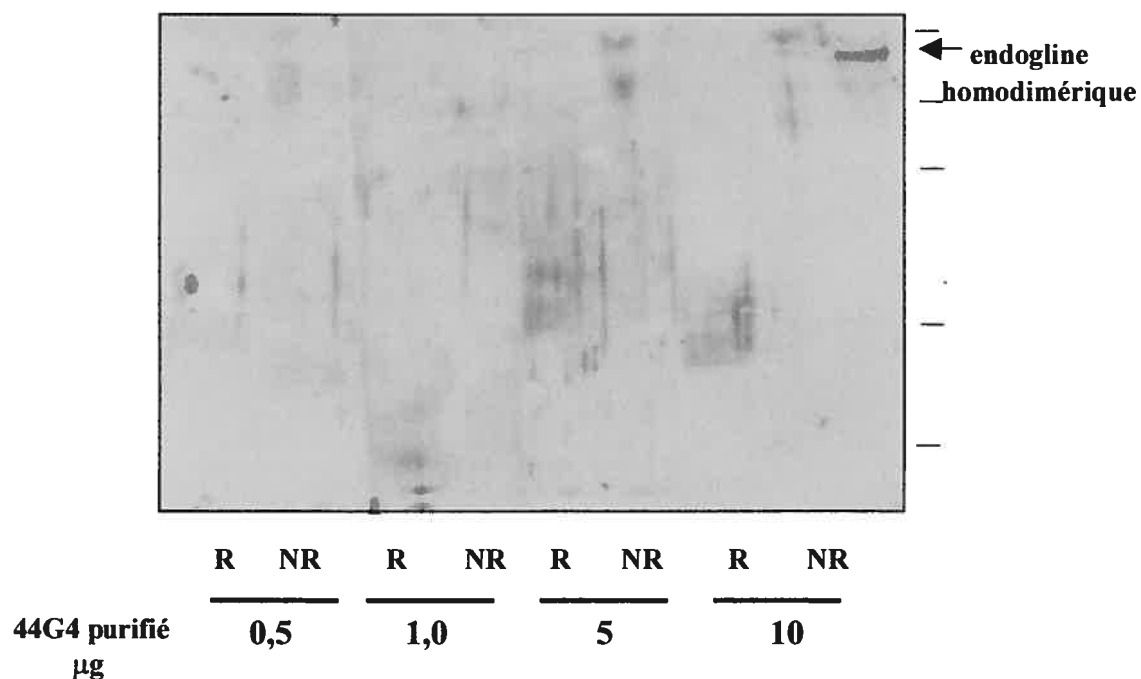


Figure 28. Immunoréactivité de l'anticorps 44G4 purifié.

L'anticorps 44G4 purifié sur une colonne d'affinité de protéine G est utilisé à différentes concentrations pour l'immunodétection de 200 µg d'endogline partiellement purifiée du placenta humain. L'endogline a été diluée dans un tampon de Laemmli en conditions non réductrices (NR) et réductrices (R). La membrane a été exposée pendant 10 minutes. L'expérience a été répétée trois fois.

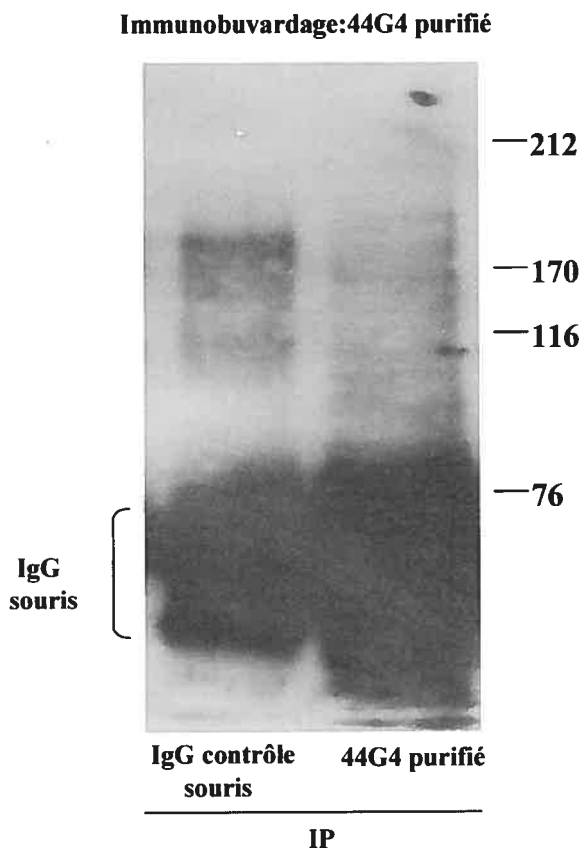


Figure 29. Immunoprécipitation de l'endogline des cellules HOON et réactivité de l'anticorps 44G4 sur des immunoprécipités.

Les extraits cellulaires (500 µg) ont d'abord été incubés avec des billes de protéine G. Le surnageant est récupéré et immunoprécipité avec l'anticorps 44G4 purifié et les IgG contrôle de souris. Les complexes immuns recueillis sur des billes de protéine G sont élués dans un tampon de Laemmli réducteur. L'immunodétection de l'endogline a été faite avec 10 µg d'anticorps 44G4 purifié. Les IgG de souris détectés par le deuxième anticorps sont illustrés à gauche. L'expérience a été répétée trois fois.

immunoprécipités avec les IgG contrôle de souris (figure 29). Ces données indiquent que l'anticorps 44G4 montre une bonne réactivité avec l'endogline native, tel que démontré par les études de cytométrie en flux. Cependant, de grandes quantités sont requises pour obtenir une réactivité de la forme dimérique d'endogline semi-purifiée du placenta en immunobuvardage, de sorte que cet anticorps ne permet pas de confirmer l'expression de l'endogline dans les cellules prostatiques. L'ensemble de ces résultats suggère que cet anticorps reconnaisse des épitopes conformationnels de l'endogline ou montre très peu d'affinité pour les épitopes linéaires.

La commercialisation de l'anticorps SN6h (dirigé contre l'endogline purifiée à partir des cellules lymphoblastiques leucémiques non-T/non-B) connu pour sa réactivité envers la protéine dénaturée en immunobuvardage nous a alors permis de poursuivre ces études pour vérifier l'expression de l'endogline. Dans ces essais, les extraits cellulaires ont été soumis à des tampons de Laemmli non réducteurs et réducteurs pour l'électrophorèse SDS-PAGE. Les cellules contrôles HOON et les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1), en remplacement des fibroblastes humains non disponibles à ce moment, ont été utilisées comme contrôle positifs. Le patron d'immunobuvardage d'extraits protéiques totaux des cellules contrôles au moyen de l'anticorps SN6h est montré à la figure 30. Il met en évidence les deux formes de l'endogline (figure 30; cellules HMEC-1 et HOON), en conditions non réductrices une bande d'environ 180 kDa correspondant aux dimères de l'endogline et en présence d'agent réducteur, une protéine monomérique de 85-95 kDa. Dans la piste des extraits protéiques des cellules HOON en conditions réduites de la figure

Immunobuvardage: SN6h

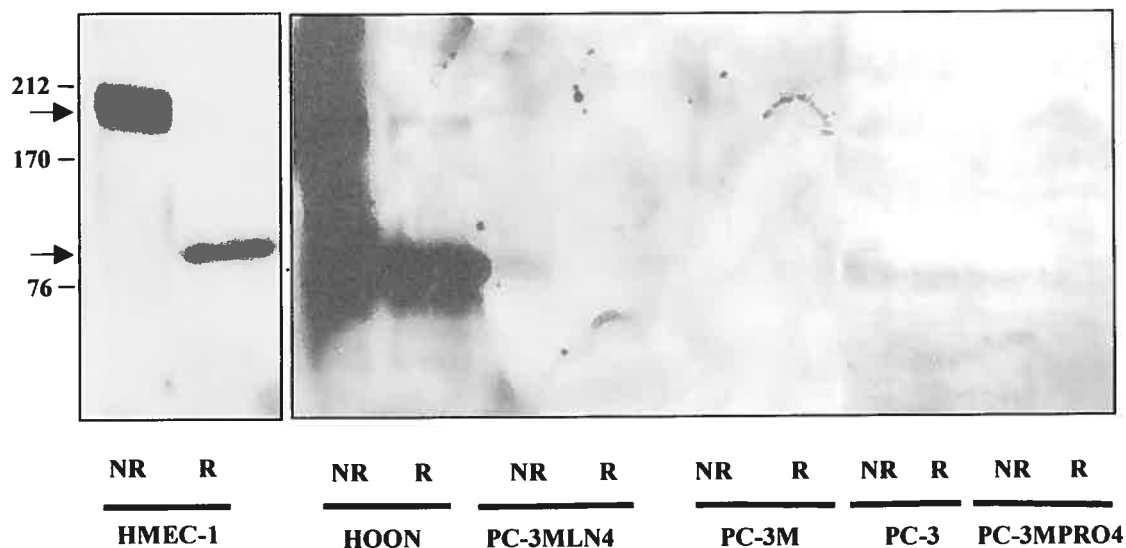


Figure 30. Recherche de l'endogline avec l'anticorps SN6h dans les lignées prostatiques cancéreuses humaines.

Les extraits cellulaires dilués dans un tampon de Laemmli non réducteur (NR) et réducteur (R) sont soumis à l'électrophorèse et l'immunobuvardage effectué avec l'anticorps anti-endogline SN6h à une dilution de 1:15 000. Les flèches indiquent la position de l'endogline homodimérique et monomérique. La membrane de droite a été surexposée (1 heure). L'expérience a été répétée trois fois.

30, il persiste une faible bande d'endogline sous forme homodimérique résultant probablement de la réduction incomplète des ponts disulfures de la protéine. La surexposition de la membrane permet de détecter de faibles bandes correspondant au poids moléculaire de l'endogline sous forme réduite pour les cellules PC-3Pro4 et PC-3 dont les extraits protéiques ont été traités avec un agent réducteur. De plus, la forme de 180 kDa de l'endogline n'est présente pour aucune des lignées prostatiques étudiées. Les lignées cellulaires DU-145, LNCaP, C4, C4-2 ainsi que les cellules prostatiques épithéliales de chien n'ont pas été testées dans cet essai. Ces données appuient celles obtenus par l'analyse en cytométrie en flux et penchent en faveur de l'absence d'endogline, tel que connue (homodimères), dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines. La présence de faibles bandes dans la région de l'endogline monomérique (conditions réductrices) laisse cependant un doute quant à la possibilité que la forme exprimée soit différente et/ou inaccessible à la détection par rapport aux cellules HOON ou les cellules endothéliales microvasculaires humaines, HMEC-1. L'expression franche de l'endogline dans ces cellules a d'ailleurs suscité de l'intérêt pour la caractérisation du système récepteur du TGF β . Ainsi, nous avons participé avec l'équipe du Dr Philip aux travaux sur la caractérisation des complexes récepteurs dans les cellules micro-vasculaires humaines. Les résultats de ces travaux ont été publiés dans un article intitulé *Endoglin expression on human microvascular endothelial cells: association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- β signalling receptors*. Ce dernier est placé en annexe I à la fin de la thèse. Ma contribution a consisté aux expériences d'immunoprécipitations et d'immunobuvardage avec l'anticorps anti-endogline (SN6h) ainsi qu'aux discussions

concernant les différents complexes formés de l'endogline, du betaglycan, et des récepteurs I et II.

3.3.3. Analyse des transcrits de l'endogline

Étant donné ces difficultés et afin de nous s'assurer de l'expression de l'endogline, nous avons analysé ses transcrits à partir de l'ARN isolé des cellules PC-3 et des cellules HOON. À cette fin, nous avons généré une sonde antisens d'ARN de 239 pb (nucléotides 965-1258; numéro d'accèsion JO5481, *Genbank*) marquée à la digoxigénine ainsi que la sonde sens correspondante comme contrôle négatif. L'ARN des cellules HOON a servi de contrôle positif. L'analyse de type Northern est illustrée à la figure 31A. L'hybridation de la sonde anti-sens révèle les 2 transcrits prévus de tailles différentes (Liu et al., 2002) dans les cellules contrôles HOON, l'un de 17 kilobase (kb) correspondant à l'endogline non mature et l'autre de 3,5 kb, confirmant ainsi l'expression de l'endogline. Malgré la surexposition de la membrane, aucun transcrit franc n'est détecté aux positions escomptées pour les cellules PC-3. Tel qu'attendu, la sonde sens d'ARN ne s'apparie pas (figure 31B). Devant ces résultats sur l'expression équivoque de l'endogline dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines dans les conditions expérimentales testées, nous avons conclu que l'endogline n'est pas une protéine exprimée de façon constitutive à des niveaux tels dans ces lignées qu'elle pourrait expliquer les différences d'amplitude de la réponse des cellules prostatiques à l'effet inhibiteur du TGF β sur leur prolifération.

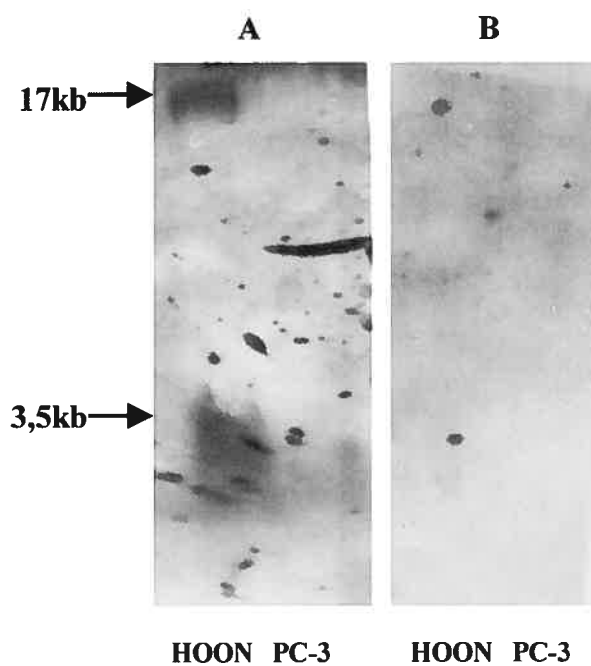


Figure 31. Analyse des transcrits de l'endogline.

L'ARN total des cellules contrôles HOON et PC-3 a été hybridé avec une sonde d'ARN anti-sens (A) et sens (B) marquée à la digoxigénine. Les signaux sont détectés par chemiluminescence, les membranes ont été exposées pendant 1 heure.

3.4. Caractérisation de c-tak1

Dans le but d'identifier des marqueurs potentiels du CaP, le laboratoire a développé une stratégie visant à amplifier par PCR des portions des sous-domaines hautement conservés dans la région catalytique des protéines kinases à partir de l'ARNm des cellules épithéliales prostatiques canines en culture primaire (Nguyen, thèse 1994), en se basant sur leurs propriétés de cellules souches se divisant activement *in vitro* en présence de FC mais indépendamment des stéroïdes. Parmi les kinases clonées, une S/TK de 78 kDa a été identifiée. Son intérêt provient de la similarité de sa taille avec une protéine S/TK p78 dont l'activité est augmentée rapidement (quelques minutes) suite à l'exposition des cellules PC-3 au TGF- β 1 (Atfi et al., 1994). Les prochaines sections seront consacrées aux résultats portant sur la caractérisation de la kinase c-tak1/kp78/mark3 en terme de l'expression de la protéine et du transcrit, de sa régulation *in vitro* et *in vivo*, de son rôle potentiel dans les cellules prostatiques cancéreuses, ainsi que l'identification de ses partenaires possibles de signalisation.

3.4.1. Identification d'un membre de la famille des kinases Mark dans les cellules prostatiques.

L'utilisation du modèle canin de cellules épithéliales prostatiques basales en culture primaire au laboratoire d'accueil a permis de démontrer que ces cellules en prolifération présentent des niveaux élevés d'activité TK et de protéines phosphorylées sur tyrosine accompagnés de faibles activités phosphotyrosine phosphatases (PTP) (Bourassa et al., 1991b; Boissonneault et al., 1995; Nguyen et al., 1996). Afin d'identifier des protéines

kinases exprimées dans ces cellules, les ODN dégénérés choisis sont dirigés contre les portions IHRDL et DXWSXG, correspondant respectivement aux sous-domaines VII et IX de la région catalytique. De petits fragments (environ 200 pb) ont ainsi été amplifiés et parmi les séquences obtenues, une séquence partielle de 63 acides aminés a été déduite (figure 32). Cette séquence peptidique chez le chien présente une identité de 97% avec les séquences de 5 membres de la famille des kinases Mark, soient c-tak1/kp78/mark3, p78, mark1, c-tak75a chez l'humain et mark2 chez la souris et la séquence de la kinase humaine markL1 possède quant à elle, 90 % d'identité. La figure 33 montre que parmi ces membres, les kinases c-tak1/kp78/mark3, p78 et c-tak75a ne diffèrent que par la présence de petits inserts. Soulignons que c-tak/kp78/mark3 représente la même protéine portant différentes appellations. Aussi, nous référerons dorénavant à cette protéine sous le nom c-tak1.

3.4.2. Analyse des transcrits des kinases Mark dans les cellules prostatiques

En relation avec les kinases de la figure 33, et le haut degré d'identité de la séquence canine obtenue relativement aux kinases humaines c-tak1, c-tak75a et p78, nous avons voulu vérifier si ces membres sont exprimés dans les cellules canines de même que dans les lignées de CaP humaines PC-3 et LNCaP et canines (DPC1). Deux paires d'amorces, S1 et S2, ont été dessinées de façon à permettre la distinction entre les transcrits selon les petites différences retrouvées dans les séquences de c-tak1, p78 et c-tak75a (revoir la figure 33). La première paire d'amorce (S1) permet de discriminer le transcrit de c-tak1 de celui de la

PCR		<u>IHRDLKAENLLLDADMNIKIADFGFSNEFTVGNKLD</u> <u>TF</u> <u>CGSPPYAAPEL</u> <u>FQ</u> <u>GKKYDGPEVD</u> <u>W</u>	63
C-tak1/Kp78/mark3	175	V.....G.....	237
P78	175	V.....G.....	237
c-tak75a	198	V.....G.....	260
Mark1	186	V.....F.....	201
MarkL1	178	V.....EA.....L.S.....	239

Figure 32. Comparaison de la séquence en acides aminés du transcrit obtenu à partir des cellules canines avec les kinases mark humaines.

Les points indiquent les acides aminés identiques. Les acides aminés correspondant aux oligonucléotides dégénérés utilisés pour le PCR sont soulignés. La séquence peptidique qui est déduite correspond à la protéine canine.

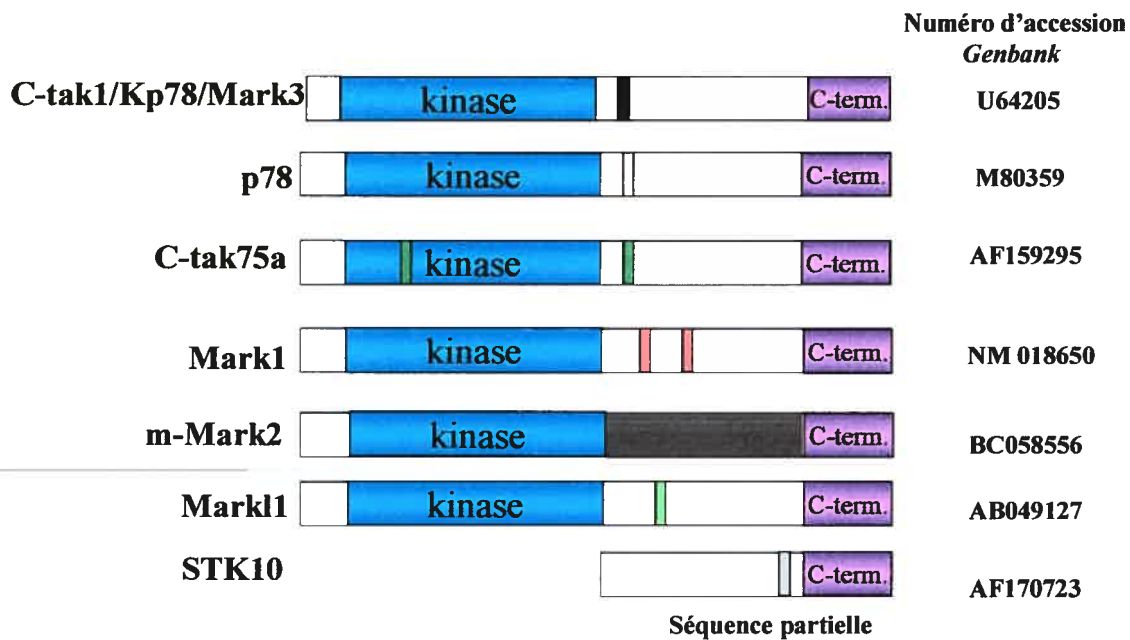


Figure 33. Représentation schématique des principaux membres homologues de la famille des kinases Mark

Cette structure rappelle celle présentée à la figure 18 de l'introduction qui définit les divers domaines de kinases de cette famille. Des petites boîtes sont ajoutées ici pour indiquer les insertions dans la séquence de diverses kinases. La kinase m-Mark2 réfère à l'espèce murine. Les numéros d'accèsion des séquences de ces membres dans la base de données *Genbank* sont indiqués à la droite de la figure.

kinase p78. On s'attend à produire respectivement des produits de PCR de 235 pb et de 187 pb. Dans la deuxième situation, les amorces S2 devraient générer un produit de PCR de 166 pb pour c-tak1 et un amplicon de 235 pb pour le variant c-tak75a. Les résultats du gel d'agarose sont illustrés à la figure 34. Dans la partie de gauche (pistes 2-3), nous montrons d'abord les contrôles positifs, i.e. les produits de PCR pour chacune des paires d'amorces utilisant le vecteur pcDNA3.1-myc-c-tak1. Les tailles des fragments obtenus au moyen des 2 amorces différentes sont respectivement les tailles attendues pour ce transcrit soient 235 et 166 pb. Les pistes suivantes montrent les profils obtenus pour les cellules prostatiques. Dans tous les cas, les fragments obtenus sont de la taille correspondant à c-tak1 et non celles prévues pour p78 et c-tak75a.. Le produit de PCR d'environ 350 bp dans la piste 6 correspondant à la lignée cellulaire canine DPC1 pourrait toutefois résulter de l'amplification d'un intron (# accession de *Genbank* du gène Mark3: NC_000014) de matériel génomique. Ces données suggèrent que les kinases p78 et c-tak75a ne sont pas exprimées dans nos modèles prostatiques.

Pour confirmer l'expression de l'ARNm de c-tak1, nous avons réalisé une analyse de type Northern au moyen d'une sonde de 557 pb marquée à la digoxigénine et dont la séquence pourrait aussi s'hybrider avec les transcrits de p78 (2,9 kb), et c-tak75a (4,0 kb) mais qui ont été exclus par les résultats de RT-PCR. La figure 35 révèle la présence d'un seul transcrit de 2,7 kb, qui correspond donc à la taille du messenger de c-tak1 et ce, autant pour les cellules PC-3 que pour les cellules LNCaP. La spécificité de la sonde est démontrée par l'absence d'hybridation de la sonde sens avec les ARN des cellules PC-3 et LNCaP (figure

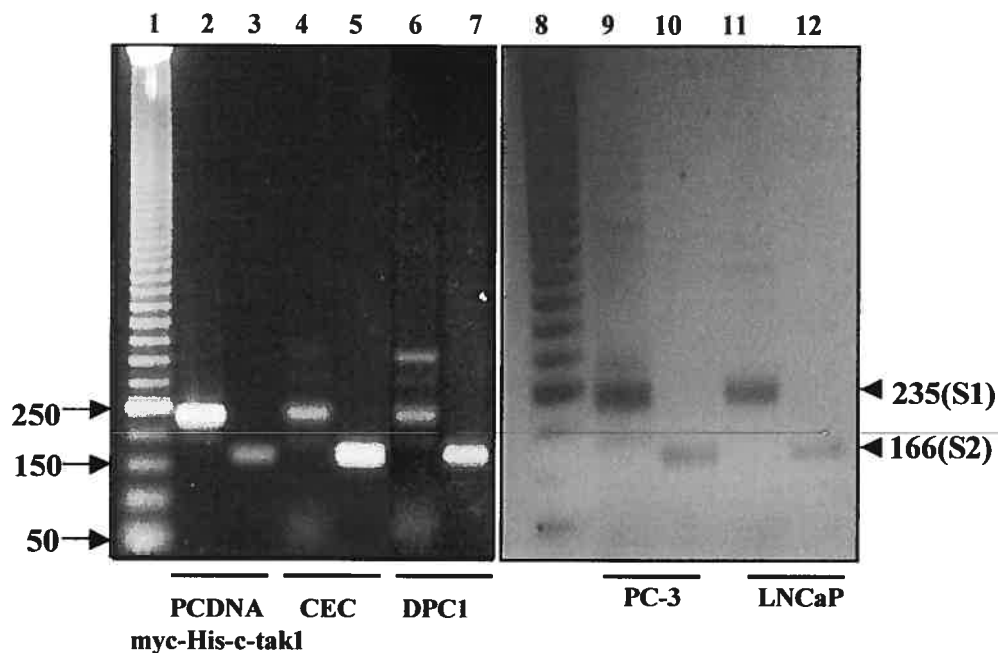


Figure 34. Analyse par RT-PCR des transcrits des kinases mark.

Les amplicons obtenus sont séparés sur un gel d'agarose de 2% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. La portion de droite de la figure est présentée en image directe (couleur non inversée) pour une meilleure clarté. Dans les pistes 2 et 3, les produits de PCR sont obtenus à partir du plasmide pcDNA myc-His-c-tak1 comme contrôle positif pour les paires d'amorces S1 et S2 qui génèrent respectivement un produit de PCR de 235 et de 166 bp. Les puits 2, 4, 6, 9 et 11 correspondent aux fragments obtenus à l'aide des amorces S1 et les puits 3, 5, 7, 10 et 12 proviennent des produits des amorces S2 et montrent les produits de la transcription reverse de l'ARN total pour les cellules épithéliales normales de la prostate de chien (CEC) en culture primaire (identifiées au bas de la figure), les lignées cellulaires DPC-1, PC-3, LNCaP.

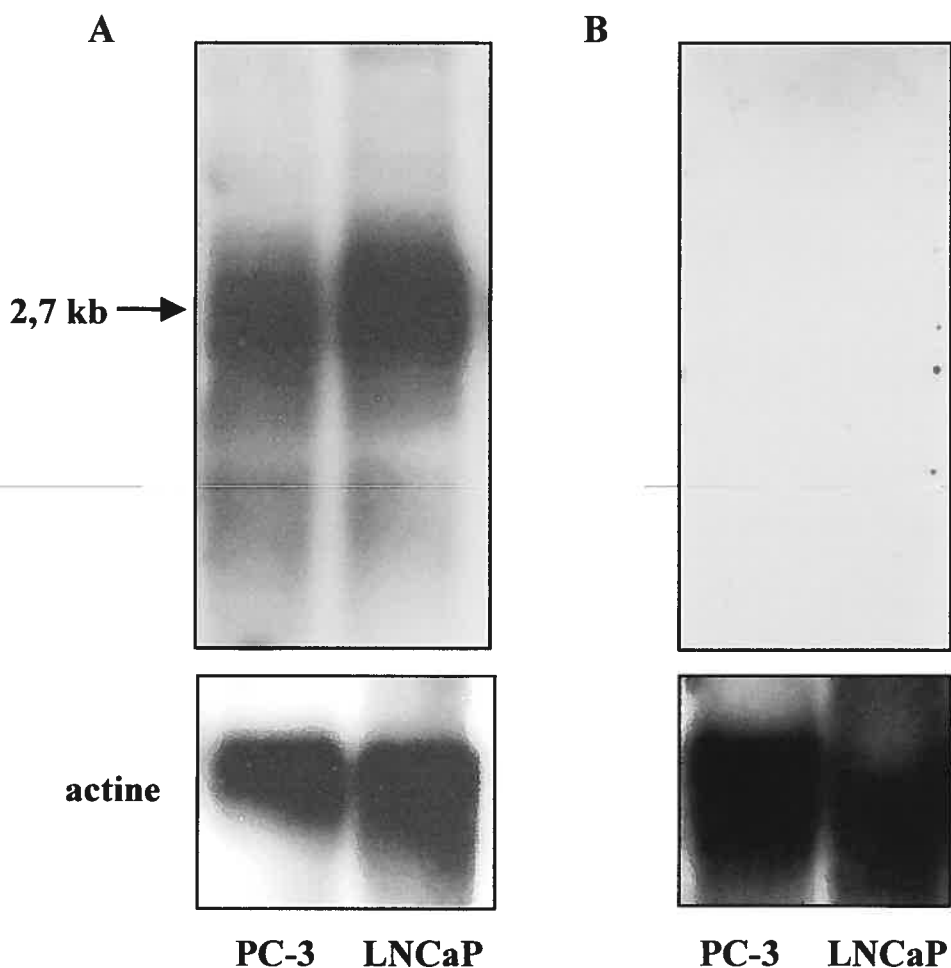


Figure 35. Analyse Northern des transcrits des kinases Mark c-tak1, p78 et c-tak75a.

L'ARN total des cellules est séparé sur gel d'agarose-formaldéhyde de 2% puis transféré par capillarité sur une membrane de nitrocellulose. L'ARN est hybridé avec les sondes antisens (A) et sens (B) de 557 pb marquées à la digoxigénine correspondant à c-tak1, c-tak75a, et p78. La révélation se fait à l'aide d'un système d'amplification. La partie inférieure illustre l'hybridation pour le transcrit d'actine des cellules PC-3 et LNCaP et permet de contrôler la quantité d'ARN chargée pour l'électrophorèse. L'expérience a été répétée deux fois.

35B). Le contrôle d'actine est aussi montré. L'analyse de l'intensité des transcrits de c-tak1 par rapport à celle de l'actine révèle des ratios de 1,34 et 1,15 pour les cellules PC-3 et LNCaP et les différences (n=2) ne sont pas significatives. Ces données indiquent que les deux types de cellules expriment le transcrit de façon équivalente.

3.5. Production d'anticorps

Le fait que la kinase c-tak1 n'ait pas fait l'objet d'études approfondies et qu'aucun anticorps n'était disponible pour sa caractérisation dans les modèles cellulaires prostatiques nous a incité à produire des anticorps. Des essais ont été réalisés, d'abord en utilisant comme antigène une protéine de fusion correspondant à un fragment de c-tak1-avec la GST (*glutathione S-transferase*) puis différents peptides de synthèse dérivés de sa séquence.

3.5.1. Obtention des anticorps

3.5.1.1. Protéine de fusion GST/c-tak1

Le système de fusion génique GST permet l'expression, la purification, et la détection de protéines de fusion produites, entre autres, dans les bactéries. Brièvement, une séquence codant pour une portion de la protéine GST est incorporée dans le vecteur (PGEX-4T3) en aval des sites de clonage multiples avec le gène d'intérêt, en l'occurrence une portion de la séquence codant pour c-tak1 clonée dans ce vecteur. La transformation de bactéries suivie de l'induction du vecteur PGEX-4T3 conduit alors à la production d'une protéine de fusion contenant les portions des 2 gènes de départ, i.e. GST/c-tak1.

Ayant obtenu l'ADNc correspondant à la séquence complète de c-tak1 à partir d'une librairie d'ADNc de cellules PC-3 (travaux de A.Atfi et P. Beaulieu; non publiés), nous

l'avons sous-cloné dans le vecteur pCR-Script Amp SK (+) et avons généré par PCR un fragment de 1253 pb (montré à la figure 36A et correspondant à la taille attendue) qui a par la suite été cloné dans le vecteur de fusion génique GST aux sites de restriction *EcoRI* et *Sall* et analysé sur gel d'agarose. La figure 36B (piste 2) illustre le vecteur PGEX-4T3 contenant l'insert de c-tak1 et les pistes 3 et 4 révèlent la présence de l'insert de 1253 pb après digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *Sall*.

Un tel vecteur GST/c-tak1 induit dans les bactéries devrait produire une protéine de fusion de 71 kDa, i.e. correspondant à l'addition de la taille des fragments de la GST (29 kDa) et c-tak1 (42 kDa). Différentes conditions d'induction ont donc été testées. Un exemple représentatif des résultats obtenus est montré à la figure 37. Le gel d'électrophorèse SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie, ne révèle aucune protéine de 71 kDa produite par le système d'induction. En effet, la comparaison des pistes correspondant aux différentes conditions d'induction (pistes 3, 4, 5 et 6) et de purification (fractions solubles (S), pistes 3 et 4; fractions insolubles (C), pistes 5 et 6) avec celle illustrant le profil de protéines du vecteur non induit (piste 2; N.I.) ne montre pas la présence spécifique de la protéine d'induction. Considérant l'absence de production de la protéine de fusion par les différents clones au terme de différentes conditions expérimentales, nous avons eu recours à la synthèse de deux peptides retrouvés dans la séquence de c-tak1 comme source d'antigènes pour l'immunisation.

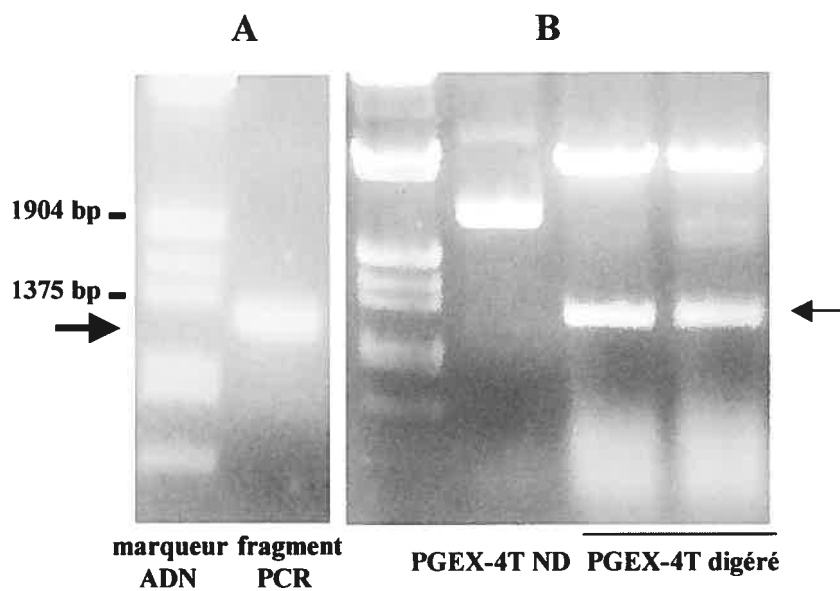


Figure 36. Clonage de c-tak1

Un fragment de c-tak1 a été obtenu par PCR et inséré dans le vecteur PGEX-4T. Les colonies obtenues après la transformation de bactéries compétentes sont analysées sur gel d'agarose après digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *SalI*. Les flèches indiquent le fragment de 1253 bp correspondant à l'insert de c-tak1 attendu.

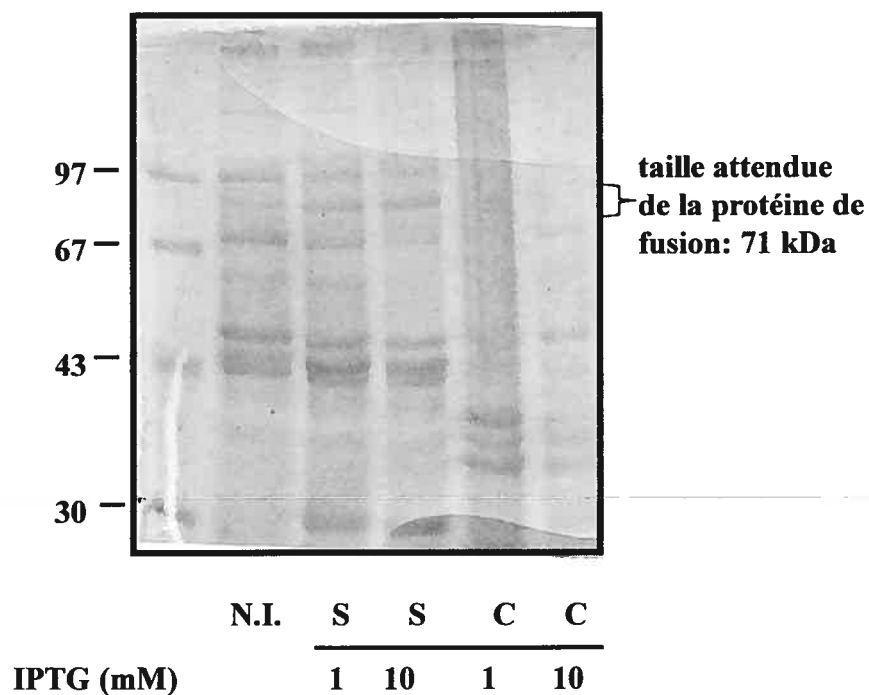


Figure 37. Gel représentatif des essais d'induction de la protéine fusion GST/c-tak1.

Les clones ont été induits à différentes concentrations d'IPTG pendant 4 h. Les extraits ont été fractionnés de manière à obtenir les protéines solubles (S) et insolubles (C) puis analysés par électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. La piste 2 correspond aux bactéries non induites (N.I).

3.5.1.2. Peptides de synthèse

Deux peptides de synthèse ont été produits. Le premier peptide (P1805) correspond à un domaine de 16 acides aminés unique à c-tak1 tandis que le deuxième peptide (P1806), localisé dans la région 20-39 de la séquence, est aussi retrouvé dans les séquences de p78 et c-tak75a. Les 2 peptides ont servi d'antigènes pour immuniser les lapins à raison de 2 animaux pour chacun des antigènes. La réponse immunitaire produite après chaque injection d'antigènes est vérifiée par un test ELISA permettant d'évaluer la réactivité de l'anticorps produit face à son antigène. Le graphique de la figure 38 illustre la réponse immunitaire la plus élevée pour chacun des peptides chez un des lapins de chaque catégorie, 4 semaines suivant la première injection d'antigènes. La comparaison des courbes d'ELISA révèle que le lapin immunisé avec le peptide P1806 a produit rapidement des anticorps ayant un titre élevé maximal à la première injection de 1/100 000 et surpassant de 10 fois la valeur du titre obtenu avec l'antigène P1805. Tel qu'attendu, le sérum pré-immun ne montre aucune réactivité.

Le résumé des titres obtenus au cours de l'immunisation est présenté au tableau 11. Trois des quatre lapins immunisés ont donné des titres d'anticorps égal ou supérieur à 1/400 000 après la troisième dose de rappel. Ces valeurs de dilution étant suffisamment élevées, les lapins ont été sacrifiés et les antisérums testés en immunobuvardage.

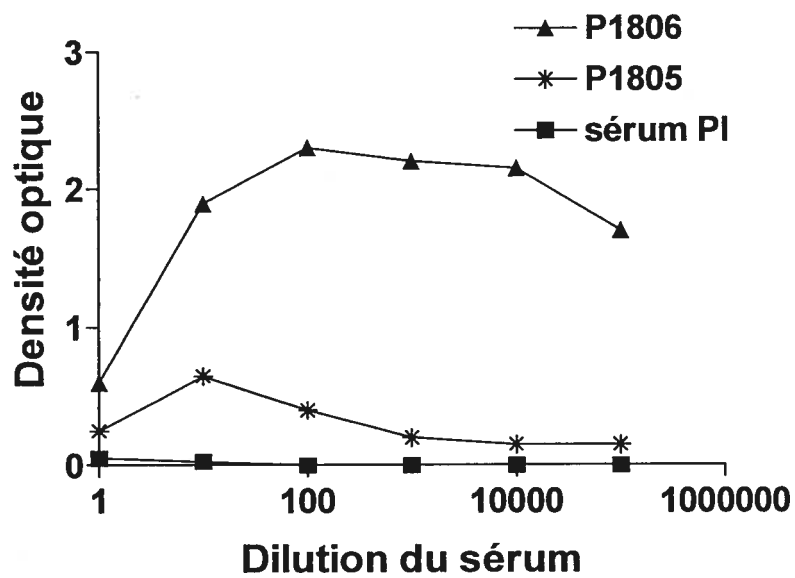


Figure 38. Réactivité des antisérums aux peptides P1805 et P1806.

Titres des antisérums obtenus chez les lapins ayant eu la plus forte réponse immunitaire aux antigènes P1805 et P1806 suivant la première immunisation.

3.5.2. Expression de la protéine c-tak1

3.5.2.1. Détection de la protéine

Chacun des anticorps a d'abord été purifié sur une colonne de protéine A pour obtenir une fraction enrichie en IgG. La quantité d'IgG purifiée est évaluée par sa valeur de densité optique à 280 nm et les fractions dont les valeurs correspondent au pic d'éluion sont récupérées, concentrées en une seule aliquote à l'aide d'unités de centrifugation par filtres.

Tableau 11. Titre des antisérums en réponse aux peptides P1805 et P1806.

Deux lapins ont été immunisés avec chacun des peptides et ont reçu trois doses de rappel avec leur peptide respectif.

		1 ^{ère} injection	3 ^{ème} dose de rappel
P1805	Lapin 1	1/10 000	1/400 000
	Lapin 2	1/50 000	1/100 000
P1806	Lapin 1	1/100 000	1/(>400 000)
	Lapin 2	1/10 000	1/(>400 000)

Les IgG purifiées sont par la suite testées pour leur réactivité en ELISA et les résultats sont présentés à la figure 39. Les titres optimaux pour les IgG purifiées des deux lapins immunisés avec le peptide P1806 sont similaires et de l'ordre de 1/100 000 et 1/1 000 000 tel qu'attendu, les IgG pré-immunes ont peu de réactivité avec le peptide antigénique. Des résultats similaires (non montrés) ont été obtenus pour les IgG du peptide P1805.

L'étape subséquente est de tester les anticorps pour détecter la protéine (taille attendue de 80 kDa) par immunobuvardage. Une représentation des résultats obtenus avec les anticorps du lapin 1 contre P1805 sur des extraits totaux de cellules PC-3 est illustrée à la figure 40. Aucune immunodétection de la protéine c-tak1 (PM de 80 kDa) a été observée (pistes 1, 2 et 3) à l'aide de différentes concentrations d'anticorps (1, 3 et 5 µg). Quelques bandes non

**Purification des anticorps P1806
sur colonne d'affinité**

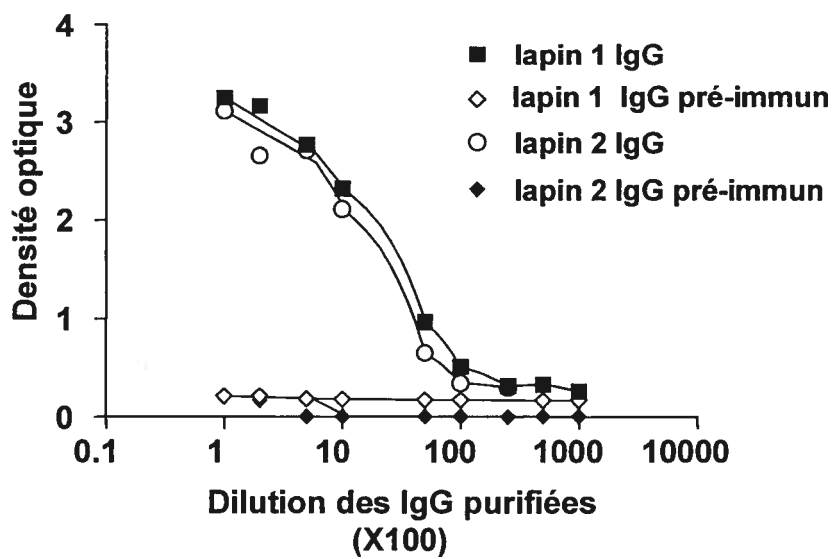


Figure 39. Réactivité des IgG purifiées envers le peptide P1806

Les antisérums et les sérums pré-immuns ont été purifiés sur une colonne d'affinité et testés pour leur réactivité par ELISA.

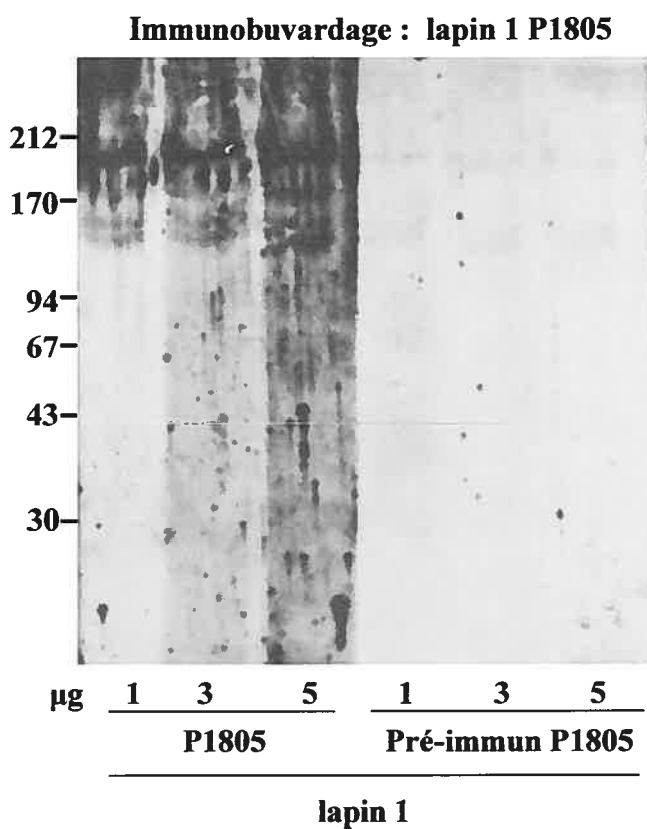


Figure 40. Recherche de la protéine c-tak1 avec les anticorps purifiés du lapin P1805

Des extraits totaux de cellules PC-3 ont été séparés par électrophorèse et transférés sur membrane de nitrocellulose. Différentes concentrations d'IgG purifiées (P1805; pistes 1, 2 et 3) ainsi que les IgG contrôles du lapin (pistes 4, 5 et 6) ont été utilisées pour l'immunobuvardage visant à détecter c-tak1.

spécifiques sont détectées dans la zone de migration de 116-200 kDa, tant par l'anticorps P1805 que par les IgG contrôles de lapin (pistes 4, 5 et 6) Les mêmes résultats d'immunodétection sont obtenus pour les anticorps P1805 du lapin 2 ainsi que les anticorps des lapins 1 et 2 immunisés avec le peptide P1806.

Devant cette absence d'immunoréactivité, nous avons repris ce type d'expériences en utilisant des immunoprécipités obtenus à partir d'extraits totaux de cellules PC-3. Brièvement, les extraits protéiques sont préalablement incubés avec des billes de protéine G afin d'éliminer les protéines qui adhèrent de façon non spécifique sur les billes. Les IgG des sérums pré-immuns correspondants ont été utilisés en parallèle avec les anticorps pour l'immunoprécipitation des protéines. Les résultats obtenus avec l'anticorps P1805 (lapin 1) sont représentés à la figure 41. La partie B montre qu'aucune protéine spécifique est détectée par l'anticorps après immunoprécipitation tout comme pour le contrôle (partie A). Les parties C et D montrent le profil de détection tel qu'en A et B mais cette fois-ci en utilisant les anticorps P1805 du lapin 2. Les mêmes essais ont été reproduits pour les anticorps P1806 des lapins 1 et 2 et n'ont pas permis de détecter la protéine c-tak1. Ainsi aucun des anticorps produits ne détecte une protéine immunoprécipitée malgré le fait que les anticorps, notamment le P1806, aient un titre très élevé.

Tous ces essais d'immunodétection s'étant avérés négatifs, nous avons voulu vérifier si les anticorps pouvaient reconnaître la protéine dans sa forme native. A cet égard, des extraits protéiques de cellules PC-3 ont été resuspendus dans du tampon de solubilisation non réducteur et sans SDS préservant ainsi les protéines dans leurs conditions natives. Elles ont

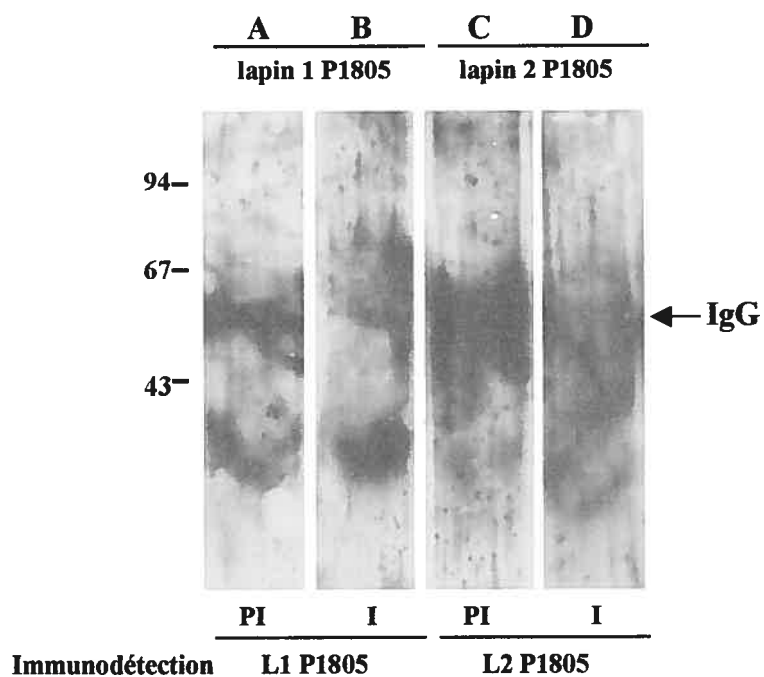


Figure 41. Recherche de la protéine c-tak1 par immunobuvardage après immunoprécipitation avec les anticorps P1805.

Des extraits protéiques de cellules PC-3 ont été immunoprécipités avec le sérum pré-immun (PI) (A) et avec les antisérums (I) du lapin 1 P1805 (B). L'immunodétection a été réalisée avec les mêmes antisérums. Les parties C et D correspondent aux immunoprécipités des antisérums du lapin 2 P1805. La membrane a été surexposée (2 heures).

ensuite été séparées dans un gel PAGE non dénaturant, puis transférées sur membrane et soumises à l'immunodétection, respectivement avec les anticorps et IgGs purifiés des sérums pré-immuns et immuns P1805 et P1806 et ce, pour chacun des lapins. Les résultats pour les anticorps P1805 des 2 lapins peuvent être visualisés à la figure 42. Ils révèlent aucune protéine spécifique. Le même profil a été obtenu pour les anticorps P1806 des lapins 1 et 2.

3.5.2.2. Activation de c-tak1

Comme dernière tentative, nous avons mis à profit le fait que la protéine c-tak1 est une protéine kinase et avons misé sur l'expérience antérieure du laboratoire qui a rapporté une technique de renaturation des protéines en gel permettant de détecter l'activité kinasique des protéines (Durocher et al., 1992). Brièvement, les protéines sont séparées sur un gel d'acrylamide, dénaturées, renaturées, incubées par la suite en présence d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ afin de détecter l'activité kinasique visualisée par des bandes phosphorylées en autoradiographie. Dans le cas présent, les extraits protéiques de cellules PC-3 ont été immunoprécipités avec les deux anticorps pour vérifier si les anticorps reconnaissaient bel et bien une protéine dont l'activité enzymatique pouvait être testée après immunoprécipitation. La figure 43 montre les résultats obtenus. L'autoradiogramme révèle une bande active migrant au PM correspondant à celui de c-tak1 et ce, pour l'immunoprécipité effectué avec les deux antisérums P1806 et avec une de plus forte intensité pour le lapin 2. Les anticorps P1805 des deux lapins n'ont pas immunoprécipité aucune protéine kinase active de même que tous les sérums pré-immuns. Ces résultats indiquent que les anticorps du sérum P1806

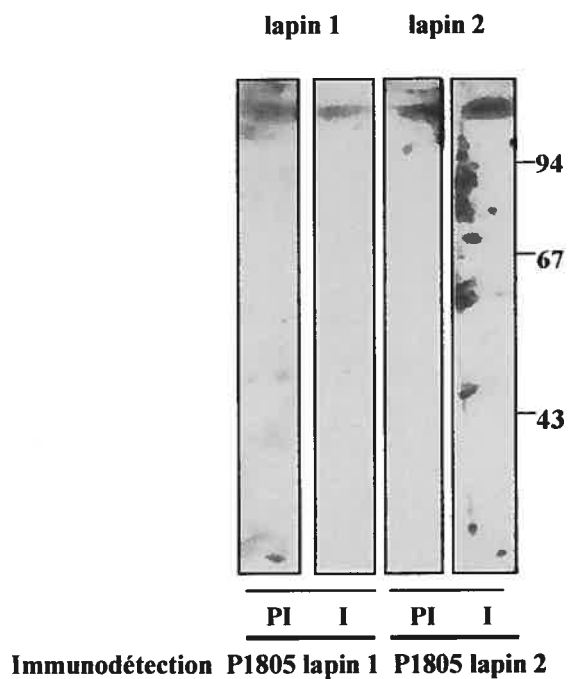


Figure 42. Recherche de la protéine c-tak1 native.

Les extraits protéiques de cellules PC-3 ont été séparés sur un gel PAGE non dénaturant, transférés sur membrane de nitrocellulose et immunodéfectés à l'aide des IgG purifiés des lapins 1 et 2 immunisés avec P1805 (I) et les IgG pré-immunes correspondantes (PI).

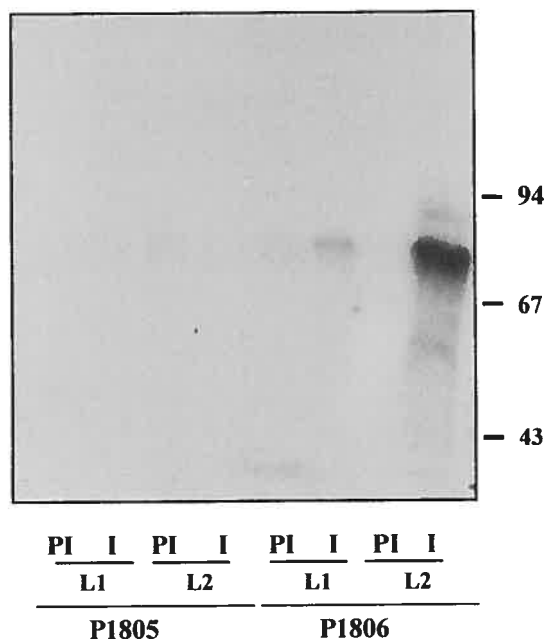


Figure 43. Activité kinasique en gel.

Les protéines des cellules PC-3 ont été immunoprécipitées avec les antisérums (I) des lapins 1 et 2 (L1 et L2) et leurs sérums pré-immuns (PI), soumises à une électrophorèse SDS-PAGE, renaturées en gel, testées pour leur activité kinasique à l'aide d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$, puis détectées par autoradiographie.

reconnaissent spécifiquement une kinase active et suggèrent que la réactivité de l'anticorps (peptide P1806) avec l'antigène (kinase) implique un épitope conformationnel reconnu dans la protéine native. L'antisérum du lapin 2 a donc été utilisé pour la suite des travaux et a été désigné sous le nom mark.

3.5.3. Spécificité de l'anticorps mark

Afin de confirmer la spécificité de l'anticorps mark envers la protéine c-tak1, nous avons opté pour une stratégie directe, i.e. *via* l'utilisation de la protéine recombinante c-tak1 elle-même. À cette fin, l'ADNc *c-tak1*, portant une étiquette myc-His en C-terminal a été transfecté dans les cellules 293. L'immunobuvardage des protéines avec un anticorps anti-myc révèle une seule protéine migrant au PM de 80 kDa (figure 44A, partie A, piste 2), confirmant donc que l'ADNc code bien pour c-tak1. Par ailleurs, l'anticorps anti-myc ne détecte aucune protéine dans les cellules transfectées avec le vecteur vide (figure 44A, piste 1). L'immunoprécipitation des protéines avec les anticorps anti-myc, suivie de l'essai d'activité kinasique en gel, montre aussi que la protéine détectée est une kinase active de 80 kDa (figure 44B, piste 4). De plus, les anticorps anti-myc détectent une protéine de 80 kDa qui est spécifiquement immunoprécipitée avec l'anticorps mark (figure 44A, piste 6). Par ailleurs, aucune protéine n'est décelée par les anticorps anti-myc lors de l'immunoprécipitation avec le sérum pré-immun (figure 44A, piste 5). De plus, soulignons que l'activité kinasique de la protéine c-tak1 endogène dans les cellules 293 parentales ou transfectées avec le vecteur vide est très faible lorsqu'elle est comparée à l'activité décelée dans les cellules surexprimant la protéine recombinante (figure 44B, piste 4 vs piste 2). Les

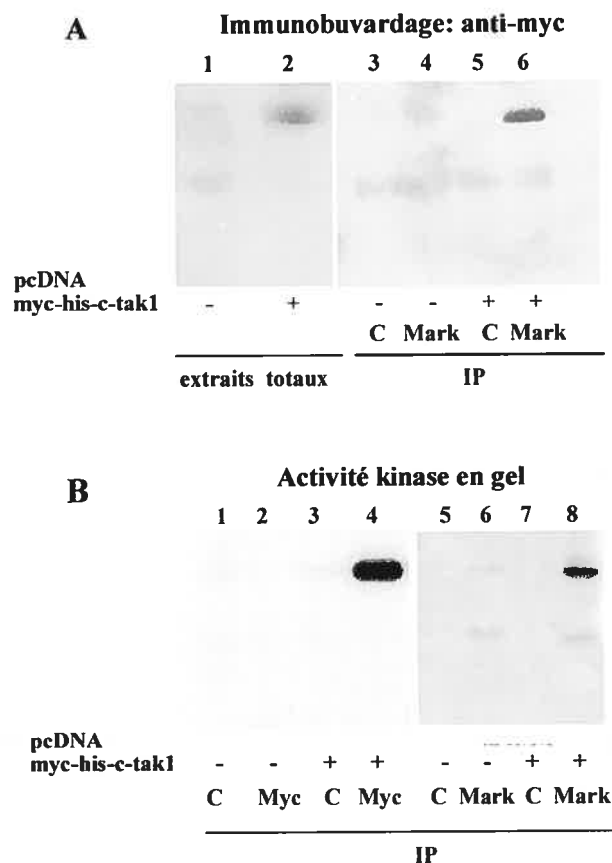


Figure 44. Spécificité de l'anticorps anti-mark.

La protéine recombinante myc-His-c-tak1 est immunoprécipitée avec le sérum anti-mark, soumise à l'électrophorèse, et soit transférée sur membrane pour l'immunodétection ou testée pour son activité kinasique en gel. A) Les cellules 293 sont transfectées de façon transitoire avec le vecteur vide (pistes 1, 3 et 4) ou le vecteur pcDNAMyc-His-c-tak1 (pistes 2, 5 et 6). Après l'immunoprécipitation avec l'antisérum mark (pistes 4, 6) ou le sérum contrôle pré-immun (pistes 3, 5), l'immunodétection est effectuée avec un anticorps monoclonal anti-myc. Des extraits totaux des cellules transfectées avec la protéine c-tak1 (piste 2) ou avec le vecteur vide (piste 1) sont aussi immunodéfectés avec l'anti-myc. B) Les extraits de cellules transfectées avec le vecteur vide (pistes 1 et 2) ou le pcDNAMyc-His-c-tak1 (pistes 3 et 4) sont immunoprécipités avec l'anticorps anti-myc (pistes 2, 4) ou les IgG contrôles de souris (pistes 1, 3) et analysés par l'essai d'activité kinasique en gel. La même expérience est répétée pour les pistes 5 à 8 avec l'immunoprécipitation des protéines avec l'antisérum mark.

résultats obtenus indiquent que la protéine recombinante codée par l'ADNc *c-tak1* est une kinase active immunoprécipitée avec l'antisérum anti-mark produit à partir du peptide de 20 acides aminés dans la portion N-terminale de la protéine.

3.6. Activité de c-tak1 dans les cellules prostatiques

L'immunoprécipitation des protéines avec l'anticorps anti-mark suivie de l'analyse de l'activité kinasique en gel a donc été utilisée comme stratégie pour vérifier si la protéine *c-tak1* est active dans nos modèles prostatiques.

3.6.1. Activation de c-tak1 dans les cellules prostatiques normales et cancéreuses

Selon les résultats précédents de RT-PCR et les niveaux de transcrits (figure 35), *c-tak1* serait la principale kinase parmi les membres de cette sous-famille des mark exprimée dans les lignées de CaP humaines et canines ainsi que dans les cellules primaires normales de chien. Dans un premier temps, nous avons comparé l'activité basale de *c-tak1* dans les cellules PC-3 et LNCaP reflétant des stades différents du CaP humain. L'autoradiogramme de la figure 45 (piste 2) révèle d'abord que l'antisérum mark immunoprécipite une protéine de 80 kDa parmi les nombreuses kinases actives détectées par l'essai d'activité en gel sur des extraits protéiques totaux de cellules PC-3 (figure 45, piste 1). Cette kinase active est spécifique puisqu'aucune bande n'est immunoprécipitée avec une quantité équivalente de protéines de sérum immun (vérifiée au bleu de Coomassie). L'essai kinasique montre qu'il y a une différence significative entre les niveaux de l'activité de la kinase, le plus haut niveau étant atteint par les cellules PC-3 suivi des LNCaP>CEC en culture (à partir

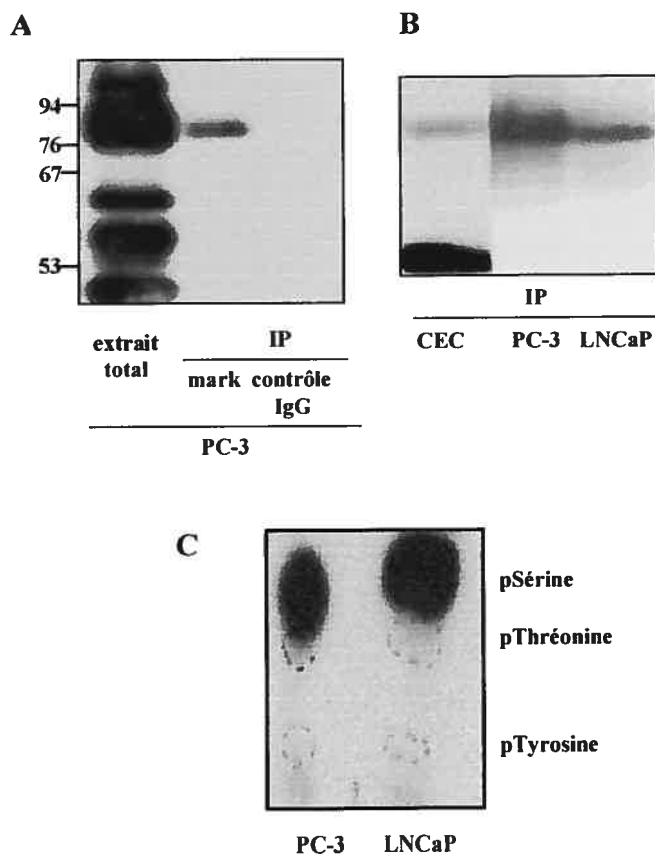


Figure 45. Activité kinasique mark dans les cellules épithéliales prostatiques.

A) Les extraits protéiques des cellules PC-3 ont été immunoprécipités avec l'antisérum mark (piste 2) et les IgG contrôle de lapin (piste 3). Ces immunoprécipités ainsi que des extraits totaux (piste 1) ont été analysés pour leur activité kinasique en gel. B) Des extraits de cellules prostatiques de chien cultivées pendant trois jours (CEC) (piste 1) et de cellules PC-3 et LNCaP (piste 2, 3) sont immunoprécipités et testés pour leur activité kinasique. Les différences d'activité obtenues entre les cellules sont significatives, *Student t test two-tailed*, PC-3 vs CEC, $P < 0,001$; PC-3 vs LNCaP, $P < 0,02$ et LNCaP vs CEC, $P < 0,01$; $n=5$ C) Analyse des acides aminés phosphorylés de la bande de 80 kDa après hydrolyse acide, purification, et séparation par électrophorèse sur couche de cellulose. Ceci révèle la présence de la phosphorylation des résidus sérine et quelques traces de résidus thréonine. La position des marqueurs internes pSérine, pTyrosine et pThréonine est indiquée.

desquelles c-tak1 a été clonée): PC-3 vs CEC, 16 fois, $P < 0,001$; PC-3 vs LNCaP, 2 fois, $P < 0,02$; LNCaP vs CEC, 8,3 fois, $P < 0,01$. Les différences de niveaux d'activité demeurent lorsqu'ils sont exprimés en fonction d'un nombre égal de cellules. Ces résultats suggèrent une relation entre cette kinase, les cellules prostatiques et le CaP.

3.6.2. Confirmation du type de kinase

L'analyse des acides aminés phosphorylés de la bande de 80 kDa immunoprécipitée avec l'antisérum mark est effectuée après l'extraction de la bande, suivie de l'hydrolyse et de l'électrophorèse sur couche mince. L'autoradiographie révèle les positions des acides aminés phosphorylés par comparaison à celles des résidus phosphotyrosine, phosphothréonine et phosphosérine ajoutés lors de l'électrophorèse et préalablement révélés à la ninydrine. Ainsi, tel que montré à partir de la protéine extraite des gels, la phosphorylation touche majoritairement les résidus sérine (figure 45C) avec quelques traces de phosphorylation sur les résidus thréonine et aucune sur tyrosine. Ceci confirme que la kinase exprimée et active dans les cellules prostatiques est bien une S/TK, concordant donc avec l'activité des kinases mark précédemment décrite (Espinosa and Navarro, 1998).

Les sections précédentes ont montré que l'expression de cette kinase est non détectable par les anticorps mark. Toutefois, l'activité peut être mesurée, elle sera donc étudiée après immunoprécipitation des protéines avec l'anticorps suivie de la détermination de l'activité kinasique en gel. Une limitation de ces essais réside dans le contrôle de l'immunoprécipitation des protéines. Pour minimiser ce facteur, nous avons eu recours à la coloration des protéines immunoprécipitées au bleu de Coomassie comme standard de contrôle de la quantité de protéines. Ainsi lorsque les activités c-tak1 des cellules sont

comparées et à moins d'indications contraires, les résultats montrés ont été validés par la présence d'une coloration constante des immunoprécipités (non montrée afin d'alléger les figures).

3.7. Régulation de c-tak1

Étant donné que: 1-les cellules PC-3, LNCaP et les cellules prostatiques primaires de chien n'expriment que le transcrite de c-tak1 parmi les membres c-tak75a et p78 et que 2-l'immunoprécipitation des protéines des cellules prostatiques et des protéines recombinantes avec l'antisérum mark génère une même bande à 80 kDa avec une activité phosphosérine et phosphothréonine, le lien possible de l'activité de c-tak1 selon les phénotypes cellulaires et le CaP chez l'humain de même que la régulation directe de l'activité par des agents connus pour stimuler les fonctions des cellules seront étudiés. L'activité de c-tak1 sera d'abord analysée dans le modèle de cellules prostatiques normales canines *in vivo* et *in vitro*, suivi des modèles prostatiques humains. La relation directe des effets des neuropeptides, de l'interleukine 6 et du TGF β sur l'activité de c-tak1 sera évaluée *in vitro*. La recherche de partenaires de c-tak1 en relation avec son appartenance avec la famille des Mark sera investiguée, dont la formation de complexes c-tak1-MAP4, c-tak1-tubuline ainsi que l'association de c-tak1 avec la phosphatase Cdc25C qui est impliquée dans le cycle cellulaire. Finalement, l'effet de drogues chimiothérapeutiques reliées aux microtubules sur l'activité de c-tak1 sera étudié.

3.7.1 Association de l'activité de c-tak1 avec la prolifération des cellules prostatiques normales canines et le CaP chez le chien

La prostate normale chez le chien se compose des trois types cellulaires soit les cellules basales, les cellules sécrétrices/luminales, ainsi que les cellules NE. Tout comme la prostate des autres mammifères et l'humain, il y a une prédominance des cellules sécrétrices de l'épithélium en présence d'androgènes testiculaires. Il a été démontré (travaux du laboratoire ainsi que ceux de la littérature) que les manipulations hormonales changent le phénotype et les fonctions des cellules épithéliales prostatiques. Rappelons que l'administration d'œstrogènes chez le chien castré conduit à la métaplasie des cellules basales ainsi que l'augmentation du stroma fibromusculaire. L'apport des androgènes chez le chien castré favorise le renouvellement de l'épithélium différencié, i.e. composé de cellules sécrétrices/luminales. Nous avons donc mis à profit l'avantage de ce système pour vérifier si l'activité de c-tak1 peut être modulée chez ces animaux. L'histologie et la présence de marqueurs spécifiques visualisés par l'immunohistochimie ont confirmé l'identité des cellules renouvelées par l'apport des stéroïdes en accord avec les études antérieures (Landry et al., 1996) (figure 46).

3.7.1.1. Modulation de l'activité c-tak1 *in vivo*

L'activité de c-tak1 est mesurée au niveau des tissus prostatiques chez le chien intact ainsi que le chien castré recevant des androgènes ainsi que des œstrogènes. Après l'immunoprécipitation des protéines des fractions solubles (cytosoliques) et particulières (membranaires) avec l'anti-mark, l'activité de c-tak1 est obtenue par l'essai kinasique en gel. La figure 47 (pistes 1 à 4) montre qu'il n'y a aucune activité détectée dans le tissu

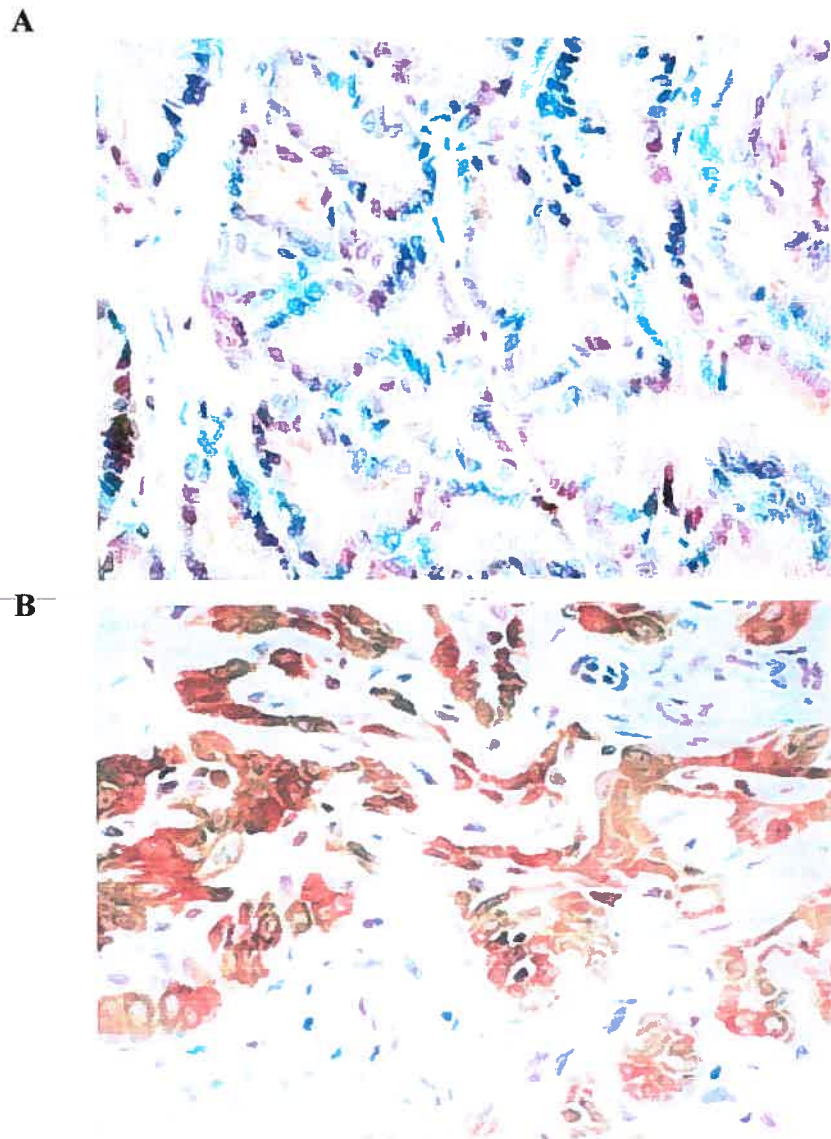


Figure 46. Immunohistochimie des prostatites de chien

A) La prostate de chien castré traité aux androgènes est caractérisée par la présence d'un épithélium renouvelé composé de cellules sécrétrices. Les cellules sont marquées avec un anticorps anti-arginine estérase. B) La prostate de chien métaplasique suite au traitement avec des œstrogènes après la castration est marquée à l'aide d'anticorps anti-cytokératines de haut poids moléculaire (spécifique aux cellules basales). Grossissement 40X.

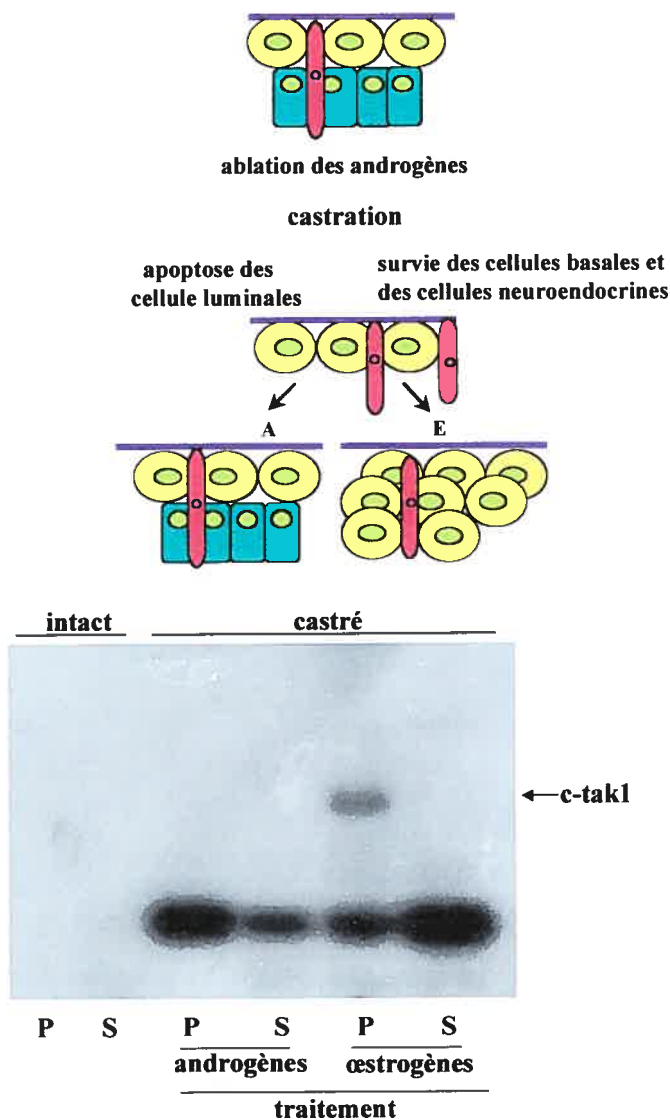


Figure 47. Modulation de l'activation de c-tak1 *in vivo*

Schématisme des changements histologiques de la prostate après la castration et le traitement avec des stéroïdes sexuels et activité de c-tak1 dans les tissus prostatiques de chiens intacts et castrés ayant reçu des androgènes et des œstrogènes. Les fractions particulaires (P) et solubles (S) ont été obtenues par centrifugation différentielle. Les protéines ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-mark et testées pour l'activité de c-tak1 par l'essai kinasique en gel.

prostatique de chien intact (prostate normale) ainsi que dans l'épithélium renouvelé de chien castré ayant reçu des androgènes et composé de cellules sécrétrices. Cependant, une activité élevée de c-tak1 (à 80 kDa; voir flèche) a été détectée dans la fraction particulière de la prostate métaplasique du chien castré traité avec des œstrogènes (figure 47, pistes 5 et 6). Ainsi, cette protéine est une enzyme dont l'activité peut être induite *in vivo* par l'apport des œstrogènes favorisant la métaplasie des cellules basales, ce qui dans le contexte de la prostate constitue une croissance indépendante des androgènes.

3.7.1.2. Modulation de l'activité c-tak1 *in vitro*

Etant donné l'expression de c-tak1 dans: 1-les cellules de chien au jour trois de la culture primaire; 2-la prostate métaplasique induite *in vivo* sous l'action des œstrogènes alors que 3-l'activité est absente dans la prostate normale et 4-l'épithélium différencié suite au traitement du chien castré aux androgènes, nous avons voulu déterminer d'une part, l'activité de c-tak1 dans les populations enrichies de cellules épithéliales obtenues lors de l'isolation des cellules prostatiques canines et d'autre part, vérifier l'effet des androgènes et les œstrogènes de même que les FC contenus dans le sérum de chien sur l'activité de c-tak1 de cellules primaires *in vitro*. Les résultats obtenus à la figure 48A montrent l'absence d'activité dans les préparations fraîchement isolées de cellules basales (B) et luminales (L) confirmant une fois de plus les résultats de la prostate normale. Par la suite, les cellules ont été cultivées en présence de stéroïdes dans du milieu enrichi ou non de sérum de chien et ce, pendant 4 jours. Nous observons que l'activité de la kinase n'est pas modulée par l'ajout des stéroïdes *in vitro*, en absence de sérum (figure 48B, pistes 2 et 3) ou en sa

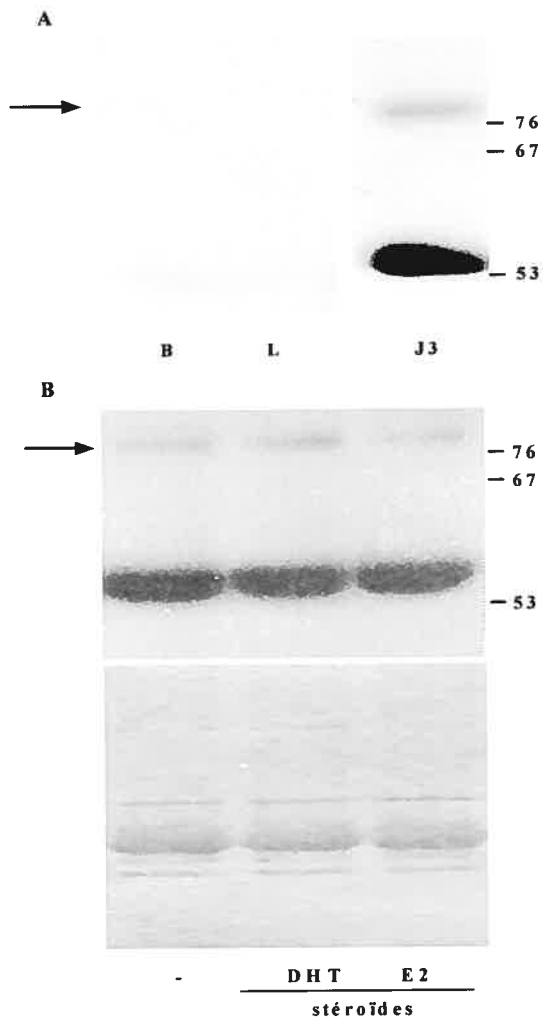


Figure 48. Modulation de c-tak1 dans les cellules de chien *in vitro* et ajout de stéroïdes sexuels

A) Les extraits protéiques des cellules épithéliales prostatiques canines, non sécrétrices B), et luminales/sécrétrices (L) isolées de gradient de Percoll et des cellules primaires (jour 3; même prostate) sont immunoprécipitées avec les anticorps anti-mark et l'activité de c-tak1 est analysée par l'essai kinasique en gel. B) Les cellules en culture primaire (jour 3) sont exposées aux androgènes (DHT) et aux œstrogènes (E2) pendant 4 jours en absence de sérum de chien. Les protéines sont analysées tel que décrit en A pour l'activité c-tak1. La partie inférieure de la partie B montre le contrôle de chargement des IgG *via* la coloration du gel au bleu de Coomassie. Les expériences ont été répétées trois fois.

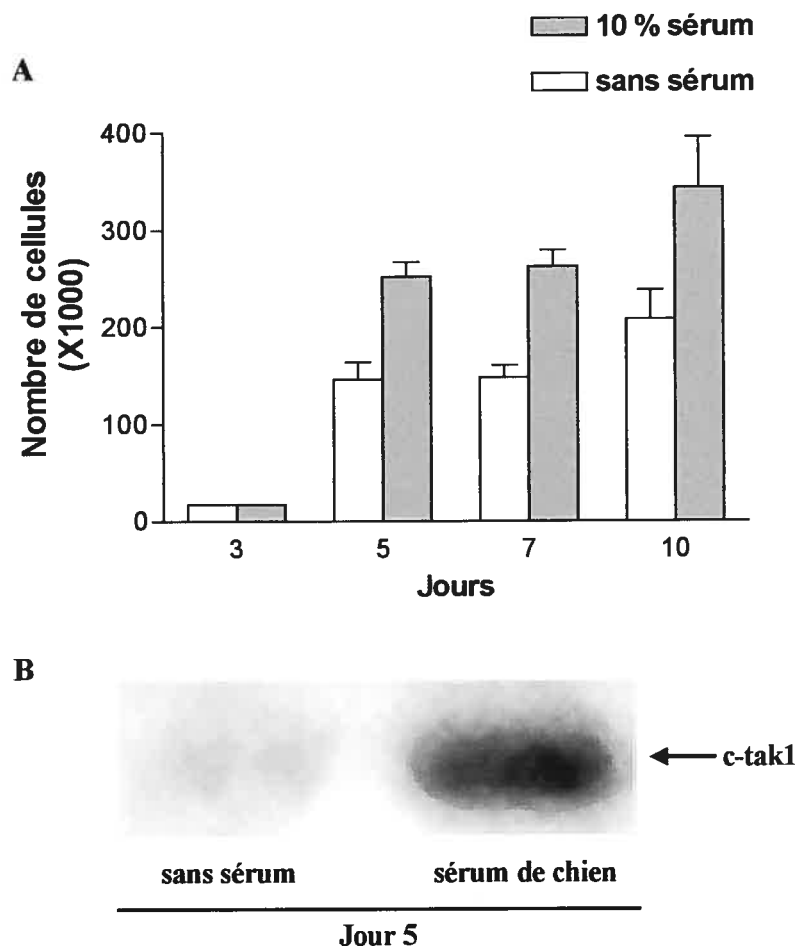


Figure 49. Stimulation de la prolifération des cellules avec le sérum de chien et activation de c-tak1

A) Les cellules prostatiques de chien en feuillets ont été incubées ou non avec du sérum de chien pendant les périodes de temps indiquées. Les valeurs du nombre de cellules obtenues représentent la moyenne \pm écart-type (EC) (*student t test two-tailed*, traité vs contrôle $P < 0,001$; $n=3$). B) L'activité de c-tak1 a été mesurée après l'immunoprécipitation des protéines avec l'anticorps anti-mark (même quantité de protéines) suivie de l'essai kinasique en gel d'extraits des cellules traitées pendant 2 jours ou non en présence de sérum comme sources de facteurs de croissance non stéroïdiens.

présence (non montrés). Par ailleurs, comme le sérum de chien est mitogénique pour ces cellules (Chevalier et al., 1991), nous avons stimulé ces cellules après leur adhésion avec et sans sérum de chien et avons mesuré leur activité c-tak1. La figure 49 démontre que le sérum de chien stimule la prolifération cellulaire ($P < 0,001$). Ceci est associé à une augmentation de l'activation de la kinase c-tak1, de l'ordre de 6,3 fois comparativement aux cellules sans sérum (figure 49B; étudiée après 48 h).

Afin de tester la relation entre c-tak1 et le CaP chez le chien, l'activité de c-tak1 a été mesurée dans la lignée DPC-1 représentant un modèle de CaP avancé chez le chien. La figure 50 montre une activité constitutive de c-tak1 dans ces cellules. Une activité kinasique supplémentaire a été décelée dans la région de 60-70 kDa mais n'a pas été investiguée jusqu'à maintenant. Les résultats de plusieurs expériences comparatives de l'activité c-tak1 entre cette lignée et les PC-3, montrent qu'il n'y a pas de différence d'activité statistiquement significatives

3.7.2. Association de la kinase c-tak1 et les pathologies prolifératives de la prostate humaine

L'activité c-tak1 a été analysée dans des tissus prostatiques humains normaux ($n=3$) ainsi qu'hyperplasiques ($n=2$) et cancéreux ($n=3$) provenant respectivement d'autopsies et de biopsies chirurgicales. La méthode utilisée est la même que précédemment, à savoir l'immunoprécipitation des protéines suivie de la détermination de l'activité kinasique en gel. L'autoradiogramme de la figure 51 montre l'analyse de ces spécimens. Aucune activité kinasique n'est détectée dans les immunoprécipités de tissus normaux et hyperplasiques,

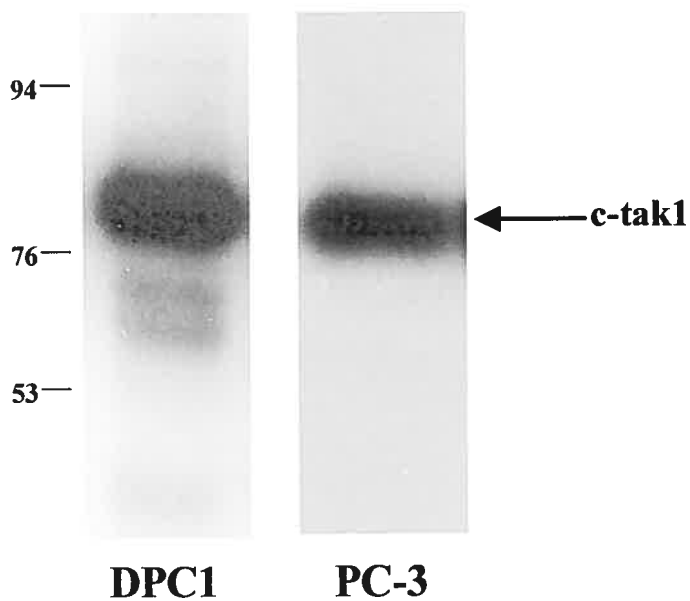


Figure 50. Activité de c-tak1 dans la lignée cancéreuse de prostate canine DPC1

Les extraits protéiques des cellules DPC1, cultivées dans du milieu complet (avec sérum, voir Méthodes), sont soumis à l'immunoprécipitation avec l'anticorps mark et à l'essai kinasique en gel, tel que décrit auparavant. La même procédure a été effectuée pour les cellules PC-3.

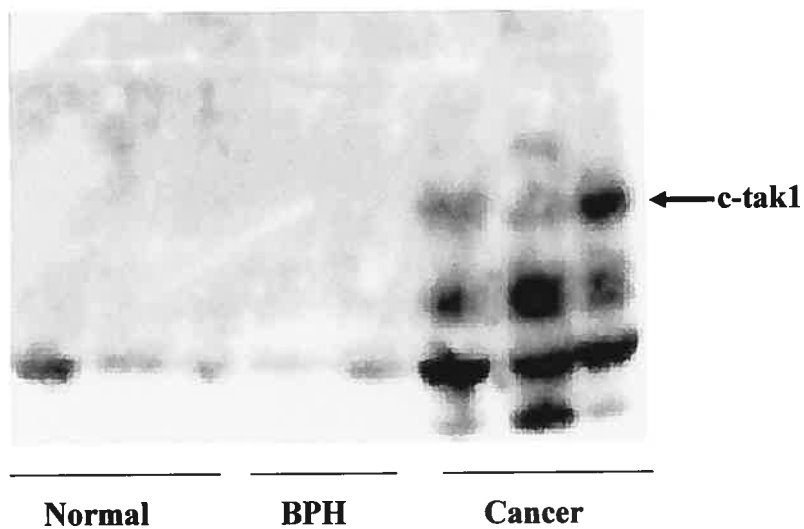


Figure 51. Activité de c-tak1 dans le CaP chez l'humain

Les extraits de tissus prostatiques humains ont été pré-incubés avec des billes de protéine G agarose et le mélange a été centrifugé. Les surnageants ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-mark et analysés par l'essai kinasique en gel.

contrairement à ceux issus des tissus cancéreux. Plusieurs kinases jusqu'à maintenant non identifiées co-immunoprécipitent avec l'enzyme c-tak1, ce qui est non observé dans les lignées de CaP humaines (ex: figures 43, 45B et 48).

Nous avons déjà mentionné que les lignées LNCaP et PC-3 représentent respectivement des modèles de cancer métastatiques de stades différents quant à leur degré de différenciation et sensibilité aux androgènes. De plus, des sous-lignées aux propriétés différentes ont été dérivées de ces lignées parentales (revoir le tableau 7). Nous avons testé leur niveau d'activité de c-tak1, incluant celle de la lignée androgéno-indépendante DU-145 qui constitue un phénotype agressif (tumorigénicité) intermédiaire entre les cellules LNCaP et PC-3. La figure 52 montre que toutes les lignées prostatiques métastatiques humaines présentent une kinase active immunoprécipitée avec l'anticorps c-tak1. La comparaison des activités indiquent que les cellules PC-3 expriment une plus forte activité comparativement aux cellules LNCaP (PC-3 vs LNCaP; 1,95 fois, $P < 0,01$). Quant aux sous-lignées PC-3M, PC-3 Pro4, PC-3LN4, elles possèdent une activité c-tak1 équivalente à la lignée parentale PC-3. De même, il n'y a aucune différence significative d'activité entre les sous-lignées C4 et C4-2 et la lignée LNCaP. Quant aux cellules DU-145, l'activité mesurée représente un niveau d'activité inférieure à celle des cellules LNCaP mais la différence n'est pas significative. L'ensemble de ces données montre qu'une kinase active de 80 kDa est détectée dans les immunoprécipités de tissus prostatiques cancéreux et des lignées humaines prostatiques cancéreuses alors qu'aucune activité n'est mesurée dans les tissus prostatiques humains normaux et hyperplasiques. Ceci suggère que l'expression de

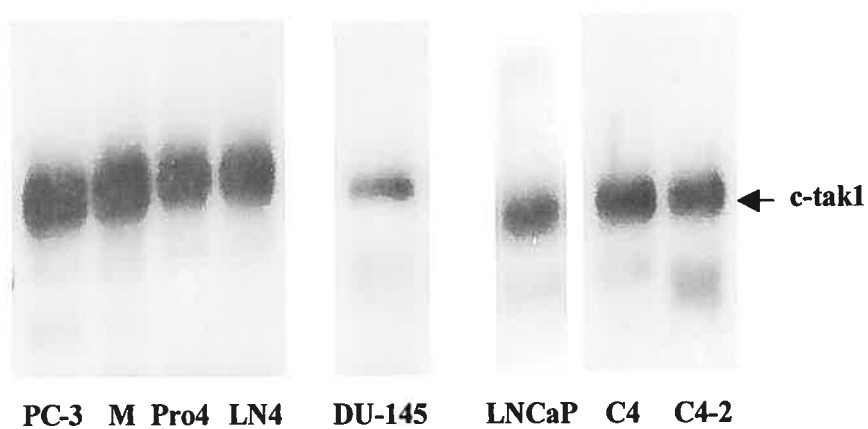


Figure 52. Activité c-tak1 dans les différentes sous-lignées de CaP humain

Les extraits protéiques des différentes lignées cellulaires ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-mark et analysés pour l'activité c-tak1 dans l'essai kinasique en gel. La différence d'activité de c-tak1 entre les cellules PC-3 et LNCaP est statistiquement significative telle que définie par le *Student t test two tailed*, PC-3 vs LNCaP, $P < 0,01$; $n=3$.

l'activité de la kinase mark chez l'humain est associée au CaP. Suite à ces résultats, nous avons voulu moduler le niveau d'activité de *c-tak1* en utilisant les cellules PC-3 représentant un CaP avancé et d'activité relative plus élevée que les autres lignées parentales et vérifier en parallèle l'effet sur le phénotype et la croissance cellulaire.

3.8. Surexpression de *c-tak1*

Notre première stratégie consiste à déterminer l'effet de la surexpression de *c-tak1* *via* le système inductible Tet-On qui permet d'obtenir des transfectants stables dont le niveau de l'expression du gène peut être finement régulé par la présence de concentrations variées de doxycycline. Le système Tet-On requiert deux transfections stables consécutives, la première permettant d'introduire un plasmide codant pour un gène de régulation Tet-On dans les cellules PC-3 et la deuxième consistant à intégrer le plasmide de réponse contenant le gène de *c-tak1*. Nous avons donc établi une lignée double stable Tet-On-*c-tak1*.

3.8.1. Contrôle de la capacité d'induction des lignées stables Tet-On

La première lignée stable Tet-On PC-3 a été d'abord établie *via* la transfection du plasmide de régulation pTet-On. Selon nos observations, les cellules commencent à mourir après 6 jours de culture dans le milieu de sélection contenant le G418. Après 1 mois de culture, des colonies sont apparues et ont été récupérées de façon isolée à l'aide des cylindres de clonage. Les clones ont été multipliés afin de tester leur potentiel d'induction en réponse à l'ajout de la doxycycline, vérifiée par un essai β -galactosidase suivant la transfection transitoire d'un plasmide (pBI-G) exprimant le gène rapporteur de la β -galactosidase. Les résultats des 21 clones testés sont résumés au tableau 12. Parmi ceux-ci, 13 ont montré une augmentation d'au moins 10 fois le niveau d'activité basale de la β -galactosidase en

Tableau 12. Liste partielle des analyses de l'induction des clones par l'essai de la β -galactosidase

Clone	sans doxycycline U/mg	avec doxycycline U/mg	induction fois
1	1,25	2,39	1,91
2	0,17	4,70	27,65
3	0,20	3,35	16,75
4	0,13	2,22	17,08
5	0,27	0,12	0,44
6	0,30	3,20	10,67
A1	0,79	12,41	15,71
A2	0,13	5,95	45,77
A3	0,57	9,11	15,98
A4	0,93	18,66	20,06
A5	0,67	5,72	8,54
A6	1,27	24,39	19,20
C4	0,92	21,27	23,12
CA3	2,32	2,12	0,91
CA5	2,13	1,51	0,71
C3	0,79	3,55	4,49
C6	0,42	34,89	83,07
C2	0,15	1,00	6,67
C11	0,76	5,04	6,63
F5	0,21	2,60	12,38
I1	0,29	3,67	12,65

présence de doxycycline. Chacun des clones positifs a été cultivé et utilisé pour générer des lignées de doubles transfectants stables contenant le plasmide de réponse pTRE-c-tak1 sous le contrôle de la doxycycline.

3.8.2. Expression de c-tak1 sous le contrôle de la doxycycline

L'introduction des vecteurs pTRE-c-tak1 et pTK-Hyg permettant la sélection des nouveaux clones *via* l'hygromycine a été réalisée afin d'établir les doubles stables ayant potentiellement une capacité d'expression élevée de la protéine c-tak1 induite par la doxycycline. Auparavant, l'ADNc de c-tak1 a été cloné dans le vecteur pTRE. La figure 53 montre la présence de l'insert de c-tak1 de 2,7 kb après la digestion du vecteur de réponse pTRE avec les enzymes de restriction appropriés.

Les clones obtenus après la transfection du plasmide de réponse sont ensuite testés en présence et en absence de doxycycline pour mesurer l'induction de l'activité kinase de c-tak1 en gel après immunoprécipitation avec l'anticorps mark. La figure 54 montre des essais kinasiques représentatifs de l'induction de l'activité de c-tak1 sous le contrôle de 1 $\mu\text{g/mL}$ de doxycycline. Nous avons observé des augmentations moyennes de 2 fois les niveaux d'activité de base de c-tak1 des cellules contrôles (sans doxycycline). Un total de 21 clones ont été sélectionnés et caractérisés pour leur phénotype et propriétés de prolifération. Aucun des clones analysés n'a montré de changements notables dans la morphologie et le profil de croissance en feuillet (résultats non montrés).

3.9. Études de l'activation directe de c-tak1 *in vitro*

3.9.1. Effets des neuropeptides

Les travaux de la littérature ainsi que ceux du laboratoire ont montré que les cellules PC-3 étaient sensibles à différents FC et neuropeptides, leur ajout se traduisant par l'activation de

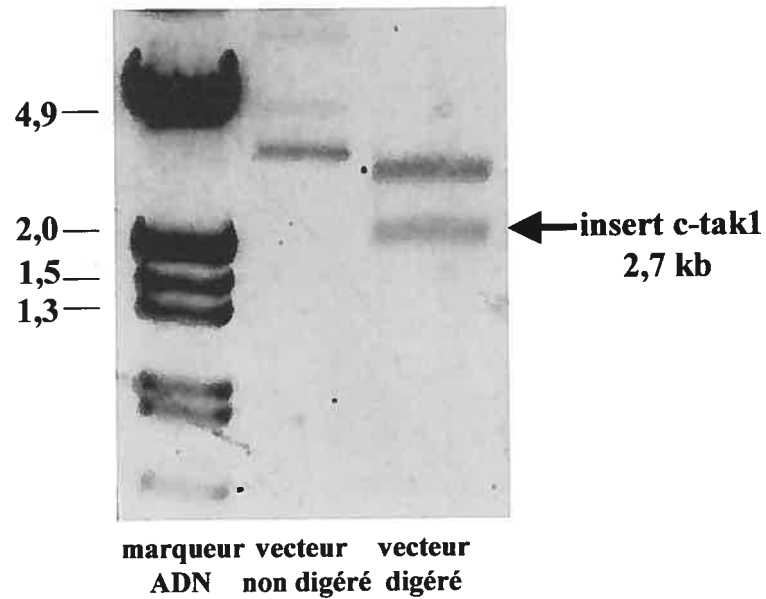


Figure 53. Clonage de c-tak1 dans le vecteur de réponse pTRE

L'ADNc de c-tak1 a été cloné dans le vecteur de réponse pTRE aux sites de restriction *SacII*. Après la ligation et la transformation dans les bactéries compétentes, les clones obtenus ont été vérifiés pour la présence de l'insert de c-tak1 après la digestion du plasmide avec l'enzyme de restriction *SacII* (piste 3). Le plasmide non digéré est représenté à la piste 2.

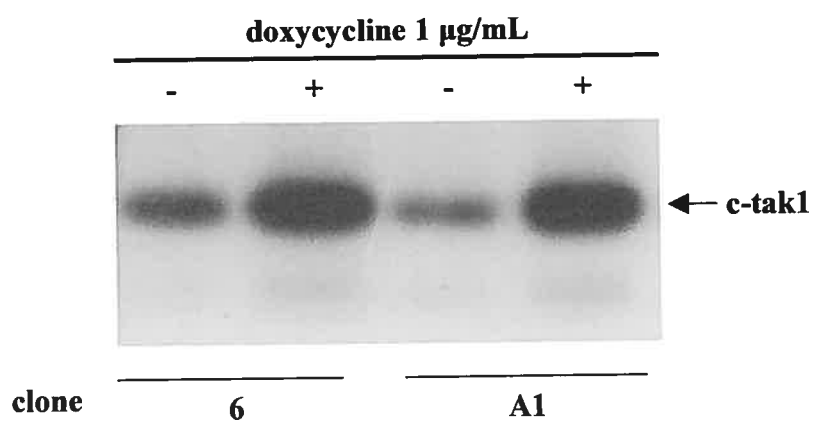


Figure 54. Contrôle de l'induction de l'activité c-tak1 par la doxycycline

Les clones PC-3 doubles transfectants Tet-On ont été exposés (+) ou non (-) à la doxycycline 1 $\mu\text{g/mL}$ pendant 48 h et testés pour l'induction de l'activité c-tak1 par l'essai kinasique en gel après l'immunoprécipitation des protéines avec l'anticorps anti-mark.

certaines tyrosine kinases. Les cellules NE dans la prostate sécrètent divers neuropeptides (Aprikian et al., 1993) dont l'action paracrine sur les cellules cancéreuses pourrait influencer la progression du CaP. Parmi ceux-ci, il a été montré que la bombésine à 10 nM activait rapidement (5-10 min) la kinase d'adhésion focale (FAK), résultant par la suite en une motilité accrue des cellules PC-3 (Aprikian et al., 1997). Des études sur d'autres produits tels que la calcitonine, la katalcine, ainsi que la substance P ont montré qu'ils activent aussi la phosphorylation sur tyrosine de FAK (Defoy, I; thèse de doctorat, 2002). Dans ce contexte, nous avons voulu vérifier si ces mêmes neuropeptides avaient un effet direct sur les cellules relié à la modulation de l'activation de c-tak1. La figure 55 représente un exemple de l'activité de c-tak1 des cellules PC-3 exposées à ces produits neuroendocriniens aux conditions (concentration de 10 nM pendant 10 min) d'activation de FAK, tel que confirmée par sa phosphorylation (résultats non montrés). La quantification des bandes de l'autoradiogramme a révélé que dans ces conditions d'essais, aucun des neuropeptides ne module de façon significative l'activité de c-tak1.

3.9.2. Modulation par l'interleukine 6

Des études récentes chez les patients ayant un CaP avancé ont montré qu'un taux sérique élevé de la cytokine IL-6 est associé à des valeurs anormales d'APS et la progression du CaP (Chung et al., 1999). Dans le laboratoire, il a été démontré que cette cytokine modulait la phosphorylation de la tyrosine kinase Fer des cellules PC-3 de façon biphasique soit avec des maximums d'activation à 10 et 30 minutes de traitement. L'effet est d'abord cytoplasmique puis nucléaire et conduit à la stimulation de la prolifération de ces cellules

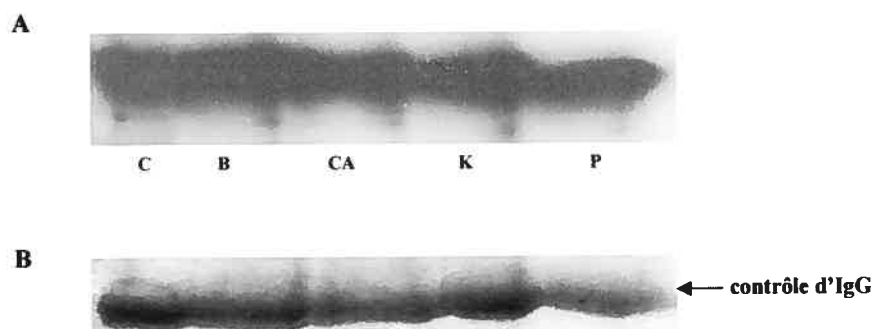


Figure 55. Modulation de l'activité de c-tak1 par les neuropeptides

Essai représentatif d'activité kinasique en gel de cellules PC-3 exposées aux neuropeptides. A) Les cellules PC-3 ont été traitées avec 10 nM de bombésine (B), calcitonine (CA), kalcine (K), et substance P (P) pendant 10 minutes. Les extraits protéiques ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-mark pour mesurer l'activité c-tak1 par l'essai kinasique en gel en comparaison des cellules non traitées contrôles (C). B) La quantité d'IgG déposée sur gel après immunoprécipitation est vérifiée par la coloration au bleu de Coomassie. Les variations ont été considérées pour l'analyse comparative des niveaux d'activité c-tak1.

(Zoubeidi et al., soumis). L'activation de la kinase c-tak1 par l'IL-6 a donc été vérifiée dans les mêmes conditions. Les résultats rapportés en fonction de la quantité de protéines immunoprécipitées chargées pour l'électrophorèse indiquent que dans ces conditions, l'activité kinase de c-tak1 n'est pas modulée par l'IL-6 (figure 56). Ceci suggère que les sentiers de signalisation de la kinase c-tak1 diffèrent de ceux impliqués dans la réponse induite par les neuropeptides et l'IL-6 ou que les conditions choisies de stimulation n'affectent pas l'activité enzymatique de cette kinase de la famille mark.

3.9.3. Modulation par le TGF β

Des travaux antérieurs effectués dans le laboratoire ont montré que le TGF- β 1 activait une protéine kinase p78 de type S/TK (Atfi et al., 1995) non identifiée dont les caractéristiques de migration dans les essais d'activité kinase en gel rappellent celles de c-tak1. Dans cette thèse, nous avons confirmé l'effet inhibiteur du TGF- β 1 sur la prolifération des lignées prostatiques humaines, dont celle des PC-3 (voir figure 22). Nous avons donc étudié l'effet du TGF- β 1 sur l'activation de la kinase mark. Dans un premier temps, les cellules ont été exposées à différentes concentrations (10-240 pM) de TGF- β 1 et l'activité de la kinase c-tak1 a été mesurée par l'essai d'activité kinasique en gel. La quantification des bandes dans la figure 57A montre une légère augmentation de l'activité mark (1,2 fois) en fonction de la dose, atteignant un maximum à 40 pM de TGF- β 1 et ce pour une stimulation rapide de 5 minutes. L'étude cinétique de stimulation de l'activité de c-tak1 par le TGF- β 1 à une dose de 40 pM (figure 57B) a montré que l'augmentation de l'activité est décelée dès 5 ou 10 minutes d'exposition. Une analyse de variance de type *Anova one way* indique que la

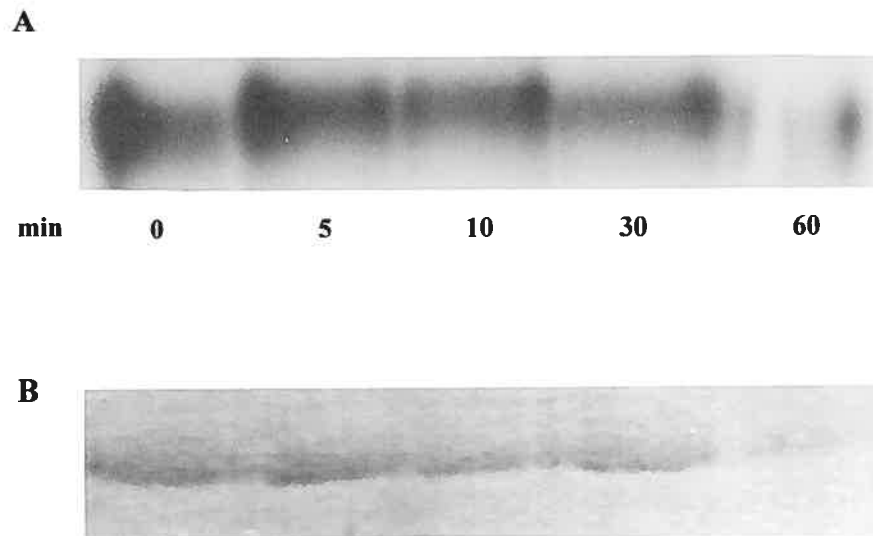


Figure 56. Modulation de l'activité de c-tak1 par l'IL-6.

A) Les extraits protéiques des cellules traitées pendant différents temps en présence de 100ng/mL d'IL-6 ont été immunoprécipités et analysés par l'essai kinasique en gel. B) La quantité d'IgG déposée sur gel après immunoprécipitation est vérifiée par la coloration au bleu de Coomassie.

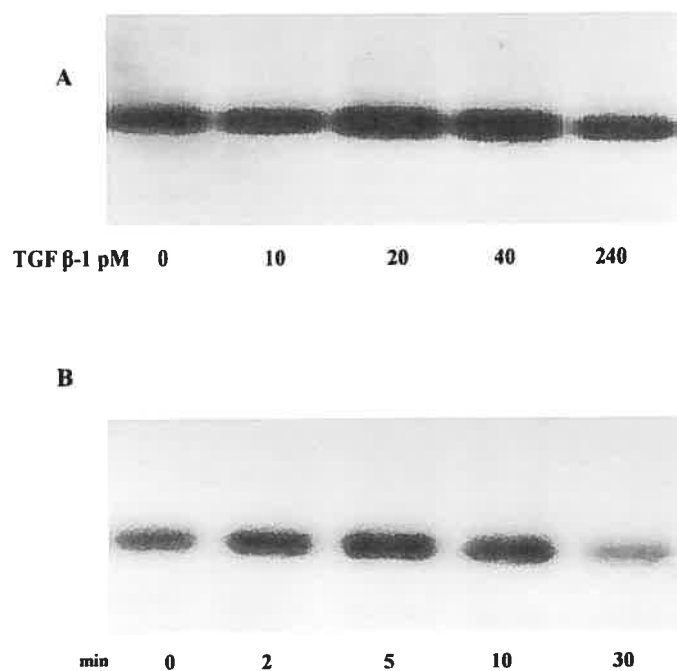


Figure 57. Effet du TGF- β 1 sur l'activité kinase des cellules PC-3

A) Les cellules PC-3 ont été traitées avec des doses croissantes de TGF- β 1 et analysées pour leur activité c-tak1 par un essai d'activité kinasique en gel. B) Les cellules sont stimulées avec 40 pM de TGF- β 1 pendant les temps indiqués et l'activité c-tak1 a été mesurée comme en A. La modulation est significative selon l'analyse de variance de type *Anova one way*, $P < 0,01$; $n=4$.

modulation de l'activité de c-tak1 est significative ($P < 0,01$, $n=4$). Cependant, nous avons observé au cours de ces expériences des variations importantes des effets du TGF- β 1 dont 3 expériences sur 7 dans lesquelles l'effet du TGF- β 1 n'est pas significatif, affaiblissant ainsi les résultats. Devant ces données, nous avons modifié notre approche et avons recherché des partenaires de signalisation.

3.10. Interactions de c-tak1 avec des molécules de signalisation

L'appartenance de c-tak1 à la famille des kinases marks dont les membres sont reliés aux microtubules, suggère que celle-ci puisse avoir des interactions directes avec les microtubules eux-mêmes ou leurs protéines associées. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a porté sur ces interactions. Nous avons abordé l'étude des complexes c-tak1-MAP4 et c-tak1-tubuline au moyen d'immunobuvardage et d'essai kinasique en gel. De plus et étant donné qu'il a été rapporté que c-tak1 phosphoryle la phosphatase Cdc25C dans un système surexprimant ces deux protéines, nous étudierons aussi l'association de c-tak1-Cdc25C dans les cellules PC-3.

3.10.1. Association c-tak1-MAP4

La protéine associée aux microtubules MAP4 est phosphorylée par les kinases de rat, Mark1 et Mark2, lorsqu'elles sont surexprimées dans les cellules CHO (Ebneht et al., 1999). De plus, l'expression soutenue, *via* un système inductible, de la kinase Mark2 provoque le détachement et la mort de ces cellules, en altérant l'intégrité des microtubules (Ebneht et al., 1999). Cependant, l'interaction directe entre ces kinases et MAP4 n'a pas été démontrée. Puisque c-tak1 représente un membre de la même famille que les kinases Mark

de rat et que jusqu'à maintenant, elle est la principale kinase de la sous-famille exprimée dans les cellules de CaP humain, nous avons testé une association possible entre c-tak1 et MAP4 dans les cellules PC-3. La figure 58 résume les résultats d'immunobuvardage obtenus à l'aide de l'anticorps commercial anti-MAP4. La piste 1 constitue un contrôle positif résultant de l'immunobuvardage de l'extrait protéique commercial de cellules HepG2. La bande attendue est de haut poids moléculaire et se situe dans la zone de 200-220 kDa. La piste suivante illustre l'expression de la protéine MAP4 dans les cellules PC-3. Étant donné l'intensité de la réactivité, une exposition plus brève de la membrane est montrée complètement à droite de la figure. Les résultats de co-immunoprécipitation ou d'interaction sont ensuite présentés. On note une interaction non spécifique de MAP4 avec les billes de protéines G, telle que vérifiée par l'incubation d'un extrait total de PC3 avec les billes de protéine G sépharose et montrée par la présence d'une bande dans la piste 3. Pour minimiser cet effet, les extraits protéiques ont d'abord été pré-incubés avec les billes de protéine G, puis récupérés par centrifugation, et immunoprécipités avec les IgG de sérum immun mark (piste 5) et des quantités équivalentes d'IgG de sérum de lapin pré-immun (piste 4). Pour chacun des essais, une bande dans la région de 200-220 kDa a été obtenue, signifiant une interaction non spécifique de c-tak1 et de la protéine MAP4. La contrepartie de l'expérience à savoir l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-MAP4, suivie de la détection de la kinase mark par l'essai kinasique en gel, n'a pu être réalisée puisque l'anticorps anti-MAP4 ne fonctionne qu'en immunobuvardage direct.

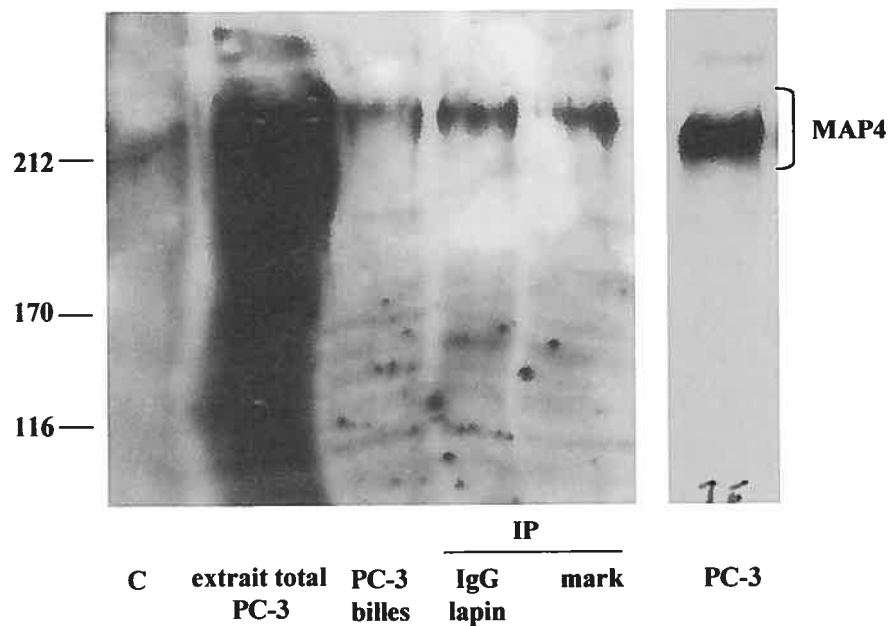


Figure 58. Recherche de complexes c-tak1-MAP4

Les extraits protéiques des cellules PC-3 ont été préalablement pré-incubés avec les billes de protéine G agarose. Le surnageant est récupéré pour obtenir les immunoprécipités avec les IgG contrôle de lapin (piste 4) et l'anti-mark (piste 5). Les contrôles positifs sont des extraits de cellules HepG2 (piste 1) et PC-3 (piste 2). L'adhésion non spécifique des protéines sur les billes de protéine G est vérifiée par leur incubation avec un extrait protéique de cellules PC-3, suivie de l'éluion dans le tampon de Laemmli. Les échantillons sont soumis à l'électrophorèse et l'association de c-tak1 avec MAP4 est vérifiée par immunobuvardage avec l'anticorps anti-MAP4. La membrane de gauche a été surexposée (1heure) et celle de droite résulte d'une exposition brève de 30 sec.

3.10.2. Association c-tak1-tubuline

La protéine MAP4 est une molécule qui, par son domaine de liaison aux microtubules contenant 3 ou 4 séquences répétitives, les stabilise (Nogales, 2000). De plus, il a été démontré que les protéines Smads, des effecteurs de signalisation du TGF β , étaient liées à la tubuline β (Dong et al., 2000). Étant donné l'appartenance de c-tak1 à la famille des Mark et sa régulation possible par le TGF β , nous avons déterminé si la kinase c-tak1 est directement reliée à la tubuline β . Les résultats sont illustrés à la figure 59. Une bande franche correspondant à la tubuline est détectée à la piste 1, issue de l'immunobuvardage d'un extrait total de cellules PC-3 avec l'anti-tubuline. Étant donné le PM très rapproché de la tubuline avec celui de la chaîne lourde des IgG de souris (55 kDa vs environ 50 kDa), la bande immunoprécipitée par l'anticorps monoclonal anti-tubuline apparaît probablement à l'intérieur de la large bande présentée dans la piste 3. L'immunoprécipitation des protéines avec l'anticorps anti-mark suivie de l'immunodétection avec l'anti-tubuline révèle l'absence d'une association. La figure 59A montre que dans les conditions testées, l'association de c-tak1 ne semble pas être directe avec la tubuline (piste 5). La présence des bandes floues dans les pistes 4 et 5 résulte possiblement d'une interaction non spécifique des IgG de souris avec la forte concentration d'IgG de lapins. Pour mieux étudier cette interaction possible de c-tak1 avec la tubuline, des essais d'activité en gel ont été effectués (figure 59B). Ainsi, des extraits protéiques de cellules PC-3 immunoprécipités avec les IgG contrôle de souris (A, piste 1), l'anti-tubuline (A, piste 2), les IgG contrôle de lapin (A,

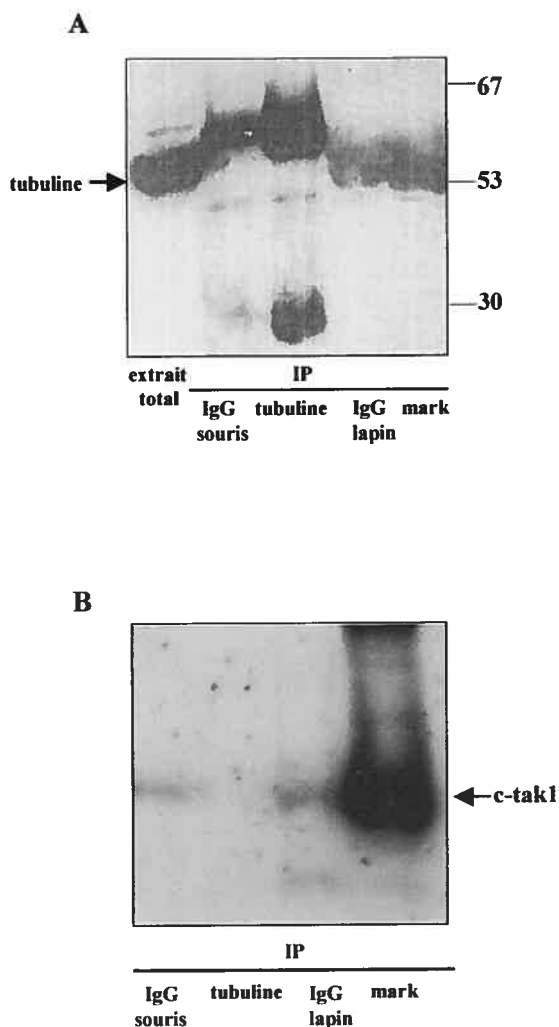


Figure 59. Recherche de complexes c-tak1-tubuline

A) Les extraits protéiques des cellules PC-3 ont été immunoprécipités avec les IgG contrôle de souris (piste 2), l'anti-tubuline (piste 3), les IgG contrôle de lapin (piste 4) et l'anti-mark (piste 5). La présence ou non de l'association de c-tak1 avec la tubuline est évaluée par immunodétection des immunoprécipités avec l'anti-tubuline. B) Les extraits protéiques des cellules PC-3 ont été immunoprécipités avec les IgG contrôle de souris (piste 1), l'anti-tubuline (piste 2), les IgG contrôle de lapin (piste 3) et l'anti-mark (piste 4). L'association de c-tak1 avec la tubuline est vérifiée par l'essai d'activité kinasique en gel. La flèche indique la position de c-tak1 sur le gel de renaturation.

piste 3) et l'anti-mark (A, piste 4) ont été testés pour leur activité kinasique. Tel que précédemment, l'association de c-tak1 avec la tubuline n'a pas été trouvée. Aucune bande spécifique n'apparaît lorsque les extraits sont immunoprécipités avec l'anti-tubuline (piste 2) en comparaison du contrôle positif de la technique (piste 4). Ce résultat va de pair avec celui de la figure 59A montrant l'absence de l'immunodétection de la tubuline dans l'immunoprécipité effectué avec l'anti-mark. Ces expériences démontre que la kinase c-tak1 ne forme pas de complexe avec la tubuline β .

3.10.3. Association c-tak1-Cdc25C

La phosphatase Cdc25C est impliquée dans la régulation de la transition de la cellule de la phase G2 en phase M. L'interaction physique entre c-tak1 et Cdc25C a été montrée dans les cellules COS lors de la surexpression des deux enzymes (Peng et al., 1998). Or, cette interaction n'a pas été définie dans des conditions d'expression endogène de ces deux protéines. Nous l'avons donc recherché dans les cellules PC-3. La figure 60A représente l'immunobuvardage d'un extrait total et d'immunoprécipités de cellules PC-3 avec l'anticorps anti-Cdc25C. La piste 1 montre clairement la présence de Cdc25C dans l'extrait total de cellules PC-3. La protéine Cdc25C est détectée dans l'immunoprécipité avec l'anticorps anti-mark suggérant une association avec la kinase mark (piste 3). L'absence de la protéine Cdc25C dans l'immunoprécipité avec les IgG contrôle de lapin (piste 2) indique que cette interaction est spécifique. De façon inverse, l'immunoprécipitation des protéines avec l'anticorps anti-Cdc25C, suivie de la détection de la kinase mark par renaturation sur

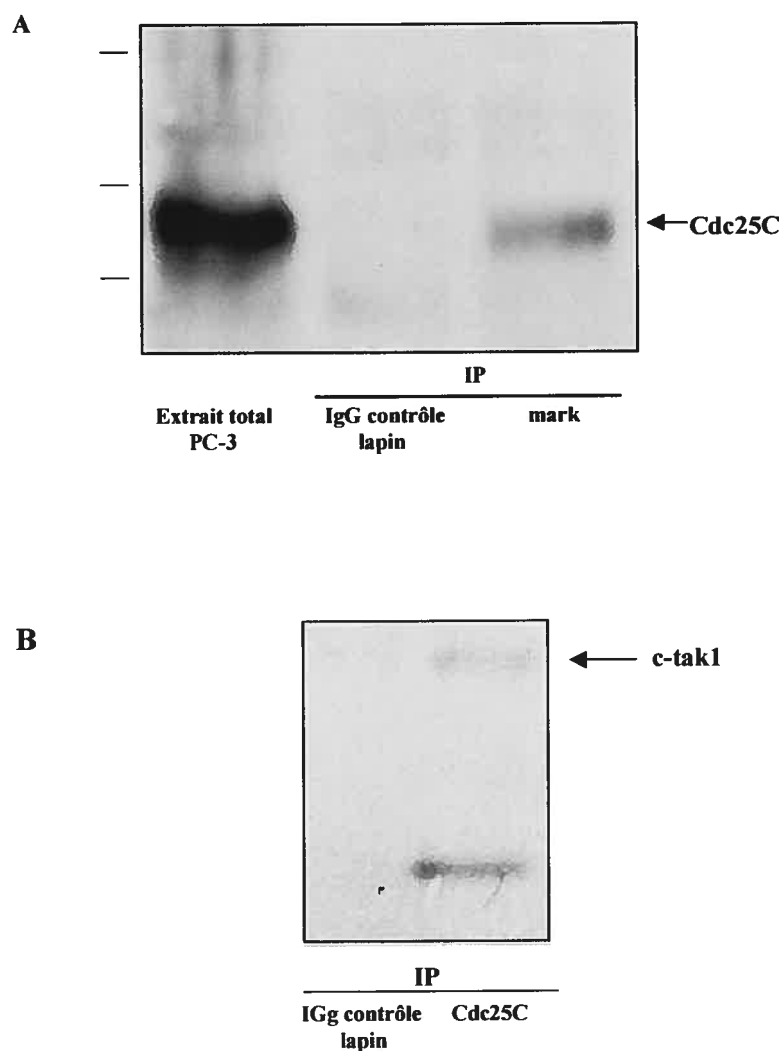


Figure 60. Association de c-tak1 avec Cdc25C

A) Les extraits protéiques de cellules PC-3 ont été pré-incubés avec les billes de protéines G. Le surnageant récupéré est immunoprécipité avec les IgG contrôle de lapin (piste 2) et l'anticorps anti-mark (piste 3). La recherche des complexes c-tak1-Cdc25C est effectuée par l'immunobuvardage avec l'anticorps anti-Cdc25C. B) Les extraits protéiques ont été traités comme en A. Les surnageants sont immunoprécipités avec les IgG contrôle de lapin (piste 1) et l'anticorps anti-Cdc25C (piste 2). L'essai d'activité kinasique en gel permet de détecter une protéine migrant au PM de c-tak1 ainsi qu'une seconde kinase de 30 kDa.

gel laisse voir une bande de faible activité (figure 60B, piste 2), absente de l'immunoprécipité obtenu avec les IgG contrôle de lapin (piste 1). Une autre kinase de faible PM (~30 kDa) jusqu'à maintenant non identifiée est aussi observée co-immunoprécipitée avec l'anticorps anti-Cdc25C et renaturée. Ainsi, dans un contexte d'expression physiologique, nous démontrons l'association de Cdc25C avec c-tak1.

3.11. Activité de c-tak1 et le cycle cellulaire

La présence de ce complexe ainsi que l'appartenance de c-tak1 à la famille des kinases Mark nous ont incité à vérifier la modulation possible de l'activité de c-tak1 en fonction des phases du cycle cellulaire. À cette fin, les cellules PC-3 ont été synchronisées en phase G2/M et en phase G1/S respectivement à l'aide du nocodazole et de l'aphidicoline ainsi que la mimosine (Merrill, 1998).

Les cellules PC-3 exposées aux différentes drogues ont été analysées pour leur contenu en ADN marqué à l'iodure de propidium ainsi que l'activité c-tak1. La figure 61A représente le profil du cycle cellulaire des cellules PC-3 contrôles, caractérisé par la présence équivalente des cellules en phase G2/M et S (21% chacune) et constituant donc 42 % de la population analysée où 58 % des cellules sont en phase G0-G1. Le traitement des cellules au nocodazole ne bloque que partiellement les cellules puisque 44 % des cellules sont alors en phase G2/M (figure 61B). Quant à la synchronisation induite par l'aphidicoline ou la mimosine, une moyenne de 66 % des cellules se situent en phase G1 (figure 61C), proportion qui est légèrement plus élevée que celle des cellules contrôles.

La comparaison de l'activité de c-tak1 en relation avec les phases G1/S et G2/M des cellules synchronisées et ce, en fonction des différentes phases du cycle des cellules contrôles asynchrones, montre l'absence de modulation de la kinase (panneaux de droite de chacune de la figure 61B, C, D).

3.12. Modulation par les drogues chimiothérapeutiques

C-tak1 est une kinase de la famille des Mark qui a par définition une affinité et un rôle dans la régulation des microtubules, bien qu'aucune interaction n'ait été décelée avec MAP4 et la tubuline dans les cellules PC-3. Par ailleurs, la formation d'un complexe c-tak1 avec la phosphatase Cdc25C associée au cycle cellulaire soulève la possibilité d'une implication de la kinase dans les mécanismes de régulation des microtubules au cours du cycle cellulaire. Les microtubules sont des cibles thérapeutiques de diverses drogues chimiothérapeutiques utilisées dans différentes formes de cancers dont le CaP. Or de telles drogues affectent l'intégrité des microtubules résultant en la perturbation du cycle cellulaire, l'objectif étant de provoquer la mort des cellules quoique certaines peuvent malgré tout survivre et y échapper. Les mécanismes d'action moléculaire des drogues sur l'intégrité des microtubules demeurent partiellement méconnus et diffèrent selon les types de cellules. Nous avons étudié les effets de drogues comme les taxanes et les alcaloïdes de Vinca (vinblastine, vincristine) sur l'activité de c-tak1 et déterminé d'abord leurs effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires humaines PC-3 et LNCaP.

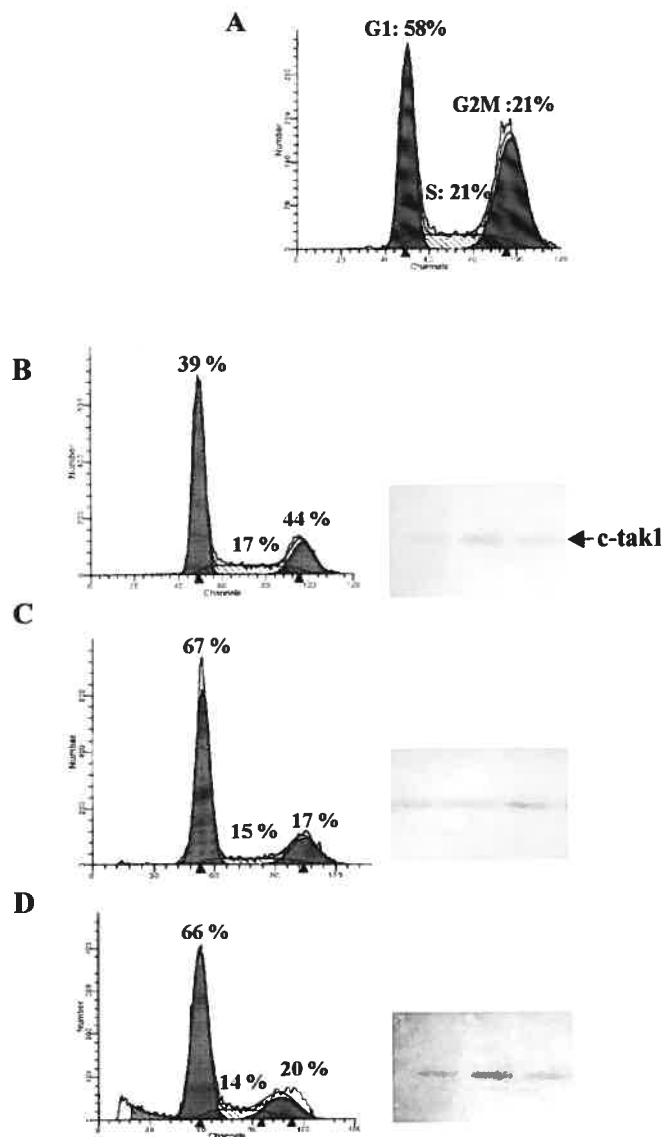
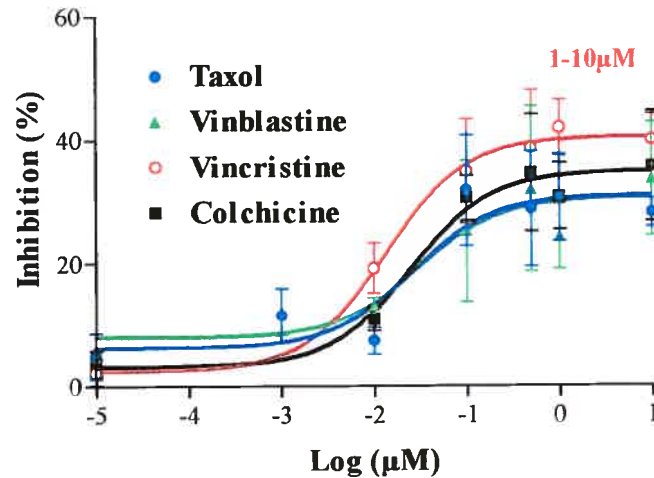


Figure 61. Activité de c-tak1 au cours du cycle cellulaire

Distribution des cellules PC-3 contrôles (A) et incubées avec (B) le nocodazole (C) l'aphidicoline et (D) la mimosine pendant 24h selon les phases du cycle cellulaire. Après le traitement, une fraction des cellules est trypsinisée et colorée avec l'iodure de propidium afin de mesurer leur distribution dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux à l'aide du logiciel ModFiLT. L'autre partie est utilisée pour l'analyse de l'activité de c-tak1 par l'essai kinasique en gel après l'immunoprécipitation des protéines avec l'anticorps anti-mark: (C) cellules non traitées et cellules traitées (analyse en duplicata).

3.12.1. Effet inhibiteur des drogues sur la prolifération cellulaire

Les cellules LNCaP et PC-3 ont été choisies respectivement comme modèles de CaP avancé, respectivement sensible et insensible aux androgènes et dont les sensibilités aux effets des drogues chimiothérapeutiques ou d'agents pharmacologiques diffèrent aussi. Les cellules LNCaP montrent généralement une sensibilité plus grande à l'inhibition de croissance par les drogues que les cellules PC-3 (Geldof et al., 1999; Blagosklonny et al., 2000; Gruber et al., 2001). Nous avons voulu confirmer l'efficacité du taxol, de la vincristine, de la vinblastine, ainsi que de la colchicine en mesurant la croissance cellulaire, en présence de sérum par le test MTT. La figure 62 montre les courbes d'inhibition de la croissance des cellules PC-3 en fonction des doses croissantes des 4 drogues. Nous observons que le taxol, la vinblastine, la vincristine et la colchicine génèrent le même profil d'inhibition, la concentration minimale pour obtenir un effet significatif étant de $0,01 \mu\text{M}$ chez les cellules PC-3. Les courbes d'inhibition se caractérisent par la présence d'un plateau pour les doses de $0,1 \mu\text{M}$ et $10 \mu\text{M}$ et ce, pour toutes les substances testées. Le maximum d'inhibition atteint 40%, suggérant donc que 60% des cellules PC-3 échappent à l'effet des drogues. La comparaison des courbes de croissance en fonction du temps (figure 62B) indique que l'effet observé est une inhibition et non pas une perte du nombre des cellules. Des expériences similaires ont été répétées en utilisant les cellules LNCaP et le



B

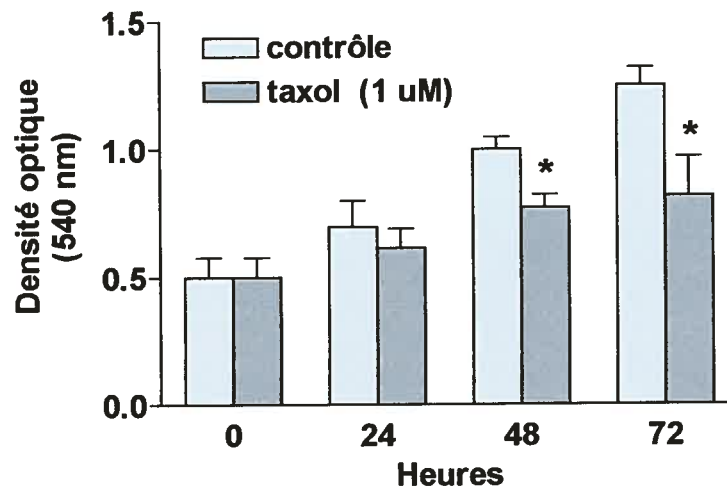


Figure 62. Effet inhibiteur des drogues chimiothérapeutiques sur la croissance des cellules PC-3.

(A) Inhibition de la croissance des cellules PC-3 traitées pendant 48 heures avec différentes concentrations des composés en présence de sérum. L'effet sur la croissance est mesuré par l'essai MTT. Des résultats similaires sont obtenus après 72 heures de traitement. (B) Les histogrammes montrent la croissance des cellules contrôles et traitées au Taxol (1 µM) en fonction du temps, tel que mesurée par le test MTT (* différence significative selon l'anayse de *Student t test two-tailed*, contrôle vs traité $P < 0,01$; $n=3$).

même profil de réponse que celui décrit pour les cellules PC-3 a été obtenu (figure 63). Les cellules LNCaP atteignent un maximum aux environs de 50% d'inhibition pour les drogues chimiothérapeutiques mais sont plus sensibles à leurs effets, tel que montré par la comparaison des IC_{50} au tableau 13. En effet, les cellules LNCaP sont en moyenne 2 fois plus sensibles que les cellules PC-3 à l'effet des drogues.

Tableau 13. Comparaison des IC_{50} des différentes drogues

<u>Drogue</u>	<u>LNCaP</u>	<u>PC-3</u>	<u>IC_{50} (nM)</u>
Taxol	$17,50 \pm 8,0$	$37,0 \pm 6,0$	($P < 0,05$)
Vinblastine	$44,37 \pm 6,6$	$77,1 \pm 7,0$	($P < 0,001$)
Vincristine	$9,50 \pm 0,3$	$16,3 \pm 2,6$	($P < 0,02$)
Colchicine	$17,92 \pm 8,4$	$42,3 \pm 8,7$	($P < 0,05$)

* Les valeurs de P (entre parenthèses) représentent l'analyse statistique de la différence obtenue entre les 2 lignées par le *Student t test two tailed*.

Par ordre d'efficacité d'inhibition, la vincristine est la plus efficace alors que la vinblastine est la moins puissante pour les deux lignées de cellules quoiqu'à des concentrations différentes. Le taxol et la colchicine se situent entre les deux et sont d'efficacité comparable à l'intérieur de chacune des lignées. Dans les cellules PC-3, les drogues ont des effets significativement différents entre elles (analyse de covariance, *Anova two-way*), $P < 0,01$; $n=3$) sauf entre le taxol et la colchicine. Par ailleurs dans les cellules LNCaP, seule la différence de niveau d'inhibition induit par la vinblastine est statistiquement significative de celui des autres drogues (analyse de covariance, *Anova two-way*), $P < 0,01$; $n=3$). Ces

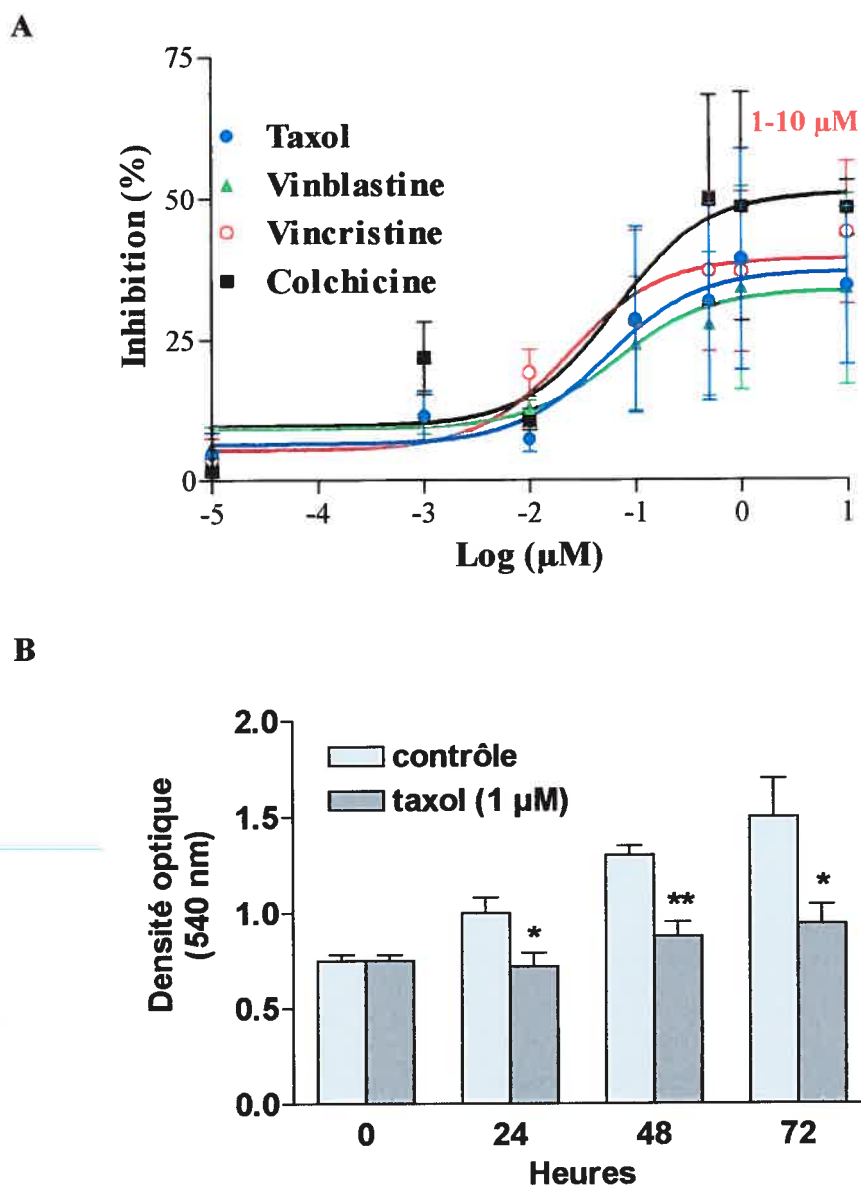


Figure 63. Effet inhibiteur des drogues chimiothérapeutiques sur la croissance des cellules LNCaP

A) Inhibition de la croissance des cellules LNCaP traitées pendant 48 heures avec différentes concentrations des composés en présence de sérum. L'effet sur la croissance est mesuré par l'essai MTT. Des résultats similaires sont obtenus après 72 heures de traitement. (B) Les histogrammes montrent la croissance des cellules contrôles et traitées au Taxol (1 µM) en fonction du temps, tel que mesurée par le test MTT. (analyse par le *Student t test two-tailed*, * $P < 0,02$; ** $P < 0,001$, $n=3$).

résultats sont en accord avec les données de la littérature et indiquent que les cellules sensibles aux androgènes ont aussi une plus grande sensibilité de réponse aux drogues (Blagosklonny et al., 2000; Mastbergen et al., 2000; Vadgama et al., 2000). L'inverse prévaut pour les cellules PC-3 qui reflètent un CaP métastatique plus avancé, aussi plus difficile à traiter, d'où la possibilité de mécanismes différents de régulation de leur croissance. De plus, dans les mêmes conditions de traitement, les drogues produisent différentes amplitudes ou degrés d'inhibition. Ceci implique des mécanismes d'action différents et possiblement des cibles moléculaires distinctes.

3.12.2. Effet sur le phénotype et l'induction de la mort cellulaire

Au cours de ces études sur les effets des drogues sur la croissance des cellules PC-3 et LNCaP, nous avons noté des altérations morphologiques progressives des cellules qui varient selon la durée du traitement et les doses de vinblastine, vincristine, colchicine et taxol. En fait, les observations des effets morphologiques sont relativement semblables entre elles. La figure 64B montre que l'exposition des cellules entraîne des effets négligeables aux concentrations de 0,001 μM et 0,01 μM , mis à part quelques cellules qui deviennent arrondies après 24 heures de traitement et se détachent. Par ailleurs, à des doses de 1 et 10 μM (figure 64C), les cellules présentent des noyaux multiples, des irrégularités du contour cytoplasmique, et ce progressivement en fonction du temps d'exposition. Les premières anomalies apparaissent dès 24 h de traitement. La principale caractéristique du traitement au taxol consiste en l'hypertrophie progressive, telle qu'observée dans les feuilletés après 48 h de traitement (voir le figure 64C et D) et l'endoréduplication des cellules.

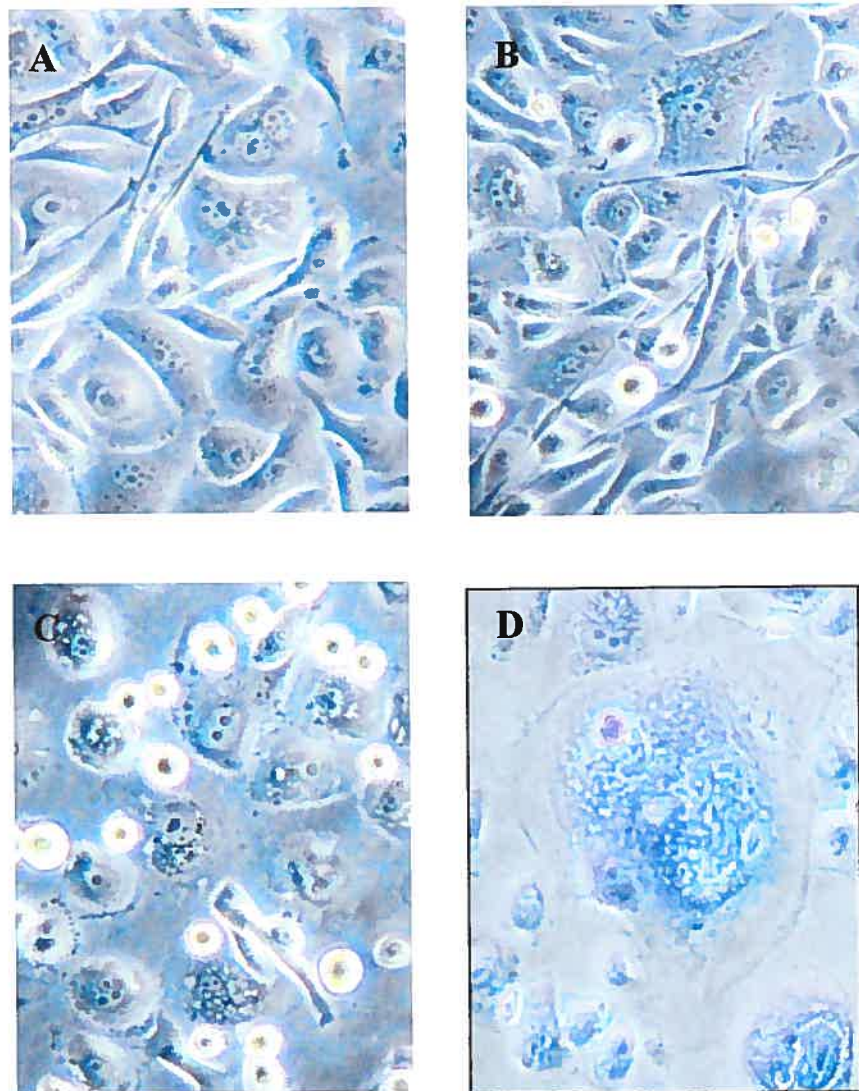


Figure 64. Effet du taxol sur la morphologie des cellules PC-3

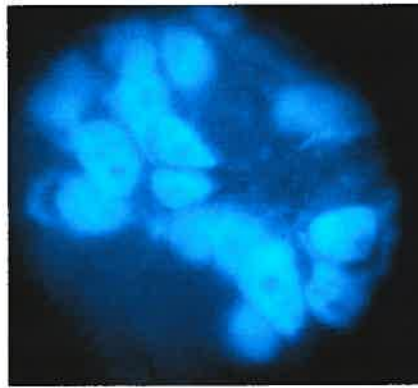
L'observation des cellules contrôles (A) et traitées avec du taxol à (B) 0,001 μM et (C-D) 10 μM montre l'apparition d'altérations morphologiques à une dose élevée. Les cellules sont observées en microscopie en contraste de phase. En D), les cellules ont été colorées au cristal violet. Grossissement X10 pour les photos A à D. La photo D a été agrandie à l'aide du logiciel Powerpoint.

3.12.2.1. Induction de la mort cellulaire

Le taxol, par son action sur les microtubules, altère leur dynamique et la formation des fuseaux mitotiques bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire. La phase M est alors perturbée et ceci peut provoquer la sortie prématurée des cellules de cette phase ou l'accumulation des cellules multinucléées (Abal et al., 2003). Rappelons que l'apoptose se caractérise par des modifications morphologiques, dont entre autres, le rétrécissement cellulaire, des bourgeonnements cytoplasmiques, la fragmentation de la chromatine, la dégradation de l'ADN alors que la membrane cytoplasmique demeure intacte. Ces altérations structurales s'accompagnent de changements biochimiques et fonctionnels à savoir, l'externalisation de la phosphatidylsérine, la perte du potentiel membranaire de la mitochondrie, la protéolyse des protéines, la dégradation de l'ADN, etc. Quant à la cellule nécrotique, elle se distingue de la cellule apoptotique par la perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, des noyaux, de l'absence de régulation du processus et d'activation des protéases, combinée au rôle inexistant de la mitochondrie (Nieminen, 2003). Afin d'apprécier la structure des noyaux, nous avons utilisé le réactif DAPI qui forme un complexe fluorescent avec l'ADN double brin. La figure 65 montre les noyaux intacts des cellules contrôles alors que les noyaux fragmentés des cellules traitées avec 10 μ M de taxol pendant 24 h sont des signes précurseurs évidents d'apoptose. Afin de faire la distinction entre les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques, nous avons utilisé le double marquage des cellules avec l'iodure de propidium et les anticorps anti-annexine-V. L'iodure de propidium est un marqueur de l'ADN et est utilisé comme colorant

A

218



B

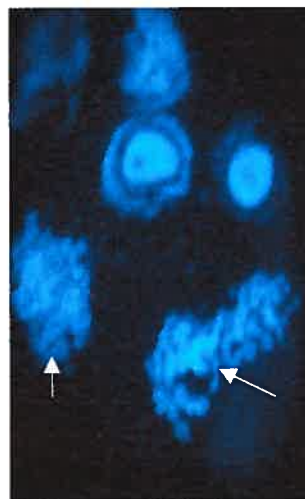


Figure 65. Effet du taxol sur la morphologie des noyaux

Les cellules PC-3 contrôles en (A) et traitées au taxol 10 μ M (B) pendant 24 h sont incubées en présence de DAPI. Les flèches indiquent des noyaux fragmentés.

d'exclusion. Les cellules nécrotiques n'ayant plus une membrane plasmique continue montrent alors une fluorescence pour l'iodure de propidium.

L'annexine-V est une protéine de liaison des phospholipides dépendante du Ca^{2+} qui possède une forte affinité pour la phosphatidylsérine. Ainsi, l'annexine-V couplée à la fluorescéine (FITC) est utilisée comme sonde pour détecter la présence de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire (Vermees et al., 1995). La cellule apoptotique présente exclusivement le marquage à l'annexine-V et donc une absence d'iodure de propidium.

La figure 66 montre les images obtenues lors de la détection de l'annexine-V et de l'iodure de propidium des cellules PC-3 contrôles non traitées (A et B) et les cellules traitées avec le taxol à une dose élevée, 10 μM (C et D). Le même champ au microscope a été visualisé dans le spectre de détection de la FITC (annexine-V) et de la phycoérythrine (iodure de propidium) et photographié. L'image A représente la détection de l'annexine-V pour les cellules contrôles et en B, celle de l'iodure de propidium. Dans les deux situations, quelques rares cellules ont capté le fluorochrome et l'iodure de propidium. L'image C met en relief la présence de cellules apoptotiques suite au traitement avec le taxol et sont marquées par l'annexine-V (flèches). L'image D présente des cellules traitées au taxol qui sont nécrotiques par leur incorporation de l'iodure de propidium et exprimant aussi la phosphatidylsérine à leur surface cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour les cellules traitées à la vincristine, vinblastine et la colchicine.

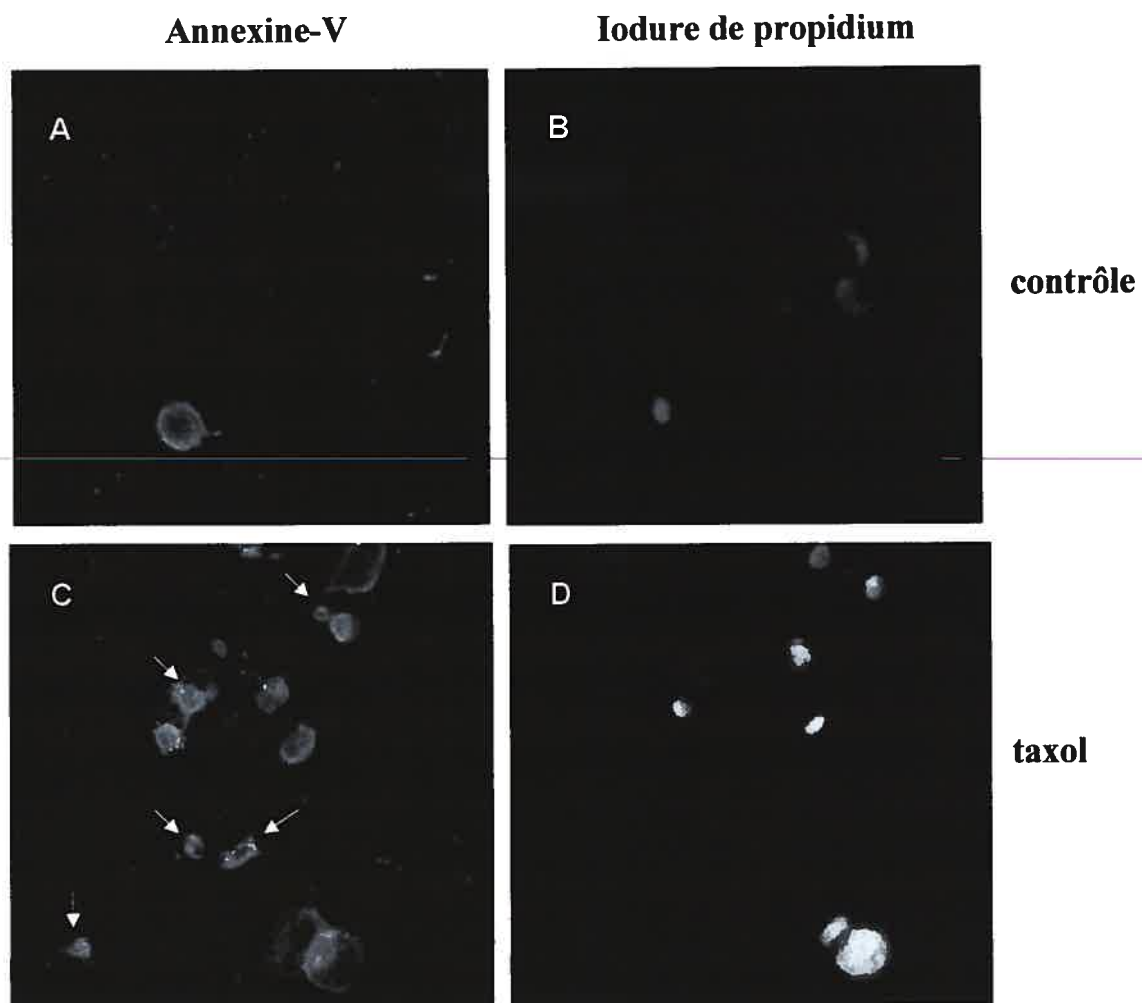


Figure 66. Induction de l'apoptose par le taxol

Les cellules contrôles (A, B) et traitées au taxol (C, D) pendant 24 h ont été co-incubées avec l'annexine-V-FLUOS et l'iodure de propidium afin de discriminer entre les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques. Les flèches indiquent les cellules en apoptose. Le même champ microscopique a été visualisé pour les deux marqueurs.

3.12.3. Effets des drogues sur l'activité de c-tak1

Nous avons déjà mentionné que dans le système de surexpression des cellules COS (Peng et al., 1998), c-tak1 phosphoryle Cdc25C et que cette phosphorylation facilite la liaison de Cdc25C avec la protéine 14-3-3. Le complexe Cdc25C/c-tak1 est alors présent dans les cellules en interphase et absent des cellules en mitose. Nous avons montré de tels complexes c-tak1-Cdc25C dans les cellules PC-3. Étant donné le rôle de la phosphatase Cdc25C dans le cycle cellulaire ainsi que l'effet des drogues chimiothérapeutiques sur le cycle cellulaire, nous avons vérifié l'effet du taxol, de la vinblastine, de la vincristine et de la colchicine sur l'activation de c-tak1 principalement dans les cellules PC-3. Les cellules ont été exposées à 10 μ M de chacune des drogues, correspondant à la dose maximum située dans la phase plateau des courbes de croissance de la précédente expérience, selon une courte (30 min) et une longue cinétique (1 et 24 h). Pour chaque condition, l'essai d'activité kinasique en gel a été répété en moyenne entre trois fois et sept fois, après l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-mark. L'activité de c-tak1 a aussi été testée avec des extraits protéiques de cellules obtenus suivant des temps d'exposition très courts (2, 5, et 10 min) et intermédiaire (480 min) à différentes doses (0,01; 0,05; et 1 μ M) des drogues. Les figures 67 et 68 montrent les autoradiogrammes représentatifs de ces expériences dans les cellules PC-3, selon l'ordre de l'activité inhibitrice des différents composés sur la croissance cellulaire (voir figure 62). Nous observons que la vincristine, la colchicine, et la vinblastine ont peu ou pas d'effets significatifs sur l'activation de c-tak1 autant pour des temps de cinétique rapide (30 min) ou s'étalant sur 24 h. Cependant, le

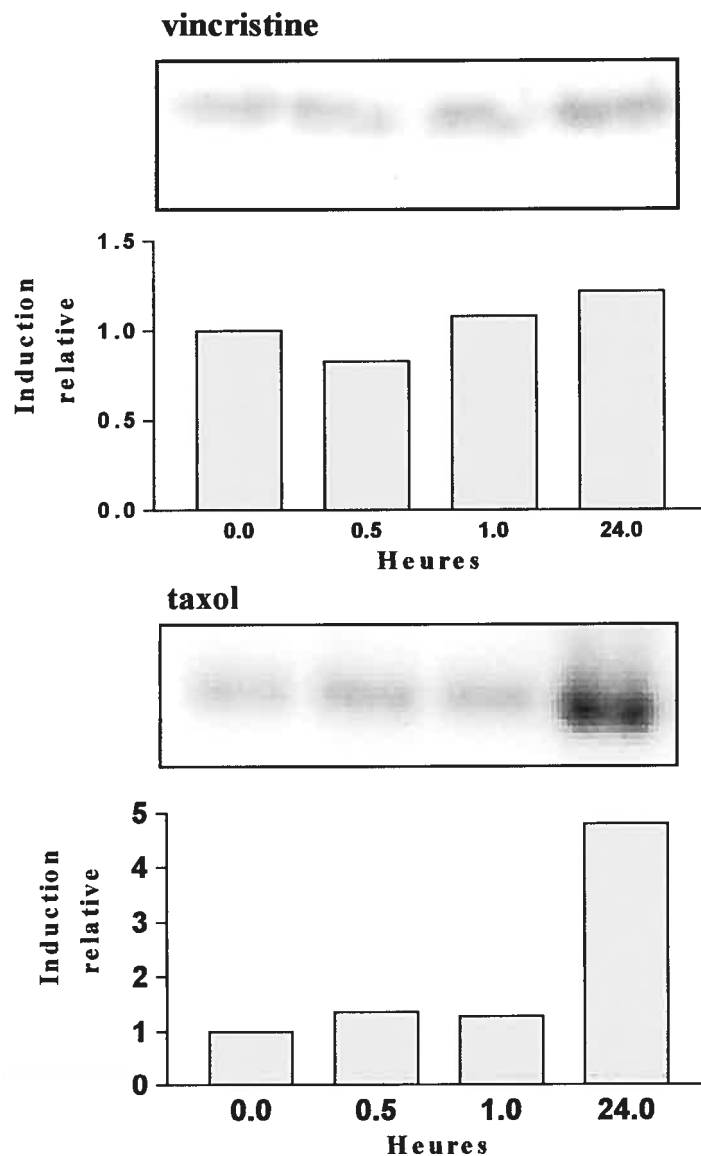


Figure 67. Effet représentatif de la vincristine et du taxol sur l'activation de c-tak1

Les cellules PC-3 ont été exposées à 10 μM des différentes drogues pendant de courtes et de longues périodes de temps. L'activité de c-tak1 est mesurée par l'essai kinasique en gel. L'histogramme représente l'augmentation de l'activité de c-tak1.

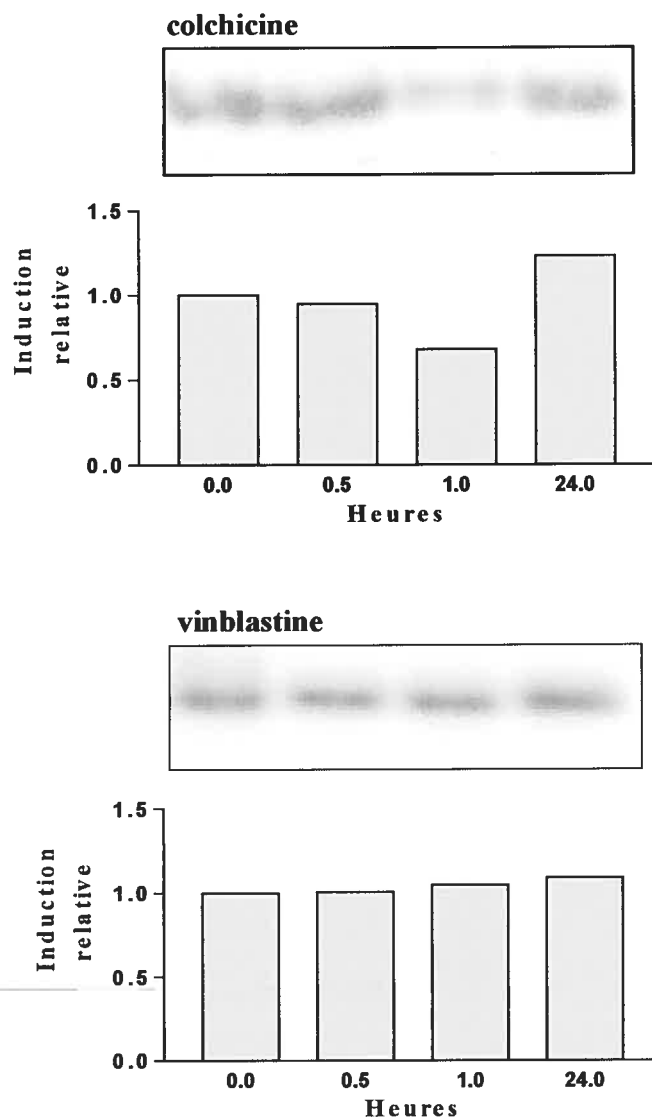


Figure 68. Effet représentatif de la colchicine et de la vinblastine sur l'activation de c-tak1

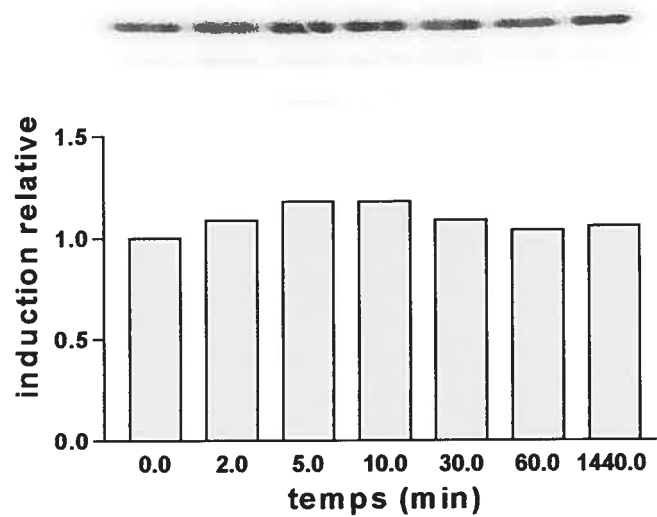
Les cellules PC-3 ont été exposées à 10 μ M des différentes drogues pendant de courtes et de longues périodes de temps. L'activité de c-tak1 est mesurée par l'essai kinasique en gel. L'histogramme représente l'augmentation de l'activité de c-tak1.

taxol (figure 67B) augmente jusqu'à 4,8 fois le niveau d'activité de c-tak1 suivant une longue période d'exposition de 24 h. Ces résultats montrent donc que l'activité de c-tak1 ne va pas de pair avec les effets d'inhibition des drogues sur la croissance cellulaire. Par ailleurs, comme c-tak1 est sensible au taxol, ceci représente possiblement une certaine spécificité d'action.

3.12.4. Effets des drogues sur les cellules normales prostatiques de chien

Selon nos résultats précédents, l'activité de c-tak1 est détectée dans les modèles de cellules prostatiques cancéreuses humaines et canines de même que les cellules normales de chien qui se divisent *in vitro* et *in vivo*. Nous avons montré que le taxol module l'activité de la kinase mark dans les cellules PC-3. Nous avons voulu déterminer si cette augmentation de l'activité de c-tak1 peut être reproduite au niveau des cellules normales.

A cette fin, les cellules prostatiques de chien en culture primaire en phase de prolifération ont été testées pour l'activation de c-tak1 sous l'effet des drogues chimiothérapeutiques en présence de sérum de chien. Celles-ci ont été utilisées à une concentration de 1 μM suivant des courtes et des plus longues périodes d'exposition. Les figures 69 et 70 montrent les autoradiogrammes représentatifs obtenus. Alors que la vinblastine et la vincristine n'affectent pas significativement le niveau d'activation de c-tak1, le taxol module légèrement l'activité enzymatique à la hausse (temps 30, 60 et 1440 min; 1,2 fois). Ces effets sont plus faibles que dans les cellules PC-3 par un facteur moyen de 10. De plus, la bande supplémentaire de 55 kDa observée précédemment, co-immunoprécipitée avec



vincristine

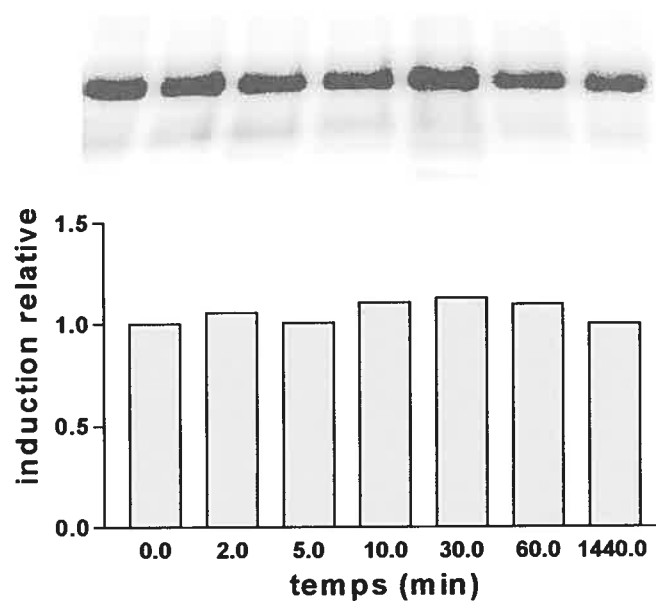


Figure 69. Effet représentatif des drogues associées aux microtubules sur l'activation de c-tak1 dans les cellules prostatiques de chien

Les cellules prostatiques de chien ont été exposées à 1 μ M de vinblastine et de vincristine en présence de sérum de chien. L'activité de c-tak1 est mesurée par l'essai kinasique en gel. L'histogramme représente l'augmentation de l'activité c-tak1 par rapport au contrôle, n=3.

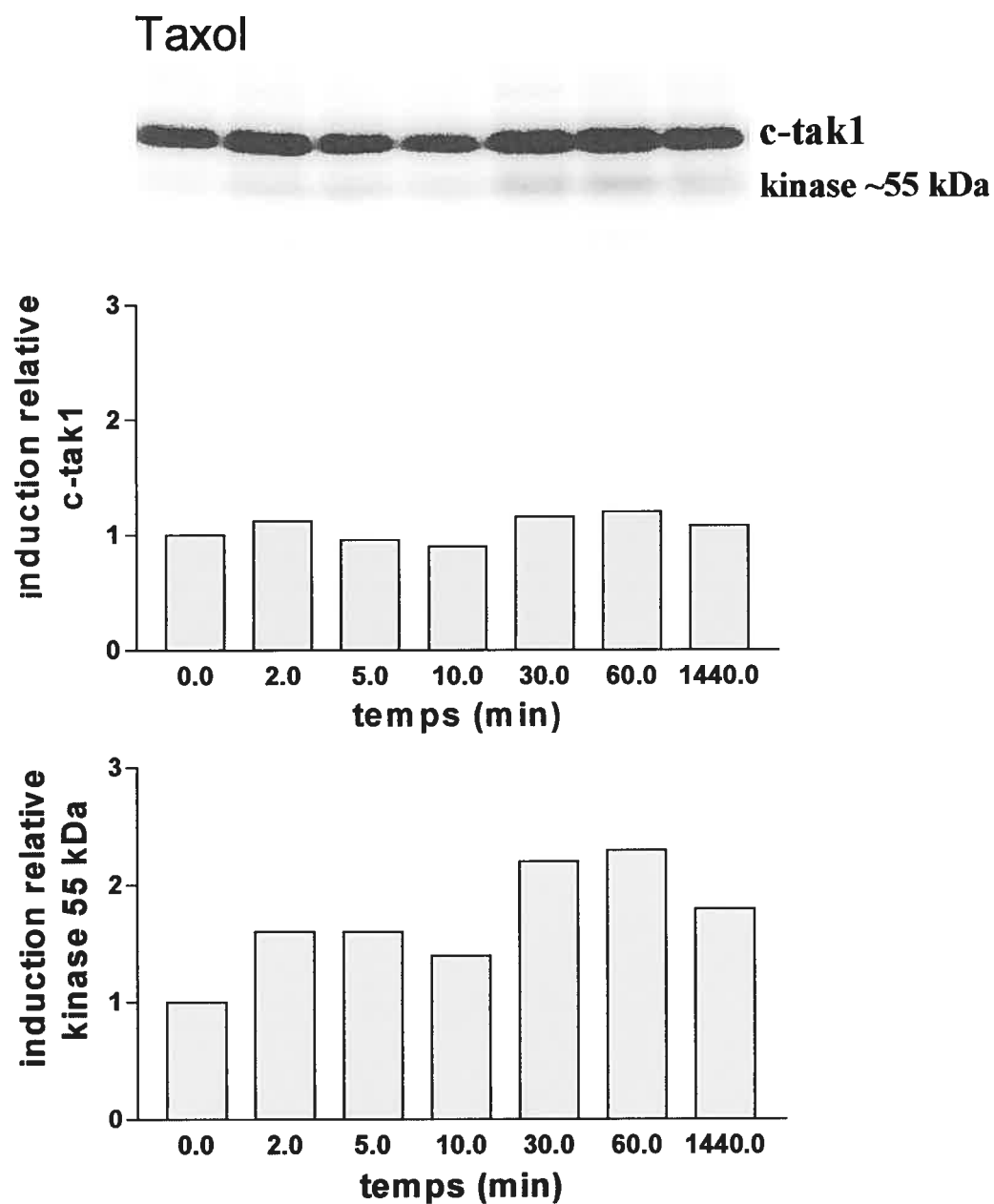


Figure 70. Effet du taxol sur l'activation de c-tak1 dans les cellules prostatiques de chien

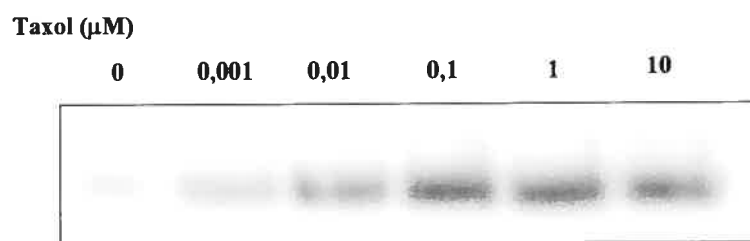
Les cellules prostatiques de chien ont été exposées à 1 μM de taxol. L'activité de c-tak1 est mesurée par l'essai kinasique en gel. L'histogramme représente l'augmentation de l'activité de c-tak1 et de la kinase de 55 kDa par rapport au contrôle, $n=3$.

c-tak1 dans ces cellules (voir la figure 70), serait affectée par le traitement au taxol. Ainsi, l'intensité de cette bande augmente de 1,6 fois selon une cinétique rapide, soit après 2 min de traitement, et plafonne en moyenne à 2,1 fois le niveau d'activation de base de l'enzyme dans les temps d'exposition plus longs (30, 60 et 1440 min). Cette bande est détectée dans chacun des autoradiogrammes sans toutefois montrer des variations significatives d'intensités avec les autres drogues.

3.12.5. Effet dose-réponse du taxol

Les concentrations minimales du taxol nécessaires pour induire une augmentation de l'activité de c-tak1 ont été établies par un essai de dose-réponse en utilisant les cellules PC-3. La figure 71 montre pour une période d'exposition de 24 h, les cellules traitées avec 0,01 μ M de taxol. Nous observons une augmentation de 2,8 fois le niveau de l'activité basale de c-tak1. L'effet progresse en fonction des doses croissantes du taxol jusqu'à un maximum de 11,3 fois. Le profil de la réponse enzymatique mime celui de l'inhibition de la prolifération, i.e. par la présence d'un plateau dans l'effet maximal observé pour les doses de 0,1, 1 et 10 μ M de taxol. La courbe de la figure 71B illustre l'induction relative de l'activité de c-tak1 selon la dose de taxol. Le profil de cette réponse enzymatique suggère que l'effet obtenu soit saturable. Une corrélation peut être définie entre le niveau d'activation et l'amplitude d'inhibition des cellules PC-3 par le taxol (voir l'insert dans la figure 71).

A



B

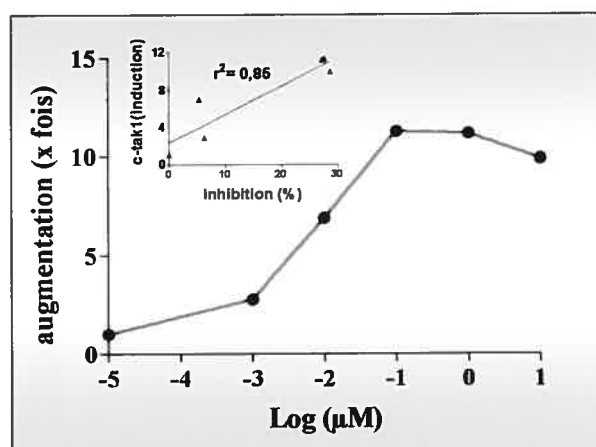


Figure 71. Activation de c-tak1 selon la dose de taxol

A) Les cellules PC-3 sont traitées pendant 24 h avec des doses croissantes de taxol. L'activité de c-tak1 est mesurée par l'essai d'activité kinasique en gel. B) Courbe représentant l'effet du taxol sur l'activité de c-tak1. L'augmentation maximale est observée à une dose de 0,1 μM . L'expérience a été répétée trois fois. L'insert représente la corrélation significative entre l'activation de c-tak1 et le niveau d'inhibition de la croissance des cellules en fonction des doses de taxol ($r^2=0,85$).

3.12.5.1. Effet de la cycloheximide sur l'activation de c-tak1

Les résultats d'activation tardive de c-tak1 par le taxol selon un temps d'exposition de 24 h suggèrent un effet au niveau de la protéine elle-même plutôt que sur l'activité de l'enzyme, ou encore, la médiation des effets par une autre protéine. Étant donné que l'anticorps mark ne détecte pas la protéine, nous avons vérifié si la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, affecte l'effet du taxol sur l'activité de c-tak1. La figure 72 montre les résultats obtenus par l'essai kinasique en gel sur des cellules traitées au taxol en présence ou non de cycloheximide sur une période de 24 h. Ainsi, la cycloheximide diminue le niveau de l'activité de c-tak1 résultant du traitement des cellules avec le taxol. On observe que le niveau d'activité des cellules contrôles est identique en présence ou en absence de cycloheximide, suggérant une longue demi-vie de la protéine c-tak1. Par ailleurs, la cycloheximide empêche l'effet du taxol sur l'activité de c-tak1. Ces résultats suggèrent l'implication d'une protéine sur la synthèse de c-tak1 afin obtenir l'effet du taxol sur l'activité de la kinase.

3.12.5.2. Modification de la phosphorylation de Cdc25C

La phosphatase Cdc25C est reliée à la phase de transition G2/M du cycle cellulaire. Elle contient plusieurs sites de phosphorylation. Pendant l'interphase, la phosphatase est principalement phosphorylée sur le résidu Ser 216, créant un site de liaison pour la protéine 14-3-3. Ce complexe inactive la phosphatase qui se distingue, en immunobuvardage, par la présence de deux bandes de 57 et 60 kDa. En mitose, la phosphatase active est hyperphosphorylée et se présente comme une bande d'environ 85 kDa

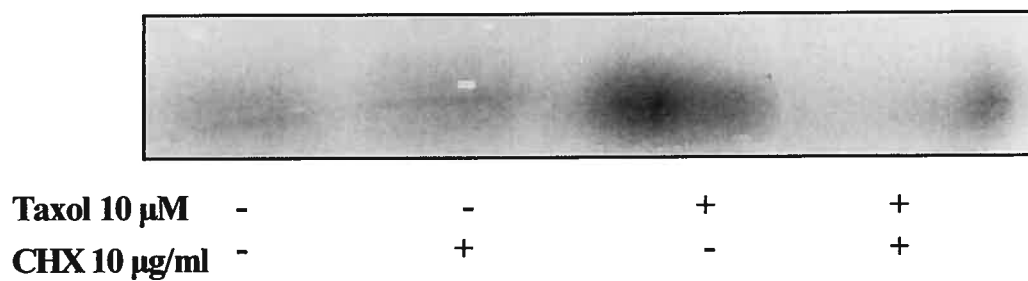


Figure 72. Effet de la cycloheximide sur l'activation de c-tak1 par le taxol

Les cellules ont été incubées pendant 24 h en présence de 10 μ M de taxol, avec ou sans cycloheximide (10 μ g/mL). Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-mark et analysés par l'essai kinasique en gel.

(Bulavin et al., 2003) Nos résultats ont montré la présence d'un complexe C-tak1-Cdc25C et un effet d'activation de la kinase par le taxol. L'entrée de la cellule et sa progression en mitose nécessitent l'activation de la phosphatase Cdc25C afin qu'elle puisse déphosphoryler le complexe cycline B/Cdc2 et la formation adéquate des fuseaux mitotiques. Ceci suggère que l'effet du taxol sur c-tak1 puisse affecter la phosphorylation de Cdc25C. Afin de vérifier si l'action du taxol sur c-tak1 implique Cdc25C, nous avons étudié le profil de cette protéine par immunobuvardage obtenus sur des extraits totaux de protéines de cellules PC-3 traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de taxol. La figure 73 montre qu'en fonction des doses de 0,001, 0,01 et 0,1 μM de taxol, la bande de 57 kDa correspondant à la phosphatase inactive augmente, pour s'estomper aux doses plus élevées de taxol, soient 1 et 10 μM . Correspondant à ces deux dernières doses, la forme hyperphosphorylée de 85 kDa de la phosphatase est détectée. La partie B de la figure 73 montre le contrôle des protéines *via* l'immunobuvardage de l'actine comme protéine de référence. La modification du profil de phosphorylation de Cdc25C affectant les formes rapides de migration de la phosphatase suggère que les cellules traitées soient bloquées en phase G2. L'augmentation de l'activation de c-tak1 pourrait favoriser la forme inactive de la phosphatase par son activité de phosphorylation sur Ser 216 (Peng et al., 1998). L'apparition de la phosphatase mitotique correspondant aux hautes concentrations de taxol suggère d'une part, qu'une population cellulaire offre une résistance à l'effet inhibiteur de la prolifération et parvient à passer en phase M du cycle cellulaire et, d'autre part, que des cellules peuvent entrer de nouveau en mitose après avoir prématurément quitter cette phase.

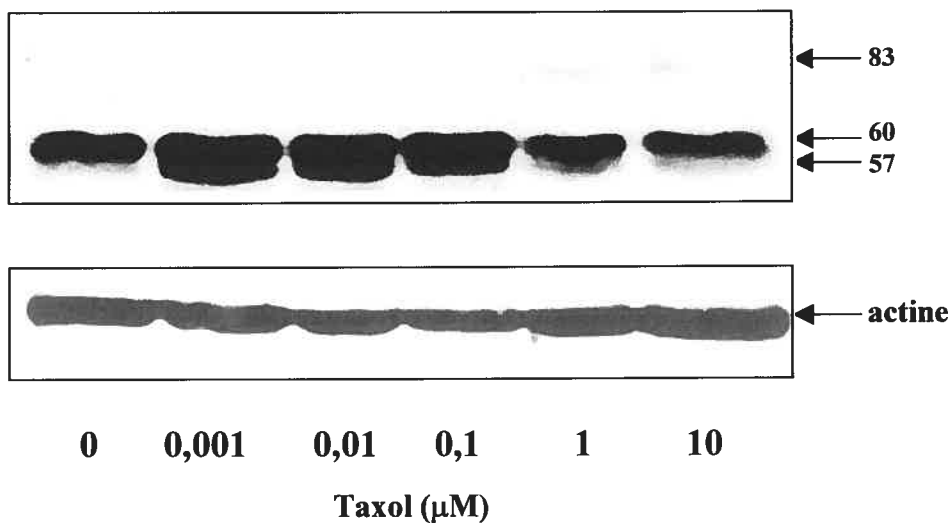


Figure 73. Phosphorylation de Cdc25C par le taxol

Les protéines des extraits totaux des cellules traitées ou non au taxol sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. L'immunobuvardage a été fait à l'aide d'un anticorps anti-Cdc25C. La quantité de protéines déposée pour l'électrophorèse est vérifiée sur la même membrane au moyen d'un anticorps anti-actine.

4. Discussion

L'espérance de vie plus longue chez l'humain a contribué à l'apparition de maladies reliées au vieillissement. Ainsi, beaucoup d'hommes voient généralement apparaître les premiers symptômes indiquant la présence d'hyperplasie bénigne et de cancer de la prostate après l'âge de 50 ans (Carter and Isaacs, 1988; Schulman and Lunenfeld, 2002). Malgré les efforts de dépistage précoce, plusieurs hommes reçoivent un diagnostic de cancer. Lorsque les cellules tumorales sont confinées à la glande, le traitement du CaP est relativement efficace. Cependant, leur migration à l'extérieur de la capsule prostatique et à des sites éloignés (métastases) affecte grandement la qualité de vie et met en péril la survie des patients. Les traitements hormonaux visant à abolir les niveaux d'androgènes et à bloquer leur action au niveau du RA s'avèrent bénéfiques mais leurs effets ne sont que transitoires. Le patient fait alors face à un pronostic sombre. Ces observations cliniques annonçaient déjà la grande complexité du CaP, et ce, dès la découverte de la réponse des cancers prostatiques aux thérapies hormonales il y a plus de 60 ans et établissant le dogme de son androgéno-dépendance. Il a fallu attendre des années pour que les découvertes montrant l'hétérogénéité des sous-types de cellules épithéliales de la prostate, la modulation directe de leurs fonctions par des facteurs non stéroïdiens, et l'activation de nombreuses molécules de signalisation, permettent de voir le CaP sous un jour différent, i.e. autre que sous la seule dépendance des androgènes et des RA. À présent et aux notions de cellules androgéno-dépendantes, se sont ajoutées celles des cellules androgéno-sensibles et androgéno-indépendantes, de même que des boucles paracrines et autocrines favorisant le développement du CaP et sa progression vers des stades de plus en plus agressifs. Les

études visant la compréhension des mécanismes de régulation des cellules prostatiques sont donc essentielles à la découverte de nouvelles molécules qui seront les bases du développement de thérapies plus efficaces contre le CaP et encore mieux, pour prévenir cette maladie insidieuse. C'est dans ce contexte que nous nous sommes attardés à certains facteurs de régulation ainsi qu'à l'implication d'une nouvelle kinase dans le contrôle de la croissance des cellules prostatiques.

Le TGF β est un FC dont les effets sur les cellules sont pléotropiques. Son rôle dans la progression du cancer relève de plusieurs modifications dans les boucles de régulation autocrine et paracrine. Le TGF β nécessite un système récepteur composé des récepteurs I et II qui sont des S/TK ainsi que le betaglycan et l'endogline, deux récepteurs accessoires. L'endogline est une molécule de surface homodimérique dont la région extracellulaire lie les isoformes du TGF β -1 et 3 (Cheifetz et al., 1992). Typiquement, l'expression de l'endogline est associée au développement des vaisseaux sanguins lors du développement et explique par le fait même, sa présence dans les cellules endothéliales reliée à l'angiogenèse pathologique (Duff et al., 2003). Son association aux cellules inflammatoires et stromales annonce aussi des modifications de sa fonction au cours de ces processus prenant place dans le stroma. De plus, alors que sa présence n'est pas observée dans les épithéliums, quelques études ont indiqué la présence occasionnelle d'endogline dans le cytoplasme des cellules néoplasiques de méningiomes (Fonsatti et al., 2001), de cancer ovarien (Henriksen et al., 1995), et de carcinomes du sein canin (Fonsatti et al., 2000). Au niveau fonctionnel, la plupart des évidences expérimentales permettent de lui attribuer non pas un simple rôle de molécule accessoire dans le système récepteur du TGF β mais un rôle

de régulation des effets du TGF β . La possibilité d'une fonction propre à l'endogline n'est pas exclue.

4.1. Endogline

L'étude des mécanismes de signalisation du système récepteur du TGF β , incluant l'endogline, ont pour but ultime de comprendre les mécanismes d'action du TGF β . Ainsi, en relation avec le processus de l'angiogenèse, nous avons étudié en collaboration avec le Dr.Philip l'importance relative de l'endogline dans le principal type cellulaire impliqué dans ce processus, les cellules microvasculaires. Ces études ont permis de démontrer l'association de l'endogline avec le betaglycan ainsi que d'identifier pour la première fois la présence des complexes de haut PM formés des récepteurs I et II et du betaglycan dans lesquels figure l'endogline. La présence de ces complexes dans les cellules microvasculaires suggère qu'ils participent aux effets du TGF β dans le processus d'angiogenèse.

Les niveaux d'expression de l'endogline, notamment dans les cellules endothéliales et les cellules stromales, varient selon les tissus, et sont vraisemblablement contrôlés lors de divers processus biologiques, *in vivo*. Le stroma utérin chez la souris possède des niveaux particulièrement élevés d'endogline (Gougos and Letarte, 1990; Cheifetz et al., 1992; St Jacques et al., 1994). Pour mieux comprendre l'importance de l'endogline, nous avons mis au point une technique permettant l'obtention d'une population hautement purifiée de cellules stromales utérines. Ces cellules exprimant l'endogline ont permis sa caractérisation en terme de composante du système récepteur du TGF β et de son implication dans les effets

du TGF β sur leur prolifération. Les données obtenues concernant la modulation de l'effet du TGF β par l'expression de l'endogline fonctionnelle dans les stromales de souris concordent avec d'autres études (Lastres et al., 1996; Letamendia et al., 1998; Li et al., 2000; Liu et al., 2002). Ainsi, l'endogline modifie les réponses des cellules au TGF β non seulement en terme de prolifération, mais aussi en termes de motilité, d'adhésion, de synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, de phosphorylation de molécules d'adhésion, de formation de microvaisseaux. L'endogline semble donc jouer un rôle dans la régulation des effets du TGF β sur le stroma utérin. Bien que l'endogline soit dépourvue de motif de signalisation, elle peut interagir avec le système récepteur du TGF β en absence du ligand et ainsi, modifier le niveau de phosphorylation des récepteurs I et II du TGF β (Guerrero-Esteo et al., 2002). Ce système récepteur peut alors favoriser la phosphorylation de Smad2, une molécule effectrice du récepteur I, qui interagit au niveau du noyau avec différents facteurs de transcription, co-activateurs ou suppresseurs.

La détection de l'endogline à la surface des lignées de cellules prostatiques humaines DU-145, PC-3 et LNCaP (Rokhlin and Cohen, 1995), couplée aux quelques autres données de son expression dans certains cancers nous apparaissaient représenter des bases solides et prometteuses pour vérifier comment l'endogline pouvait possiblement expliquer les effets paradoxaux du TGF β dans la CaP (augmentation dans le CaP et effet inhibiteur sur la croissance des cellules). À cette fin, nous avons d'abord vérifié l'expression de l'endogline dans les différentes sous-lignées des cellules de CaP. Contrairement aux résultats attendus, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence d'endogline dans aucune des lignées prostatiques cancéreuses malgré la diversité des approches abordées. L'utilisation

d'anticorps reconnaissant des épitopes différents pourrait expliquer, du moins en partie, ces résultats contradictoires. En effet, l'équipe de Rokhlin a effectué ses travaux à l'aide de l'anticorps 29-G8 qui, selon le rapport d'analyse d'un atelier tenu sur l'endogline (*EC/2 CD105 Workshop*), possède une réactivité en immunobuvardage seulement sur des extraits de placenta alors qu'il montrerait peu de réactivité en cytométrie en flux sur des fibroblastes de souris transfectées avec la forme longue de l'endogline humaine. Ceci laisse planer un doute certain sur la spécificité de cet anticorps. Quant à l'anticorps 44G4 utilisé dans nos études et qui est à l'origine de l'identification de l'endogline, sa spécificité est reconnue et il réagit fortement envers l'endogline recombinante native et dénaturée sans pour autant mettre en évidence l'endogline dans les cellules prostatiques. Soulignons que les épitopes reconnus par le 44G4 sont situés dans la portion C-terminale du domaine extracellulaire, à l'intérieur d'une petite région de 54 aa codée par l'exon 7 (*EC/2 CD105 Workshop*) qui a récemment été associée à nouvelles formes mutées identifiées dans les familles atteintes de la télangiectasie hémorragique héréditaire (Cymerman et al., 2003). L'endogline potentiellement présente dans les modèles de cellules prostatiques pourrait être mutée dans cette portion et non détectée par cet anticorps. En ce qui concerne l'anticorps polyvalent SN6h, il reconnaît une longue portion de 204 acides aminés dans la partie N-terminale du domaine extracellulaire et peut détecter la protéine native et dénaturée sous forme homodimérique et monomérique (*EC/2 CD105 Workshop*). Son utilisation n'a pas non plus permis de détecter la présence franche de l'endogline dans les cellules prostatiques, contrairement à des travaux récents suggérant une très faible expression dans les cellules PC-3M par immunocytochimie et analyse du transcrit par Northern (Liu et al., 2002). Par

ailleurs, des études d'immunohistochimie de l'endogline ont été réalisées au laboratoire sur une banque de spécimens prostatiques (Coll: Dr A.G. Aprikian). En plus des cellules endothéliales, il appert que l'endogline serait exprimée dans le stroma autour de certains foyers cancéreux. De plus, alors que l'épithélium normal et hyperplasique n'est pas marqué, les lésions PIN et cancéreuses le sont, en partie car environ 30% de la surface des tumeurs sont hautement positives (Kassouf et al, sous presse). Ce qui est plus significatif, et en accord avec les résultats *in vitro* sur la faible ou non expression de l'endogline dans les lignées cancéreuses de CaP, est la baisse de réactivité des tumeurs observée avec la progression du cancer de même qu'avec les traitements anti-androgènes (Ismail, *et al.*; non publiés). Ceci suggère que la hausse d'expression de l'endogline soit reliée au développement du CaP et sa baisse, associée à la progression. Ceci va de pair avec nos résultats combinés avec ceux de la littérature selon lesquels les niveaux d'expression endogène de l'endogline dans le CaP avancé sont très faibles sinon inexistantes. Sa détection dans l'épithélium nécessite des conditions particulières dans des sous-populations de cellules prostatiques pré-malignes et cancéreuses. Or, la surexpression de l'endogline dans les cellules PC3-M favorisant l'augmentation de l'adhésion des cellules *in vitro* est associée à une diminution de leur migration et invasion (Liu et al., 2002). Il a été suggéré que la perte d'expression de l'endogline *in vivo* puisse figurer parmi les modifications d'expression protéique apportées par la progression du cancer. Ainsi les observations chez les patients et les cellules des lignées représentant des stades de CaP métastatiques vont en ce sens et suggèrent des modifications importantes, possiblement transitoires, du rôle de l'endogline au cours de l'émergence du CaP. La signification de ces résultats quant à l'effet

du TGF β n'est pas connue. À cet égard, les différences obtenues dans le niveau d'inhibition du TGF β sur la prolifération des différents lignées cellulaires prostatiques ne peuvent pas être reliées à la présence de l'endogline. De façon générale, les types cellulaires où la réponse du TGF β est modulée par l'endogline montrent une expression franche de la protéine. D'ailleurs, la surexpression de l'endogline contrecarre l'effet inhibiteur du TGF β sur la prolifération des cellules pro-monocytes U-937. De plus, l'endogline inhibe la stimulation de la synthèse de la fibronectine et de l'adhésion cellulaire dépendante de la fibronectine, induits par le TGF β ainsi que la phosphorylation du récepteur d'adhésion PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) (Lastres et al., 1996). L'utilisation d'ODN anti-sens de l'endogline dans des cellules endothéliales humaines en culture restaure l'effet inhibiteur du TGF β sur la migration et de la prolifération cellulaire (Li et al., 2000). Il est possible que les mécanismes de régulation du système récepteur du TGF β et les nombreux effecteurs de sa voie de signalisation diffèrent selon la malignité des cellules et que conséquemment, ceci se traduise par une amplitude variée dans les effets du TGF β .

4.2. Caractérisation de c-tak1

Le clonage des S/TK et des TK a été utilisé par diverses équipes pour identifier des nouvelles kinases dans plusieurs types de cellules et tissus étudiés (Cance et al., 1993; Wilks, 1993; Craven et al., 1995; Robinson et al., 1996). Cette approche est basée sur la présence de séquences ultraconservées dans le domaine catalytique. Dans le laboratoire, plusieurs kinases ont été identifiées dans une banque d'ADNc de cellules prostatiques de chien et parmi celles-ci, un transcrit présentait 97 % d'homologie avec des membres de la

famille des Mark kinases. La déduction de la séquence prévoit une protéine de 80 kDa. Subséquemment, le clonage de la kinase c-tak1, aussi identifiée sous le nom de mark3 et de kp78, a été réalisé dans les cellules prostatiques PC-3 (Atfi; résultats non publiés) et l'ADNc a été obtenu et séquencé entièrement (Beaulieu; résultats non publiés). La comparaison des séquences de nucléotides dans la banque *Genbank* a permis de montrer une homologie de 97% entre les membres p78, c-tak75a et c-tak1. Puisque cette kinase n'avait jamais été étudiée mis à part par transfection dans les cellules COS, ceci nous a incité à vérifier l'expression de c-tak1 dans les lignées de cellules prostatiques humaines et canines. En fait, les données de la littérature indiquaient une diminution de l'expression de p78 dans le cancer du pancréas (Parsa, 1988). L'utilisation d'une combinaison d'amorces basées sur la présence de petits inserts spécifiques à chacune des kinases c-tak75a, p78 et c-tak1 a permis de vérifier si les trois membres étaient présents dans nos modèles. Nos résultats ont montré que non. En effet, parmi les kinases c-tak75a, p78 et c-tak1, seule c-tak1 est exprimée préférentiellement dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines et canines ainsi que dans les cellules prostatiques de chien en culture primaire. Dans les cellules LNCaP et PC-3 représentant des stades différents des métastases du CaP, l'expression d'un transcrit de 2,7 kb par analyse de Northern, associé à la présence d'un amplicon de PCR correspondant à c-tak1, a confirmé l'expression préférentielle de cette kinase. Afin de poursuivre la caractérisation de c-tak1 en terme d'expression et de régulation et de pallier l'absence d'anticorps commercial, nous avons produit un anticorps polyclonal. Mentionnons qu'au cours de ces derniers mois, un tel anticorps a été

commercialisé. Nos essais d'immunobuvardage ont montré une piètre qualité, i.e. la détection de nombreuses bandes de PM non représentatifs de c-tak1.

4.2.1. La protéine de c-tak1

La première approche a été d'utiliser le système génique d'induction des protéines de fusion. Malgré les nombreux essais d'induction sur plusieurs clones de bactéries et dans différentes conditions expérimentales, il n'a pas été possible dans aucun cas de détecter la protéine de fusion GST-c-tak1. L'absence de détection ou d'induction de c-tak1 pourrait s'expliquer par le masquage de la protéine de fusion par une chaperonine de E.Coli, la DnaK migrant dans la région de 70 kDa et toujours présente (Buchberger et al., 1994). Malgré que les régions d'insertion du fragment dans le vecteur apparaissent adéquates, le séquençage des zones d'insertion de l'ADN codant pour le fragment de c-tak1 aurait permis de vérifier la justesse du cadre de lecture du vecteur.

La deuxième stratégie fut d'utiliser deux peptides de synthèse comme source d'antigènes. Les anticorps P1805 produits à partir du peptide correspondant à l'insert de c-tak1 n'ont pas montré de réactivité pour la protéine dénaturée et n'ont pas immunoprécipité la protéine c-tak1 active, tel que testée par l'essai kinasique en gel. La présence de 5 résidus sérine consécutifs dans cette séquence de 16 acides aminés pourrait expliquer le faible potentiel immunogénique du peptide sélectionné. Par ailleurs, le deuxième peptide de synthèse P1806 correspond à une séquence de 20 acides aminés couvrant une portion qui est aussi commune aux kinases p78 et c-tak75a et est située dans la région N-terminale de la protéine. Les anticorps dirigés contre le peptide ne démontrent aucune immunoréactivité pour la protéine c-tak1 sous forme dénaturée malgré la présence des titres élevés en ELISA.

Le profil hydrophatique de la protéine, calculé selon l'algorithme de Kyte-Doolittle, montre que le segment choisi a une tendance hydrophobe, et est donc potentiellement faiblement antigénique. Cependant, une kinase correspondant au PM de c-tak1 est détectée dans les immunoprécipités effectués avec les anticorps suite à l'essai d'activité kinasique en gel. La spécificité de l'anticorps a été déterminée à l'aide de la protéine c-tak1 étiquetée avec un épitope Myc-His. Ainsi, la protéine c-tak1 recombinante immunoprécipitée avec l'anticorps suivie de l'immunobuvardage à l'aide de l'anti-myc en gel montre une protéine migrant à 80 kDa. L'approche inverse, à savoir l'immunoprécipitation de la protéine c-tak1 recombinante avec l'anticorps anti-myc, suivie de l'essai kinasique en gel montre une kinase renaturée à 80 kDa. Dans les lignées cellulaires PC-3 et LNCaP, l'activité sérine kinase de la protéine a été confirmée par l'analyse des acides aminés phosphorylés extraits de la kinase de 80 kDa immunoprécipitée avec les anticorps. Ceci est en accord avec l'activité S/TK des Mark précédemment décrite (Espinosa and Navarro, 1998). Ces essais démontrent que la kinase active est c-tak1 et confirme la spécificité des anticorps pour c-tak1 dans nos modèles où cette enzyme est préférentiellement exprimée. Nous avons donc dénommé nos anticorps anti-mark en raison de la réactivité possible avec c-tak75a et p78, mais qui ne devraient pas reconnaître les autres membres de la famille tels que les kinases humaines markL1 et mark1 étant donné l'absence d'homologie entre celles-ci et le peptide immunogénique P1806. Toutefois, nos études n'excluent pas la présence de ces kinases dont une, markL1, identifiée dans d'autres types cellulaires (Kato et al., 2001) mais jamais dans les cellules prostatiques. Le fait que l'anticorps ne fonctionne pas en immunobuvardage mais qu'il immunoprécipite c-tak1 suggère qu'il reconnaisse un épitope

situé au niveau des structures secondaires et tertiaires de la protéine. L'utilisation de nos anticorps pourrait s'avérer intéressante pour l'étude de l'activité de c-tak1 ou les membres homologues après immunoprécipitation d'extraits d'autres tissus et cellules. Par les tailles différentes de c-tak1 (80 kDa) et c-tak75a (taille calculée de ~150 kDa) mais pas de p78, l'essai kinasique en gel permettrait jusqu'à un certain point de discriminer certaines des kinases entrant en jeu si les études sont couplées à des expériences d'analyse des transcrits. Par ailleurs, étant donné la reconnaissance de c-tak1 dans sa forme native, il serait intéressant de vérifier par cytométrie en flux si cet anticorps reconnaît c-tak1 après perméabilisation des cellules.

Étant donné notre intérêt pour le CaP et les cellules souches de la prostate, nous avons voulu investiguer l'activité de c-tak1 dans les cellules prostatiques. Il faut noter que l'essai kinasique en gel sur un extrait total de protéines PC-3 montre généralement la renaturation de nombreuses kinases tel que rapporté (Durocher et al., 1992; Atfi et al., 1995). Cependant, dans les cellules PC-3 et LNCaP, une seule kinase active de 80 kDa est reconnue dans les immunoprécipités avec les anticorps anti-mark, confirmant sa spécificité pour c-tak1. Ainsi, nous avons évalué le niveau d'activité de c-tak1 dans différents modèles de cellules prostatiques après l'immunoprécipitation des protéines. De façon intéressante, nous avons montré que les deux lignées PC-3 et LNCaP expriment le transcrit de c-tak1 de façon équivalente alors que l'essai kinasique en gel permet de constater que l'activité de c-tak1 dans les cellules PC-3 est significativement plus élevée que dans les cellules LNCaP. Considérant ces niveaux équivalents d'ARN, une différence d'activité ne peut que provenir que d'une régulation post-transcriptionnelle. A ce niveau, il pourrait s'agir, entres autres,

d'une différence de stabilité du transcrit et du taux de traduction. De plus, une diminution du taux de dégradation peut aussi mener à une augmentation de la quantité finale de protéines, résultant en une activité kinasique plus élevée. En présence d'une quantité équivalente de protéines, une augmentation de l'activité kinasique de c-tak1 pourrait résulter d'une modification post-traductionnelle telle la phosphorylation. Les différences de niveaux observées pourraient correspondre à une activité enzymatique intrinsèque véritable de c-tak1. Aussi, nous référerons donc au niveau de l'activité de c-tak1. De façon intéressante, l'activité de la kinase c-tak1 a été détectée dans les tissus prostatiques humains cancéreux et métastatiques alors qu'elle est absente dans les tissus hyperplasiques et normaux. Dans ces tissus humains, plusieurs autres kinases non identifiées ont co-immunoprécipitées. Celles-ci peuvent faire partie de complexes réels présents dans les cellules, liés à l'activité ou la fonction de c-tak1, plutôt qu'être le résultat des méthodes expérimentales (non observés dans tous les tissus). De façon semblable, c-tak1 n'est pas détectée dans la prostate normale de chien alors qu'elle est induite, bien que plus faiblement, dans les cellules prostatiques normales de chien *in vivo* et *in vitro* et présente dans la lignée de CaP canine, DPC1. Dans les tissus et cellules normales en culture, une deuxième kinase active d'environ 55 kDa apparaît dans les immunoprécipités de c-tak1. La nature de cette kinase n'a pas été déterminée mais pourrait être associée à une kinase de même taille retrouvée dans certains types cellulaires et dont la nature et le rôle demeurent jusqu'à présent inconnus (Wang et al., 2000). Les différences significatives des niveaux d'activité de c-tak1 entre les tissus humains cancéreux (*vs* normaux et hyperplasiques) et les lignées cancéreuses parentales (LNCaP *vs* PC-3) corrélient jusqu'à un certain point avec

le phénotype tumoral bien que les sous-lignées aient des propriétés semblables quant à l'activité c-tak1. Nous avons notamment utilisé la lignée hautement tumorigénique DPC1, isolée à partir d'un adénocarcinome de la prostate peu différencié chez un chien intact (Anidjar et al., 2001), pour appuyer l'implication de c-tak1 dans le CaP. Ces cellules montrent une activité de c-tak1 constitutive comparable à celle des PC-3 et ceci renforce le lien entre le niveau de l'activité de la kinase et le potentiel métastatique des cellules. Cette kinase pourrait donc se comporter comme un marqueur tumoral des adénocarcinomes prostatiques, à l'inverse de la kinase p78 qui est perdue dans les cancers du pancréas, et qui selon les auteurs, s'expliquerait par l'absence de la reconnaissance de l'épitope par les anticorps évaluée par immunohistochimie (Parsa, 1988). Par ailleurs, l'expression accrue de la kinase MarkL1, un autre membre de la famille des Marks, dans les carcinomes hépatocellulaires (Kato et al., 2001) va dans le sens de nos travaux. Des études plus approfondies sur c-tak1 sont requises pour vérifier si cette kinase/protéine se comporte comme un marqueur de la progression tumorale ou même de l'initiation du cancer, s'ajoutant à des marqueurs de cellules endothéliales (endogline) reflétant l'angiogenèse et de cellules neuroendocrines (chromogranine) dont l'augmentation du nombre est associée à la progression.

4.2.2. Recherche de facteurs de modulation de c-tak1

L'identification de c-tak1 dans les cellules prostatiques étant nouvelle, son rôle et sa régulation ne sont pas connus. Par ailleurs, l'utilisation du modèle canin et de la lignée de CaP chez le chien de même que les tissus prostatiques et lignées de CaP humains indiquent que nos résultats sont d'intérêt physiopathologique. Dans le modèle canin, nous avons

démontré que l'induction de l'activation de c-tak1 varie de façon parallèle à l'entrée des cellules épithéliales normales dans leur cycle de division. De fait, suite à l'immunoprécipitation par les anticorps anti-mark d'extraits de cellules épithéliales prostatiques de chien fraîchement isolées, il y a absence de l'activité kinase mais celle-ci est détectée lorsque les cellules sont en culture primaire. Il a déjà été rapporté que les cellules isolées de la prostate sont quiescentes par opposition à celles qui commencent à se diviser après leur adhésion. L'activation de c-tak1 est donc induite dans les cellules en division alors que l'activité c-tak1 est constitutive dans la prostate cancéreuse. Ceci permet d'associer la prolifération des cellules basales /souches à l'activation de c-tak1 et appuie le concept de la contribution possible des cellules prostatiques souches dans le CaP. Soulignons aussi que c-tak1 présente le même profil d'activation que les kinases de type TK comme Fer et FAK dont l'expression est aussi induite lorsque les cellules primaires canines commencent à se diviser *in vitro*. Ces kinases sont aussi sur-exprimées dans les tissus prostatiques de patients souffrant de CaP et associées à la progression du CaP (non publiés). Il est intéressant ici de faire le lien entre les niveaux d'activité de c-tak1 selon le profil tumoral des cellules et la capacité de division des cellules. Par exemple, l'analyse de l'activité de c-tak1 dans des cellules neuronales qui normalement n'effectuent pas de division cellulaire apporterait de l'information complémentaire. Nos données rejoignent celles montrant que les cellules d'hépatocytes SNU4 surexprimant MarkL1 ont une activité de prolifération accrue (Kato et al., 2001).

La progression du cancer implique plusieurs modifications dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires. Dans les CaP avancés, les

cellules tumorales sont peu différenciées et leur prolifération est indépendante des androgènes. La manipulation des chiens castrés par l'administration d'œstrogènes permet de reproduire des conditions de croissance des cellules prostatiques androgéno-indépendante. Ceci se produit chez les patients atteints de CaP où les cellules tumorales finissent par échapper aux effets des traitements hormonaux. Dans le cas présent, les œstrogènes favorisent la métaplasie des cellules basales, à l'inverse des androgènes qui contribuent à la différenciation des cellules sécrétrices/luminales. Or l'activité de c-tak1 est détectée dans les tissus prostatiques métaplasiques alors qu'elle est absente dans les tissus caractérisés par le renouvellement d'un épithélium de cellules luminales/sécrétrices. Nous avons fractionné ces tissus en protéines solubles et particulaires pour d'autres objectifs mais fait assez intéressant, l'activité c-tak1 est associée à la fraction particulaire uniquement. C-tak1 est-elle une protéine soluble (Peng et al., 1998). Son association à la dynamique possible des microtubules pourrait expliquer la signification de cette distribution, mais seules d'autres études permettront de clarifier ce point. Nos résultats de l'induction de l'activité de c-tak1 *in vivo* vont une fois de plus de pair avec ceux montrant la présence des TK phosphorylées dans les cellules basales de la prostate et l'augmentation de leur activité dans les cellules en division sous l'effet des œstrogènes. Les activités PTP de ces cellules sont faibles. A l'inverse, peu ou pas de protéines phosphorylées sur Y et TK ont été détectées dans les tissus différenciés sous l'effet des androgènes où l'activité PTP est élevée de même que dans les cellules stromales (Landry et al., 1996). Les travaux antérieurs ont montré que les cellules non sécrétrices ou basales/souches sont préférentiellement sélectionnées par leur adhésion en culture primaire par rapport aux

autres sous-types de cellules épithéliales prostatiques, puis se divisent en absence de stéroïdes sexuels mais nécessitent des FC (Chevalier et al., 1991). Nos résultats montrant qu'*in vitro*, le niveau d'activité de c-tak1 dans les cellules prostatiques de chien n'est pas modulé par la DHT et l'œstradiol autant en présence qu'en absence de sérum vont dans le même sens et suggèrent que les hormones puissent exercer des effets de type paracrine ou indirects, sollicitant possiblement la voie des FC et stimulant l'activité de kinases, particulièrement celle des TK. Le lien entre l'induction de c-tak1 et la croissance androgéno-indépendante des cellules basales *in vitro* et *in vivo* dans le modèle canin et le CaP androgéno-indépendant est appuyé par les données sur l'activation constitutive de c-tak1 dans les cellules DPC1 et les observations indiquant que le chien peut développer le CaP spontanément avec l'âge malgré une castration étant jeune (Obradovich et al., 1987; Ruble, 1988; Cornell et al., 2000). De plus, les animaux souffrant de CaP, sont généralement diagnostiqués tardivement et ne répondent pas à l'hormono-thérapie (Obradovich et al., 1987; Waters and Bostwick, 1997; Cornell et al., 2000).

La progression du cancer et un pronostic faible sont associés à l'augmentation du nombre de cellules NE dans la prostate cancéreuse (Aprikian et al., 1998). Ces cellules sécrètent des neuropeptides, dont le GRP (analogue à la bombésine) (Aprikian et al., 1993), qui peuvent moduler de façon paracrine le phénotype invasif (Aprikian et al., 1997; Hoosein et al., 1993) ainsi que la croissance tumorale (Bologna et al., 1989). Le mécanisme sous-jacent nécessite la liaison à un récepteur, par exemple le RCPG pour la bombésine. Par la suite, il y a une augmentation du niveau de calcium intracellulaire (Aprikian et al., 1996; Han et al., 1997), stimulation de la phosphorylation de FAK (Aprikian et al., 1997) et l'association de

la kinase de type non récepteur Src à une protéine nucléaire p110 (Allard et al., 2000a). L'expression de p110 dans les cultures primaires de cellules de chien en division, dans les tissus et cellules prostatiques cancéreuses humaines ainsi que dans les tissus prostatiques métaplasiques de chien castré supplémenté avec des œstrogènes lui confèrent un rôle possible comme effecteur dans la voie de signalisation de la bombésine, en relation avec ses effets sur la motilité. Or ceci cadre avec le profil d'activation de c-tak1, qui tel que mentionné, mime celui d'autres TK activées telles que FAK et Fer lorsque les cellules basales/souches entrent en division. Dans ces conditions expérimentales, nous avons observé une absence d'activation de c-tak1 suite à la stimulation des cellules PC-3 par les neuropeptides. Ceci suggère que c-tak1 soit un effecteur d'autres voies de signalisation et que son activité du moins *in vitro*, ne soit pas directement ou rapidement modulée par le sentier des RCPG.

La littérature récente indique que l'interleukine-6 est une cytokine qui module positivement (PC-3) ou négativement (LNCaP) la prolifération des cellules de CaP humaines. Il appert que dans les cellules sensibles aux androgènes, les différents effets biologiques résultant de la transactivation du RA sollicitent plusieurs voies de signalisation. Ainsi, les voies des MAPK ou de STAT3 activent la transactivation du RA, contrairement à l'effet de suppression du RA *via* la voie de PI3K-Akt, d'où la diversité des réponses biologiques obtenues (Yang et al., 2003). Le niveau de phosphorylation de la kinase de type non récepteur Fer est régulé selon un patron biphasique par l'interleukine 6 (résultats du laboratoire). De plus, Fer serait impliquée dans la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses, non seulement en raison de sa surexpression mais du fait que les clones stables

de cellules PC-3 transfectées avec l'ADNc anti-sens de *fer* exprimant 70% moins de Fer se divisent très lentement et ne forment plus de colonies en agar mou. Malgré l'association de c-tak1 avec les cellules ayant la capacité de se diviser, nous avons observé que l'activité de c-tak1 demeure au niveau basal suite à la stimulation des cellules avec l'interleukine 6. L'absence de réponse en présence de tels facteurs stimulant la prolifération suggère que c-tak1 soit activé par d'autres stimuli, notamment présents dans le sérum de chien.

In vitro, le TGF β exerce des effets d'inhibition sur la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses humaines. Nos résultats ont montré une relation entre le niveau d'inhibition de la prolifération cellulaire par le TGF β et le phénotype tumoral des cellules. L'endogline est absente ou très faiblement exprimée dans les cellules prostatiques et les niveaux d'activité basale de c-tak1 entre les sous-lignées sont semblables entre eux. Les mécanismes responsables des différences du niveau d'inhibition des cellules par le TGF β ne sont donc pas directement dépendants de l'activité de c-tak1. Ceci n'exclut toutefois pas la possibilité que c-tak1 puisse être activée par le TGF β , d'autant que des travaux précédents ont montré l'action rapide de ce FC sur une protéine kinase de type S/TK, p78 (Atfi et al., 1994). En raison de la similarité de migration de cette S/TK p78 non identifiée jusqu'à maintenant et celle de c-tak1, nous avons investigué le rôle du TGF β dans l'activation de c-tak1. Il appert que dans certaines conditions expérimentales, le TGF β stimule rapidement l'activité de c-tak1 dans les cellules PC-3, selon une cinétique rappelant le profil d'activation de p78, et d'autres TK en réponse à des FC, des cytokines, ou des neuropeptides. Cependant, l'activation de c-tak1 par le TGF β semble être dépendante de conditions expérimentales précises, rendant difficiles l'étude de mécanismes en cause ou substrats. Il est généralement

connu que le TGF β active la voie de signalisation des Smad *via* sa liaison au système récepteur du TGF β (Massague, 1998). L'activation rapide de c-tak1 pourrait être une étape précoce de cette signalisation, conduisant à l'effet inhibiteur du TGF β sur la prolifération cellulaire *in vitro* *via* l'inactivation de Cdc25C. En fait, c-tak1 phosphoryle Cdc25C sur Ser 216 et cause son inactivation dans des cellules surexprimant c-tak1 et la phosphatase Cdc25C *in vitro* (Peng et al., 1998). Par conséquent, la phosphatase ne peut activer le complexe cyclineB/Cdc2 nécessaire pour l'entrée des cellules en mitose (Karlsson et al., 1999). L'activation de c-tak1 suite à la stimulation des cellules par le TGF β serait en accord avec ce modèle mais des études supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier un effet du TGF β sur c-tak1, par exemple utilisant un dominant négatif de c-tak1.

4.2.3. Interaction de c-tak1 avec des partenaires de signalisation

Dans la recherche du rôle possible de c-tak1 dans les cellules prostatiques, nous avons cherché des partenaires de signalisation en se basant sur les propriétés de la famille Mark et les travaux de la littérature. Les protéines de la famille des Mark sont caractérisées par leur affinité avec les microtubules et leur rôle de régulation des MAP (Drewes et al., 1997). Cette régulation affecte directement la dynamique des microtubules (Ebner et al., 1999) et entraîne des répercussions dans le déroulement du cycle cellulaire, particulièrement la phase de la mitose au cours duquel les fuseaux mitotiques jouent un rôle prépondérant. L'implication possible des kinases Mark dans le cycle cellulaire est appuyée par les observations montrant que Mark1 et Mark2 de rat déstabilisent les microtubules *via* la phosphorylation de MAP4 (Ebner et al., 1999). Ainsi, la dynamique des microtubules est modifiée pendant la transition de la phase G2 à M du cycle cellulaire, où MAP4 interagit

avec et est phosphorylée par le complexe cycline B/Cdc2 (Ookata et al., 1997). Dans les cellules prostatiques, la présence d'un complexe c-tak1-MAP4 n'a pu être mise en évidence. Ceci n'exclut pas que c-tak1 puisse phosphoryler MAP4 mais suggère encore une fois, la présence d'intermédiaires de signalisation ou qu'en absence de stimulus, le complexe est absent. Des travaux sur les Smad ont montré la liaison des Smad 2, 3 et 4 avec les microtubules, le TGF β causant la dissociation des Smad 2 et 3 des microtubules, qui sont par la suite transportées dans le noyau pour activer les gènes de réponse au TGF β (Dong et al., 2000). En regard de nos résultats supportant l'activation de c-tak1 suite à la stimulation par le TGF β , nous avons vérifié la présence d'un complexe c-tak1-tubuline β . Ce dernier complexe n'a pas été trouvé dans les cellules PC-3. De l'ensemble de ces résultats, nous concluons qu'en l'absence de stimulation, c-tak1 ne s'associe pas avec MAP4 ainsi qu'avec la tubuline. De plus, en dépit de l'absence d'un rôle direct de c-tak1 dans la phosphorylation des MAP4, il est possible que c-tak1 exerce d'autres fonctions sur les microtubules ou les protéines du cytosquelette. Il a été rapporté que les kinases Mark étaient essentielles à l'établissement de la polarité cellulaire (Levin and Bishop, 1990; Guo and Kemphues, 1995; Bohm et al., 1997; Nelson and Grindstaff, 1997). Cette fonction serait attribuée au domaine C-terminal du gène *Par-1*, conduisant à l'interaction de la protéine avec les chaînes lourdes de la myosine non musculaire du type II (NM-MIIHC) dans les embryons de *C.Elegans* (Guo and Kemphues, 1995). De plus, la micro-injection d'ARN antisens de NM-MIIHC résulte en des phénotypes similaires à ceux induits par les mutations de *par-1*, lesquelles empêchent la division asymétrique nécessaire pour le développement des embryons (Guo and Kemphues, 1995). La surexpression d'un dominant

négatif de la kinase Mark dans les cellules MDCK altère sérieusement l'intégrité du cytosquelette de la cellule (Bessone et al., 1999). De même, l'abolition de l'expression du gène *Emk* chez la souris retarde le développement et altère la fonction immunitaire (Hurov et al., 2001).

La relation établie entre c-tak1 et la phosphorylation de la phosphatase Cdc25C par co-transfection dans les cellules COS nous a incité à tester la présence de complexes c-tak1-Cdc25C dans des conditions "plus" physiologiques, i.e. dans les cellules PC-3. Nos résultats ont montré leur présence, établissant par le fait même l'existence de complexes endogènes entre c-tak1 et Cdc25C et renforçant donc les études antérieures. Se référant au rôle possible de c-tak1 dans la cycle cellulaire, un processus dont la progression nécessite l'orchestration de cycles d'activité de déphosphorylation des phosphatases sur les complexes cyclines/Cdk ainsi que d'inactivation de ces enzymes, nous avons mesuré l'activité de c-tak1 dans des cellules PC-3 partiellement synchronisées en phase G2/M et G1/S. Nous avons observé qu'il n'y avait aucune variation, quel que soit les proportions des populations de cellules au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Ceci est en accord avec l'expression constante de c-tak1 pendant le cycle (Peng et al., 1998). Soulignons les difficultés à induire une synchronisation parfaite des cellules tumorales PC-3, en dépit d'essais de plusieurs conditions. Ceci suggère que ces cellules hautement tumorigéniques échappent partiellement aux effets attendus des différents inhibiteurs régulant le cycle cellulaire.

4.2.4. Interactions de c-tak1 avec les drogues chimiothérapeutiques associées aux microtubules

Dans nos modèles prostatiques, l'activation de c-tak1 est associée aux cellules en processus de division mais ne semble pas directement régulée par des FC stimulant leur prolifération ou la phosphorylation des TK. Malgré l'absence de régulation de l'activité de c-tak1 au cours du cycle cellulaire, la présence du complexe c-tak1-Cdc25C dans les cellules PC-3 lui confère un rôle possible dans la régulation du cycle cellulaire. Étant donné l'appartenance de c-tak1 à la famille mark, un tel rôle peut notamment être associé à des effets sur les microtubules. Pour exploiter cette possibilité, et en regard de l'utilisation en clinique de drogues chimiothérapeutiques bloquant la prolifération et tuant les cellules cancéreuses, nous avons utilisé des drogues associées aux microtubules. Nous avons comparé l'efficacité de la vinblastine, de la vincristine, de la colchicine, et du taxol, dans leurs effets d'inhibition de la prolifération des cellules LNCaP et PC-3, puis avons vérifié leurs effets sur l'activation de c-tak1. Ces deux lignées ont été choisies en raison de leurs différences de sensibilité aux androgènes et de réponses aux effets des drogues. Tenant compte du nombre de cellulesensemencées au départ, nous avons observé une inhibition de leur prolifération (ou division) plutôt qu'un effet de cytotoxicité. Le maximum obtenu est de l'ordre de 40% avec des IC_{50} de l'ordre du nM et ce, pour chacune des drogues testées. Nos observations au niveau des IC_{50} (tableau 13) indiquent que les cellules LNCaP montrent une plus grande sensibilité aux effets des drogues. De plus, considérant le temps de dédoublement de 34 h des cellules PC-3 (revoir le tableau 10) et de 62 h des cellules LNCaP (observations du laboratoire), le nombre de cellules qui échappent à l'effet des drogues est plus important dans les PC-3 pour un même 40% d'inhibition. Ces données rejoignent la littérature où les

IC₅₀ du taxol pour l'inhibition de prolifération des cellules PC-3 et LNCaP sont de l'ordre du nM ou parfois du μ M (Blagosklonny et al., 2000; Mastbergen et al., 2000; Vadgama et al., 2000). Nos résultats d'inhibition impliquent que 60% des cellules échappent à l'effet des drogues, ce qui rejoint les données indiquant l'acquisition progressive d'une résistance aux drogues chimiothérapeutiques, tel qu'observée en clinique de même qu'avec plusieurs types de cellules cancéreuses en culture. La résistance aux drogues est souvent multifactorielle, et causée par des altérations des microtubules (mutations, isotypes de la tubuline, modifications post-traductionnelles) ou des protéines de régulation (Orr et al., 2003). La résistance des cellules PC-3 et LNCaP ne peut être reliée à la présence de la P-glycoprotéine, une molécule de transporteur des drogues puisque celle-ci n'est pas exprimée (van Brussel et al., 1999; Makarovskiy et al., 2002) ou faiblement détectée (Theyer et al., 1993). Cependant, la protéine MRP (*multidrug resistance-associated protein*) agissant comme transporteur de la molécule GST- π (*glutathione-S-transferase- π*) est présente dans les cellules PC-3, et pourrait expliquer, du moins partiellement, la résistance des cellules aux xénobiotiques (van Brussel et al., 1999).

Les propriétés d'assemblage des microtubules sont reliées aux différentes isoformes de tubuline β , conférant ainsi des sensibilités différentes aux effets du taxol. Des variations dans l'expression de ces isoformes contribuent aux mécanismes de résistance des cellules au taxol. L'expression de la tubuline IV est élevée dans les cellules PC-3 dérivées de cellules résistantes au taxol (Makarovskiy et al., 2002) alors que dans les cellules DU-145, celle de l'isoforme β III est augmentée jusqu'à 9 fois (Ranganathan et al., 1998).

L'observation au microscope des cellules traitées avec les différentes drogues a permis de détecter des signes d'apoptose de certaines cellules, mis en évidence par la présence de noyaux fragmentés et de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire. La suppression de la dynamique des microtubules par le taxol est la principale cause de l'arrêt de la division cellulaire (Jordan et al., 1996). La mort cellulaire par apoptose peut se produire après l'arrêt de la mitose (Woods et al., 1995) ou lors de la sortie prématurée de la cellule de cette phase du cycle cellulaire. Le point de surveillance relié à l'intégrité de l'assemblage du fuseau mitotique participe également au processus d'apoptose. Les protéines *hs-MAD2*, *BUB1*, *BUB3* pour ne nommer que celles-ci assurent l'arrêt du cycle cellulaire en présence d'un alignement inadéquat entre les chromosomes et les fuseaux mitotiques (Li et al., 1997; Taylor et al., 1998). Ainsi, le traitement des cellules avec le taxol augmente l'expression de *BUB3* (Martinez-Exposito et al., 1999). Ces effets montrent l'importance des microtubules dans le processus de la division cellulaire. En situation normale, dans l'interphase, les microtubules liés au centre organisateur des microtubules, le centrosome, irradient vers la périphérie de la cellule pour assurer le transport d'organelles, la forme de la cellule, l'organisation du réticulum endoplasmique. Lorsque la cellule entre en mitose, les microtubules deviennent dynamiques et se réorganisent et forment le fuseau mitotique bipolaire. Ce dernier interagit avec les chromosomes et les kinétochores (Holy and Leibler, 1994). La réorganisation des microtubules est ainsi essentielle pour l'alignement et la ségrégation adéquate des chromatides. La présence de cellules géantes, multinucléées, suite au traitement au taxol, résulte probablement de cellules ayant sorti prématurément de la mitose sans effectuer la cytotéurèse et qui après un certain délai mourront par apoptose,

deviendront sénescentes ou poursuivront des cycles de réplication (Makarovskiy et al., 2002). La présence de ces cellules polyploïdes suggère que le point de surveillance relié aux fuseaux mitotiques soit défaillant permettant la progression de ces cellules dans le cycle. Ce phénomène a été étudié dans les cellules PC-3 traitées au taxol et a montré que dès 24 h après le traitement, il y a accumulation de cellules ayant un contenu en ADN 4N et même plus, ce qui suggère aussi que le point de surveillance post-mitotique prévenant la réduplication des cellules ayant une ségrégation imparfaite des chromosomes soit défectueux (Lanzi et al., 2001).

L'activation des divers points de surveillance du cycle cellulaire résulte de l'intégration de divers signaux tels que: 1-les dommages cellulaires nécessitant un temps de réparation; 2-les stress génotoxiques (irradiation ou rayons ultraviolets); 3-la déplétion en FC, en hormones ou en nutriments. Selon le type de dommages, ces points de contrôle conduisent à l'arrêt de la cellule dans le cycle ou à la mort cellulaire par apoptose (Pietenpol and Stewart, 2002). Ainsi par exemple, conséquent à un dommage de l'ADN, plusieurs voies biochimiques (représentées à la figure 74) sont activées afin d'inhiber l'activation de Cdc2, responsable de l'entrée de la cellule en mitose. Ainsi, plusieurs membres de la famille de PI-3K (*phosphoinositide 3-kinase-related kinase*) dont DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (*ATM-Rad3-related*) phosphorylent directement la protéine p53 impliquée dans l'arrêt de la croissance et l'apoptose. De plus, la protéine p53 suite aux dommages de l'ADN subit des modifications post-traductionnelles résultant en sa stabilisation et son activation en tant que facteur de transcription. C'est ainsi que p53 induit directement la transcription des gènes $p21^{Waf1/Cip1}$ et $14-3-3\sigma$. La protéine 14-

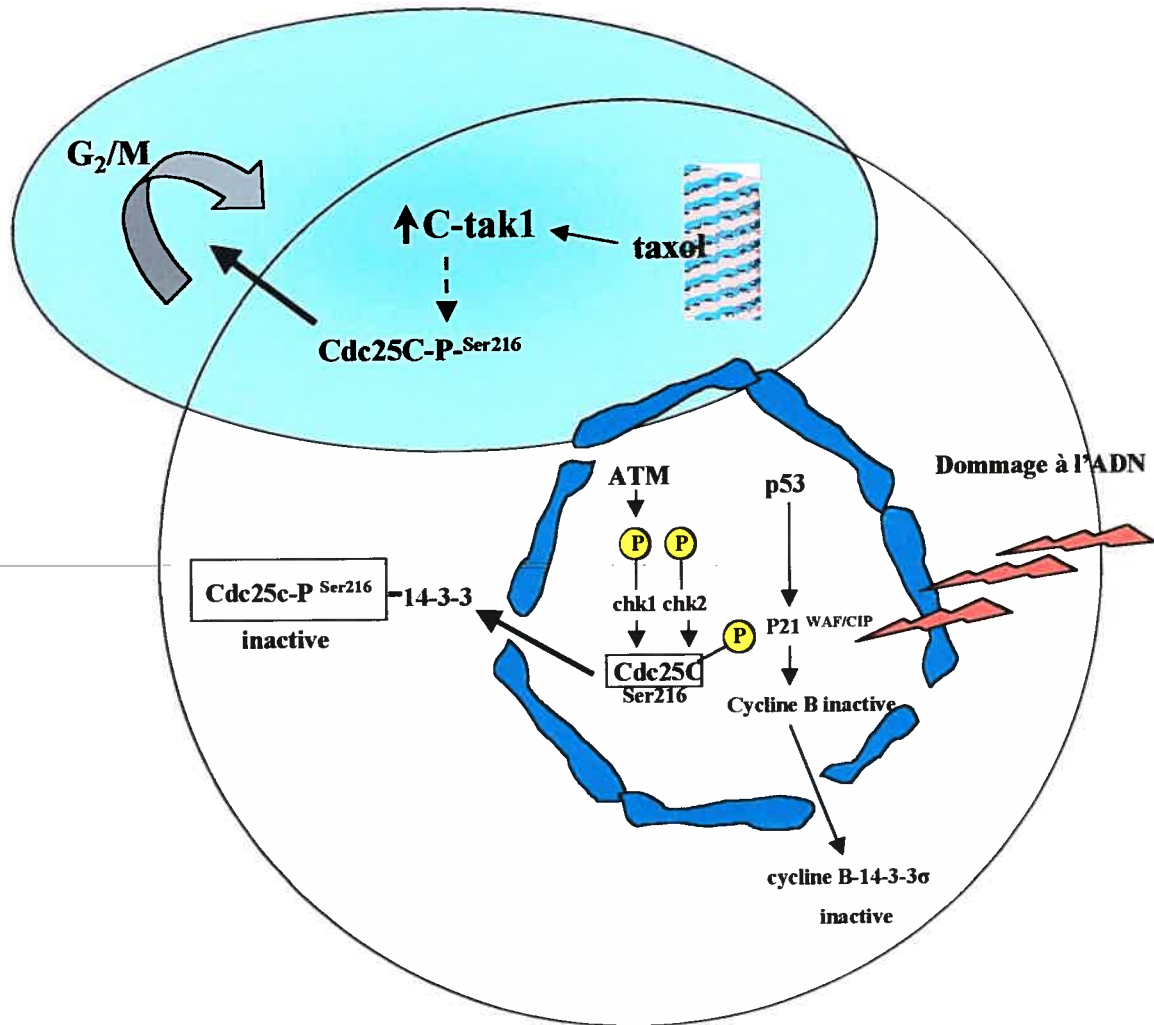


Figure 74. Activation des voies biochimiques reliées au dommage induit à la cellule.

Selon le type de dommage induit à la cellule, il y a l'activation de différents points de surveillance. En présence d'altérations à l'ADN, les voies biochimiques reliées à l'activation de la protéine p53 et des kinases Chk1 et Chk2 sont activées. La stabilisation des microtubules induite par le taxol conduit à l'activation de c-tak1 et sollicite possiblement le point de surveillance G2/M. Les flèche continue représente des voies démontrées et celle en trait discontinu est suggérée par les présents résultats. Tirée et adaptée de Pietenpol, 2002.

3-3 σ ne lie pas Cdc25C mais assure la séquestration du complexe cyclineB/cdc2 dans le cytoplasme (Chan et al., 1999). La protéine p21^{Waf1/Cip1} prévient l'entrée de cdc2 dans le noyau. La fonction de p53 est donc de maintenir l'inhibition du complexe cycline B/cdc2 et d'assurer un contrôle strict du point de surveillance de la phase G2 (Bunz et al., 1998; Chan et al., 1999). La phosphorylation des kinases Chk1 et Chk2 est associée à l'activation de la voie de l'ATM induite par un dommage à l'ADN (Matsuoka et al., 1998). Chk1 et Chk2 phosphorylent la phosphatase Cdc25C (Matsuoka et al., 1998) et permettent la liaison de la protéine 14-3-3. Cette interaction Cdc25C-14-3-3 cause la séquestration de la phosphatase dans le cytoplasme et par conséquent l'inhibition de l'activation de Cdc2 (Lopez-Girona et al., 1999). De la même façon, c-tak1 est une kinase distincte de Chk1 et Chk2 qui phosphorylent la phosphatase Cdc25C sur Ser 216 *in vitro* (Peng et al., 1998), créant ainsi un site pour la liaison de la protéine 14-3-3 (Peng et al., 1998). Cette association Cdc25C/14-3-3 empêche l'activation des complexes cycline B/Cdc2 nécessaire pour la transition de la phase G2 en phase M dans le cycle cellulaire (Woo and Poon, 2003). De plus, c-tak1 est impliquée dans la régulation de KSR1 *via* la phosphorylation sur une Ser 392 créant ainsi un site de liaison pour la protéine 14-3-3 (Muller et al., 2001) Le complexe c-tak1-KSR1-14-3-3 est maintenu dans le cytoplasme. En présence d'un stimulus induit par un FC, la phosphorylation de la Ser 392 est diminuée permettant au KSR1 de se co-localiser avec les molécules de signalisation Ras et Raf au niveau de la membrane cytoplasmique, facilitant ainsi l'activation des voies de signalisation de MEK et de MAPK (Muller et al., 2001). Ces résultats confèrent donc un double rôle de régulation pour c-tak1 dans la progression du cycle cellulaire ainsi que dans les voies de signalisation.

Les stimuli causant l'activation de c-tak1 ne sont pas identifiés. Cependant, son rôle dans l'inactivation de la phosphatase Cdc25C suggère un lien possible avec des signaux reconnus par les kinases Chk1 et Chk2. L'orchestration des fonctions de ces différentes kinases reliées au contrôle de la progression de la cellule de la phase G2 en phase M n'est pas encore clairement élucidée.

La présence du complexe c-tak1-Cdc25C dans les cellules PC-3 et l'appartenance de c-tak1 à la famille des kinases mark suggère un rôle relié à la fonction ou à l'intégrité des microtubules, qui eux-mêmes sont impliqués dans les différentes phases de la mitose (Jordan et al., 1998). C-tak1 étant activée dans les cellules cancéreuses et les cellules normales en division, nous avons vérifié les effets du traitement de ces drogues sur son activité kinasique. Parmi les drogues testées, seul le taxol augmente significativement le niveau de l'activité de c-tak1, après un traitement de 24 h et ce, de façon dose dépendante. L'absence d'activation de la kinase par les alcaloïdes de Vinca et la colchicine pourrait être reliée aux mécanismes d'action des drogues sur les microtubules et/ou les phases du cycle cellulaire qui sont ciblées (Chen and Horwitz, 2002). En effet, selon leur site de liaison aux microtubules, les drogues chimiothérapeutiques affectent différemment leur dynamique. Les alcaloïdes de Vinca (vinblastine, vincristine) se lient aux unités de la tubuline causant une dépolymérisation des microtubules (Jordan et al., 1998) alors que les taxanes se lient au filament de la tubuline et stabilise les microtubules (voir figure 75) (Nogales, 2000). La colchicine, un inhibiteur du cycle cellulaire, a des effets de stabilisation ou de déstabilisation des microtubules selon la dose utilisée. Cette spécificité d'action du taxol sur l'activation de c-tak1 va dans le sens de travaux montrant que les

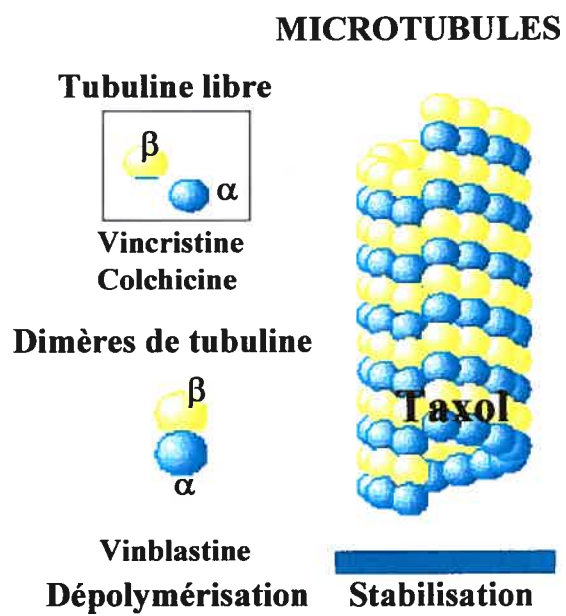


Figure 75. Schématisation des sites de liaison de différentes drogues chimiothérapeutiques associées aux microtubules

cellules *non small* de carcinome du poumon A549 ont une phase mitotique anormale lorsqu'elles sont traitées avec des agents stabilisateurs des microtubules et ne sont pas affectées par les drogues provoquant la dépolymérisation des microtubules (Chen and Horwitz, 2002). L'activation d'intermédiaires de voies de signalisation telles les kinases et phosphatases prend généralement des minutes voire quelques heures puisque les effets transcriptionnels et sur les fonctions cellulaires s'observent souvent dans les 6 et 24 heures qui suivent la stimulation. Dans le cas présent, la longue cinétique d'activation de c-tak1 par le taxol suggère que cette drogue n'active pas directement l'enzyme mais pourrait plutôt exercer son effet au niveau de la protéine, elle-même. Nous avons testé la relation possible avec la synthèse de la protéine en exposant les cellules avec et sans cycloheximide ainsi qu'en présence ou en absence de taxol. La cycloheximide abolit l'effet d'activation de c-tak1 par le taxol. Toutefois, les niveaux équivalents d'activité de c-tak1 dans les cellules en présence ou non de cycloheximide, suggèrent une demi-vie de c-tak1 relativement longue. D'autres études seront nécessaires pour déterminer la demi-vie de cette protéine (synthèse vs dégradation) mais d'autres possibilités doivent aussi être explorées. L'augmentation de l'activité de c-tak1 par le taxol peut provenir d'une augmentation de son expression ou encore, de l'augmentation d'une autre protéine de signalisation. L'effet du taxol sur l'expression des transcrits d'ARN de c-tak1 ou l'utilisation de l'actinomycine D confirmerait l'effet du taxol sur la synthèse de c-tak1. Des études complémentaires seront aussi requises pour définir d'éventuels intermédiaires de signalisation. Ainsi, les effets du taxol sur l'activité de kinases associées aux cyclines ont été montrés dans des cellules ovariennes cancéreuses NIH-OVCAR-3 (Chadebech et al., 2000), où le taxol induit à la fois

une augmentation de l'activité kinasique du complexe cycline B/cdc2 et des niveaux de la protéine et du transcrit de cdc2. Il est connu que le taxol augmente l'expression de différents gènes dont ceux de *c-mos*, de *la cycline B1* (Ling et al., 1998), des molécules pro-apoptotiques Bax et Bak (Liu and Stein, 1997), de plusieurs enzymes jouant un rôle dans l'inflammation et l'apoptose, dont la synthase 2'5'-oligoadénylate, la cyclooxygénase-2 et la kinase I κ B (Moos and Fitzpatrick, 1998). De façon contraire, la drogue diminue la transcription de Bcl-X_L(Liu and Stein, 1997). Bien qu'il ait été rapporté que le niveau de la protéine c-tak1 ne varie pas pendant le cycle cellulaire (Peng et al., 1998) et que son activité demeure stable lors de nos essais de synchronisation du cycle cellulaire, il est possible que les effets d'exposition prolongée des cellules au taxol augmente le niveau d'expression de c-tak1, particulièrement dans les cellules en phase G2/M. L'évaluation du contenu en ADN des cellules vs le niveau d'expression de c-tak1 dans les cellules contrôles et traitées au taxol permettrait de confirmer ce lien. Ainsi, il est possible que l'activation de c-tak1 soit associée à l'arrêt du cycle cellulaire et que la kinase exerce son activité de phosphorylation sur la Ser 216 de la phosphatase Cdc25C. La présence du complexe c-tak1-Cdc25C dans les cellules PC-3, combinée avec la modification du profil de phosphorylation de Cdc25C obtenue en présence de doses variées de taxol, appuient le rôle possible de c-tak1 dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire induit par le taxol (voir figure 74). Le traitement de cellules cancéreuses du poumon de type *non-small* avec des faibles doses de taxol (de l'ordre du nM pendant 24 h) modifie l'état de phosphorylation de la phosphatase Cdc25C (Scatena et al., 1998), leur contenu en ADN, et révèle une accumulation des cellules en mitose résultant de l'arrêt du cycle cellulaire (Tahir

et al., 2001). De pair avec les changements de phosphorylation de la phosphatase Cdc25C, il y a persistance de l'activité des kinases reliées à la mitose *via* le blocage de la dégradation de la cycline B par le protéasome, le prolongement de l'hyperphosphorylation de la protéine anti-apoptotique Bcl2. Tous ces phénomènes conduisent à l'arrêt de la mitose et finalement les cellules se dirigent vers l'apoptose (Scatena et al., 1998).

Par ailleurs, certaines cellules échappent à l'apoptose. Ainsi, parmi les cellules stoppées en phase G2/M suite au traitement par le taxol, certaines après un délai, progressent dans le cycle. La synchronisation des cellules suivie du traitement au taxol dans des phases précises du cycle comme en phase G1/S ou G2/M, permettrait respectivement de distinguer les cellules qui sont bloquées en mitose et se dirigent en apoptose, de celles qui sont arrêtées de façon transitoire et passent outre le point de surveillance de la mitose. Cependant la synchronisation adéquate des cellules PC-3 demeure difficilement réalisable malgré des essais répétés dans des nombreuses conditions. Le tri des cellules par cytométrie en flux avec des marqueurs d'apoptose, des phases du cycle, etc., et leur marquage avec l'anticorps c-tak1 après perméabilisation serait une alternative. La présence de cellules apoptotiques suite au traitement des cellules PC-3 avec le taxol, la vinblastine, la vincristine et la colchicine pendant 24 h signifient que toutes les drogues testées ont une certaine cytotoxicité mais que le taxol sollicite des mécanismes différents par son effet unique sur l'activation de c-tak1. La cellule est temporairement bloquée en phase G2 et peut alors soit se diriger vers l'apoptose ou passer en mitose. Ainsi, l'activité de c-tak1 mesurée dans les cellules peut être déterminante pour les cellules qui meurent ou celles qui survivent. À cet égard, l'absence de modulation de l'activité de c-tak1 suite au traitement des cellules de

chien prostatiques normales avec le taxol, suggère que son activation soit reliée au caractère tumoral des cellules. Dans les cellules PC-3 représentant un modèle de CaP avancé, 1- l'activation préférentielle de c-tak1 par le taxol; 2-la présence de 60% des cellules qui échappent à l'effet inhibiteur de la croissance par les drogues; 3-l'activité basale accrue de c-tak1 dans les cellules les plus tumorigéniques, suggèrent que c-tak1 puisse être impliquée dans les mécanismes de résistance au taxol. L'abolition de l'expression de c-tak1 ou l'introduction d'un dominant négatif sans activité kinasique dans les cellules PC-3 contribueraient à élucider le rôle de c-tak1 dans les effets du taxol. Dans ces conditions d'études, des essais de croissance cellulaire, d'activité kinasique, ainsi que la mesure de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire et de la phosphorylation de Cdc25C en présence de taxol pourraient être déterminées. Suite à de nombreuses études sur les mécanismes de résistance des différentes cellules aux drogues, la problématique suivante a été soulevée à savoir l'insensibilité possible des cellules aux effets du taxol selon leurs positions dans le cycle cellulaire (Abal et al., 2003). Ce concept fut proposé suite à l'analyse des effets obtenus lors de la combinaison de drogues. Le flavopiridol considéré comme un CdkI *via* sa forte affinité pour les Cdk, inhibe directement les Cdk1 (phase G2), Cdk2, Cdk4 et Cdk6 (phase G1) induisant un arrêt du cycle cellulaire (Motwani et al., 1999). Ainsi, l'administration du flavopiridol, suivie du taxol, favorise l'inhibition des cyclines reliées à la phase G1 ainsi que l'activité du complexe cycline B1-cdc2 en phase G2 et empêche les cellules d'entrer en phase M. Ceci se traduit par une baisse de la sensibilité des cellules au taxol (Shah and Schwartz, 2001). La séquence inverse à savoir le traitement du taxol, suivie du flavopiridol, est associée avec une augmentation des cellules en

apoptose (Bible and Kaufmann, 1997). Un effet de synergie en terme d'inhibition de la croissance tumorale est obtenu par le traitement des cellules au taxol, suivi de la cisplatine (Milross et al., 1995). Une autre approche pour contrer la résistance des cellules aux drogues consiste à inhiber le point de surveillance sensible aux dommages d'ADN. Ces points de surveillance sollicitent des voies de signalisation complexes dont le rôle est d'arrêter la progression du cycle pendant la réparation des dommages à l'ADN ou de conduire les cellules en apoptose. Ces points de surveillance sont importants pour le maintien de la stabilité génomique. Le 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) est un agent qui inhibe le point de surveillance G2 dans les tumeurs cancéreuses et par conséquent, sensibilise les cellules cancéreuses aux effets létaux d'autres drogues ou des irradiations affectant l'ADN (Busby et al., 2000). L'inhibition de l'activité des kinases Chk1 ainsi que c-tak1 a été montrée dans une lignée cellulaire d'érythroblastes leucémiques suite au traitement au UCN-01 (Busby et al., 2000). La phosphorylation de Cdc25C sur Ser 216 est un événement en amont de l'arrêt de la phase G2 lors de l'induction de dommages à l'ADN. C-tak1 pourrait être reliée au maintien du point de surveillance sensible aux dommages de l'ADN, bien que la localisation de c-tak1 soit pense-t-on cytoplasmique (Peng et al., 1998) alors que chez le chien, nous l'avons trouvée dans la fraction particulière des prostates métaplasiques. Or, Chk1 et Chk2 sont retrouvées dans le noyau (Shapiro and Harper, 1999). Ces résultats suggèrent que les substrats pour c-tak1 et Chk1 soient les mêmes. Cependant, Chk1 phosphoryle faiblement KSR1 (Muller et al., 2003) alors que sa phosphorylation par c-tak1 maintient Raf dans une conformation inactive qui empêche l'activation de la voie de signalisation MAPK et rend les cellules dans un état quiescent

(Muller et al., 2001). Ceci laisse penser que c-tak1 aurait un rôle distinct de la kinase Chk1 quoique d'autres études soient requises pour établir ce point.

4.3. Potentiel thérapeutique

L'implication de c-tak1 dans les effets du taxol ajoute une nouvelle dimension à l'approche thérapeutique utilisant le taxol. L'élucidation des mécanismes de signalisation reliés à cette activation permettra alors de mieux comprendre les divers effets du taxol et par conséquent d'élaborer des stratégies d'intervention visant à prévenir l'émergence des mécanismes de résistance.

5. Conclusion

Le rôle potentiel de l'endogline dans les effets inhibiteurs du TGF β sur la prolifération des cellules prostatiques nous ont incités d'abord à caractériser son expression dans diverses lignées de cellules prostatiques cancéreuses humaines, initialement dérivées de métastases. Bien que différentes approches aient été abordées, aucune expression franche de l'endogline n'a pu être démontrée. Ces résultats sont en accord avec des travaux récents du laboratoire montrant une expression sélective de l'endogline dans des sous-populations de cellules tumorales des tissus prostatiques de patients souffrant de CaP. En effet, les observations indiquent que l'expression de l'endogline coïncide avec le développement plutôt qu'avec la progression de la maladie où l'expression est alors faible. Les différences d'amplitude des effets du TGF β sur l'inhibition de la croissance des lignées de cellules utilisées étant importantes, la présence de l'endogline, si minime soit-elle, ne peuvent donc pas être attribuées à cette protéine. D'autres mécanismes de régulation doivent être sollicités pour conduire aux effets observés du TGF β sur la prolifération des cellules, et ce possiblement en relation avec leur phénotype.

L'analyse des différents transcrits trouvés par PCR dans les cellules prostatiques de chien a permis d'identifier une nouvelle S/TK: c-tak1. Nous avons déterminé que parmi les membres homologues des kinases de la sous-famille de Mark3, c-tak1 est préférentiellement exprimée dans les cellules prostatiques humaines et canines. A l'aide des anticorps produits dans le laboratoire, nous avons démontré que les niveaux d'activation de

c-tak1 corrélient avec le phénotype cellulaire, l'activité la plus élevée étant observée dans la lignée parentale de cellules de CaP les plus tumorigéniques. Dans les cellules normales, l'activité c-tak1 est induite de pair avec l'acquisition de la capacité des cellules à se diviser. *In vitro*, l'activité de la kinase n'est pas modulée par des FC, tels que certains neuropeptides et l'interleukine-6 connus pour leur action stimulante sur les fonctions des cellules prostatiques. Dans certaines conditions, le TGF β active c-tak1 selon une cinétique compatible avec un effet sur l'activation rapide de l'enzyme. Par ailleurs, les cellules cultivées en présence de FC sériques et au taux de prolifération accru ont une activité plus élevée que les cellules poussant sans sérum. Tel qu'indiqué par la synchronisation partielle des cellules de CaP, le niveau d'activité basale de c-tak1 ne semble pas modifié au cours des phases G1/S et G2/M du cycle cellulaire. En raison de son appartenance à la famille des Mark, nous avons recherché des partenaires potentiels de c-tak1 par l'étude de complexes avec la protéine associée aux microtubules MAP4 ainsi que la tubuline et n'en avons pas mis en évidence. Par ailleurs, une interaction spécifique avec la phosphatase Cdc25C impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire a été démontrée et ce, dans des conditions physiologiques. Afin de moduler l'activité de c-tak1, nous avons eu recours à des drogues chimiothérapeutiques (vinblastine, vincristine, taxol) et agents (colchicine) associés aux microtubules. Nous avons confirmé les effets des drogues sur l'inhibition de croissance des cellules prostatiques cancéreuses humaines et démontré qu'en moyenne 60% des cellules traitées échappent à l'effet des drogues. Parmi les drogues, une action préférentielle du taxol sur l'activité c-tak1 a été observée, impliquant donc cette kinase dans la dynamique des microtubules. L'activation de c-tak1 par le taxol est dose-dépendante et suit une

cinétique plutôt longue (24 h). Pour vérifier la possibilité d'une action indirecte, nous avons testé l'effet de l'inhibition de la synthèse *de novo* des protéines par la cycloheximide. L'effet d'activation de c-tak1 par le taxol a bel et bien été inhibé sans toutefois affecter le niveau d'activité de base de c-tak1. Ceci suggère qu'une protéine intermédiaire puisse médier les effets du taxol sur c-tak1. De plus, l'activation de c-tak1 est associée à un changement du statut de phosphorylation de la phosphatase Cdc25C. Nos observations au niveau cellulaire indiquent une hétérogénéité des effets des drogues. Par exemple, le taxol induit l'apoptose et la nécrose d'une certaine proportion des cellules ainsi que la présence des cellules multinucléées parmi d'autres cellules à l'aspect normal. Ceci suggère d'une part que certaines cellules meurent alors que d'autre part, d'autres passent outre les points de surveillance des phases M et post-mitotique. Or, l'activité mesurée de c-tak1 reflète l'effet global sur toutes les cellules. Ces résultats ouvrent un volet important dans la recherche des effets du taxol sur les diverses fonctions cellulaires en dévoilant une nouvelle molécule de signalisation activée par cette drogue. Ainsi, il est possible que c-tak1 soit une cible du taxol et que dans cette éventualité la compréhension des mécanismes qui y sont reliés soit primordiale afin d'optimiser le traitement des patients atteints de CaP avancé.

Perspectives

L'endogline ne peut expliquer les effets d'inhibition de la croissance des lignées prostatiques humaines cancéreuses par le TGF β . Ces lignées étant d'origine métastatiques, elles représenteraient un modèle qui reproduit fidèlement la baisse observée dans les tumeurs chez les patients avec un CaP avancé. L'ADNc de l'endogline pourrait donc servir pour vérifier l'effet de la surexpression de la protéine sur la modulation des effets du TGF β

tant au niveau de la prolifération que de l'adhésion et motilité cellulaires que sur l'activation probable de c-tak1. En plus d'être un marqueur d'angiogenèse, l'endogline pourrait avoir un rôle potentiel dans la régulation de l'activité de c-tak1 par le TGF β . La possibilité d'une fonction intrinsèque à l'endogline elle-même doit aussi être considérée.

Le clonage du gène *c-tak1* dans une librairie d'ADNc de cellules prostatiques de chien et par la suite dans les cellules PC-3 a soulevé l'intérêt par sa similarité avec une kinase p78 modulée par le TGF β . La production d'anticorps qui reconnaissent la protéine native active ont permis de démontrer la relation entre l'activité c-tak1 et le potentiel tumorigénique des cellules de CaP mais l'expression de la protéine n'a pu être étudiée. Une avenue intéressante serait de produire un anticorps qui reconnaît la protéine dénaturée. Théoriquement et sachant que seule c-tak1 est exprimée dans les systèmes prostatiques étudiés, le choix de la séquence pourrait se situer en aval des acides aminés 20-39 pour être plus immunogénique (profil d'hydrophobicité). Ces anticorps pourraient faciliter les études concernant sa distribution intracellulaire, les effets d'activation ou d'inhibition de l'activité, et permettre d'associer l'activation avec des modifications proportionnelles dans son expression. De plus, il permettrait de relier *in situ*, son niveau d'expression et le caractère tumorigénique des tissus prostatiques cancéreux humains en relation avec d'autres marqueurs, notamment les protéines kinases Fer et FAK ou l'endogline qui sont présentement sous investigation au laboratoire.

Peu de stimuli sont connus pour activer c-tak1. Le TGF β demeure un candidat intéressant et mériterait d'être testé dans des systèmes où il est possible d'induire des niveaux contrôlés d'expression de c-tak1 et ainsi pallier les limites expérimentales observées lors des essais

de modulation d'activité c-tak1 avec les FC. Parmi les possibilités, mentionnons le recours au système inductible Tet-On où la surexpression de c-tak1 ne semble pas modifier significativement les caractéristiques de croissance des cellules et l'utilisation d'ODNs antisens. Des partenaires de signalisation pourraient être identifiés par l'utilisation d'un système double hybride dans les cellules de mammifères, l'idéal étant de préserver le contexte cellulaire particulier du CaP. L'effet d'activation de c-tak1 par le taxol suscite sans contredit un intérêt majeur pour l'implication thérapeutique qu'il représente. Diverses avenues semblent prometteuses. L'une est la recherche des partenaires de signalisation associés à l'activation de c-tak1, possiblement couplés à la phosphorylation de Cdc25C, expliquant l'effet du taxol étant donné les niveaux équivalents d'activité c-tak1 de base des cellules en présence ou non d'inhibiteur de synthèse protéique. L'utilisation de l'actinomycine D et d'antisens ou de petits ARN interférents seraient appropriés. Des séquences d'antisens ont déjà été synthétisées et seront testées sur l'activation de c-tak1 dans les cellules PC-3, traitées ou non avec le taxol. La récupération de milieu conditionné de cellules sous l'action ou non du taxol ajouté aux cellules non traitées pourrait permettre de vérifier si le taxol induit une protéine sécrétée et requise pour activer c-tak1. Dans les cellules PC-3, l'abolition de l'effet du taxol *via* l'introduction de c-tak1 mutée dans son domaine kinasique, confirmerait la spécificité d'action du taxol. Une autre avenue serait d'identifier quelles populations de cellules sujettes à l'action du taxol ont une activité c-tak1 augmentée. Le cytométrie de flux et le tri des cellules avec l'utilisation de marqueurs fluorescents du cycle cellulaire et de la mort cellulaire et des cellules perméabilisées pour cibler c-tak1 et Cdc25C dans les cellules nous apparaît comme étant des approches

prometteuses. De plus, il serait intéressant d'étudier la phosphorylation de Cdc25C, au moyen d'anticorps spécifiques correspondants aux différents résidus phosphorylés de Cdc25C ainsi que des anticorps spécifiques aux phosphoépitopes mitotiques. Si l'augmentation de l'activité c-tak1 est reliée à l'accumulation des cellules en phase G2/M, l'utilisation d'un inhibiteur des Cdk (tel que le purvalanol A) ou d'un agent stimulant la sortie des cellules de la mitose (comme le 2-AP) permettraient de valider les effets observés sur c-tak1 (augmentation d'activité, synthèse, baisse de dégradation) par le taxol. Dans un contexte à plus long terme, si c-tak1 est effectivement une cible du taxol et que l'activation de c-tak1 contribue aux mécanismes de résistance des cellules aux drogues, l'approche thérapeutique face à l'utilisation du taxol, particulièrement dans les CaP avancés, pourrait être modifiée.

6. Bibliographie

- Abal,M., Andreu,J.M., and Barasoain,I. (2003). Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr. Cancer Drug Targets*. 3, 193-203.
- Abreu,J.G., Ketpura,N.I., Reversade,B., and De Robertis,E.M. (2002). Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell Biol.* 4, 599-604.
- Adler,H.L., McCurdy,M.A., Kattan,M.W., Timme,T.L., Scardino,P.T., and Thompson,T.C. (1999). Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J. Urol.* 161, 182-187.
- Ahmad,F.J., Yu,W., McNally,F.J., and Baas,P.W. (1999). An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J. Cell Biol.* 145, 305-315.
- Akhmanova,A., Hoogenraad,C.C., Drabek,K., Stepanova,T., Dortland,B., Verkerk,T., Vermeulen,W., Burgering,B.M., De Zeeuw,C.I., Grosveld,F., and Galjart,N. (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104, 923-935.
- Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts, K., and Watson,J.D. (1994). *Molecular biology of the cell.*, Garland Publishing, ed. Taylor and Francis), pp. 1-1616.
- Allard,P., Beaulieu,P., Aprikian,A., and Chevalier,S. (2000a). Bombesin modulates the association of Src with a nuclear 110-kd protein expressed in dividing prostate cells. *J. Androl* 21, 367-375.
- Allard,P., Zoubeydi,A., Nguyen,L.T., Tessier,S., Tanguay,S., Chevrette,M., Aprikian,A., and Chevalier,S. (2000b). Links between Fer tyrosine kinase expression levels and prostate cell proliferation. *Mol. Cell Endocrinol.* 159, 63-77.
- Altomonte,M., Montagner,R., Fonsatti,E., Colizzi,F., Cattarossi,I., Brasoveanu,L.I., Nicotra,M.R., Cattelan,A., Natali,P.G., and Maio,M. (1996). Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br. J. Cancer* 74, 1586-1591.
- Anderton,B.H. (1993). Expression and processing of pathologic proteins in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 3 *Spec No*, 227-237.
- Anidjar,M., Villette,J.M., Devauchelle,P., Delisle,F., Cotard,J.P., Billotey,C., Cochand-Priollet,B., Copin,H., Barnoux,M., Triballeau,S., Rain,J.D., Fiet,J., Teillac,P., Berthon,P., and Cussenot,O. (2001). In vivo model mimicking natural history of dog prostate cancer using DPC-1, a new canine prostate carcinoma cell line. *Prostate* 46, 2-10.

- Aprikian,A.G., Cordon-Cardo,C., Fair,W.R., and Reuter,V.E. (1993). Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma. *Cancer* 71, 3952-3965.
- Aprikian,A.G., Fair,W.R., Reuter,V.E., Sogani,P., Herr,H., Russo,P., and Sheinfeld,J. (1994). Experience with neoadjuvant diethylstilboestrol and radical prostatectomy in patients with locally advanced prostate cancer. *Br. J. Urol.* 74, 630-636.
- Aprikian,A.G., Han,K., Chevalier,S., Bazinet,M., and Viallet,J. (1996). Bombesin specifically induces intracellular calcium mobilization via gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.* 16, 297-306.
- Aprikian,A.G., Han,K., Guy,L., Landry,F., Begin,L.R., and Chevalier,S. (1998). Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. *Prostate Suppl* 8, 52-61.
- Aprikian,A.G., Tremblay,L., Han,K., and Chevalier,S. (1997). Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int. J. Cancer* 72, 498-504.
- Arthur,H.M., Ure,J., Smith,A.J., Renforth,G., Wilson,D.I., Torsney,E., Charlton,R., Parums,D.V., Jowett,T., Marchuk,D.A., Burn,J., and Diamond,A.G. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev. Biol.* 217, 42-53.
- Ashkenazi,A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* 2, 420-430.
- Atfi,A., Drobetsky,E., Boissonneault,M., Chapdelaine,A., and Chevalier,S. (1994). Transforming growth factor beta down-regulates Src family protein tyrosine kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 269, 30688-30693.
- Atfi,A., Lepage,K., Allard,P., Chapdelaine,A., and Chevalier,S. (1995). Activation of a serine/threonine kinase signaling pathway by transforming growth factor type beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12110-12114.
- Aumuller,G. (1989). Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat. Embryol. (Berl)* 179, 519-531.
- Bai,R.Y., Koester,C., Ouyang,T., Hahn,S.A., Hammerschmidt,M., Peschel,C., and Duyster,J. (2002). SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 181-190.
- Barbara,N.P., Wrana,J.L., and Letarte,M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.* 274, 584-594.

Bellon,T., Corbi,A., Lastres,P., Cales,C., Cebrian,M., Vera,S., Cheifetz,S., Massague,J., Letarte,M., and Bernabeu,C. (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 23, 2340-2345.

Belmont,L.D. and Mitchison,T.J. (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* 84, 623-631.

Ben Josef,E., Porter,A.T., Han,S., Mertens,W., Chuba,P., Fontana,J., and Hussain,M. (2001). Neoadjuvant estramustine and etoposide followed by concurrent estramustine and definitive radiotherapy for locally advanced prostate cancer: feasibility and preliminary results. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 49, 699-703.

Berry,R., Schaid,D.J., Smith,J.R., French,A.J., Schroeder,J.J., McDonnell,S.K., Peterson,B.J., Wang,Z.Y., Carpten,J.D., Roberts,S.G., Tester,D.J., Blute,M.L., Trent,J.M., and Thibodeau,S.N. (2000). Linkage analyses at the chromosome 1 loci 1q24-25 (HPC1), 1q42.2-43 (PCAP), and 1p36 (CAPB) in families with hereditary prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 539-546.

Berry,S.J., Coffey,D.S., Walsh,P.C., and Ewing,L.L. (1984). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urol.* 132, 474-479.

Berthon,P., Valeri,A., Cohen-Akenine,A., Drelon,E., Paiss,T., Wöhr,G., Latil,A., Millasseau,P., Mellah,I., Cohen,N., Blanche,H., Bellane-Chantelot,C., Demenais,F., Teillac,P., Le Duc,A., de Petroni,R., Hautmann,R., Chumakov,I., Bachner,L., Maitland,N.J., Lidereau,R., Vogel,W., Fournier,G., Mangin,P., Cussenot,O., and . (1998). Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1416-1424.

Bessone,S., Vidal,F., Le Bouc,Y., Epelbaum,J., Bluët-Pajot,M.T., and Darmon,M. (1999). EMK protein kinase-null mice: dwarfism and hypofertility associated with alterations in the somatotrope and prolactin pathways. *Dev. Biol.* 214, 87-101.

Bible,K.C. and Kaufmann,S.H. (1997). Cytotoxic synergy between flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and various antineoplastic agents: the importance of sequence of administration. *Cancer Res.* 57, 3375-3380.

Blagosklonny,M.V., Dixon,S.C., and Figg,W.D. (2000). Efficacy of microtubule-active drugs followed by ketoconazole in human metastatic prostate cancer cell lines. *J. Urol.* 163, 1022-1026.

Bohm,H., Brinkmann,V., Drab,M., Henske,A., and Kurzchalia,T.V. (1997). Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr. Biol.* 7, 603-606.

- Boissonneault,M., Chapdelaine,A., and Chevalier,S. (1995). The enhancement by pervanadate of tyrosine phosphorylation on prostatic proteins occurs through the inhibition of membrane-associated tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biochem.* 153, 139-144.
- Bologna,M., Festuccia,C., Muzi,P., Biordi,L., and Ciomei,M. (1989). Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 63, 1714-1720.
- 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.
- Bonkhoff,H., Stein,U., and Remberger,K. (1994a). Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum. Pathol.* 25, 42-46.
- Bonkhoff,H., Stein,U., and Remberger,K. (1994b). The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 24, 114-118.
- Bookstein,R., MacGrogan,D., Hilsenbeck,S.G., Sharkey,F., and Allred,D.C. (1993). p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res.* 53, 3369-3373.
- Borre,M., Nerstrom,B., and Overgaard,J. (2000). Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Clin. Cancer Res.* 6, 1882-1890.
- Bourassa,C., Nguyen,L.T., Durocher,Y., Roberts,K.D., and Chevalier,S. (1991a). Prostatic epithelial cells in culture: phosphorylation of protein tyrosyl residues and tyrosine protein kinase activity. *J. Cell Biochem.* 46, 291-301.
- Bourassa,C., Nguyen,L.T., Roberts,K.D., and Chevalier,S. (1991b). Characterization of protein-tyrosine kinase activity in the canine prostate. *Biochem. Cell Biol.* 69, 146-153.
- Bova,G.S., Partin,A.W., Isaacs,S.D., Carter,B.S., Beaty,T.L., Isaacs,W.B., and Walsh,P.C. (1998). Biological aggressiveness of hereditary prostate cancer: long-term evaluation following radical prostatectomy. *J. Urol.* 160, 660-663.
- Bowen,C., Birrer,M., and Gelmann,E.P. (2002). Retinoblastoma protein-mediated apoptosis after gamma-irradiation. *J. Biol. Chem.* 277, 44969-44979.
- Brawer,M.K., Bigler,S.A., Sohlberg,O.E., Nagle,R.B., and Lange,P.H. (1991). Significance of prostatic intraepithelial neoplasia on prostate needle biopsy. *Urology* 38, 103-107.
- Brawley,O.W., Knopf,K., and Thompson,I. (1998). The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. *Semin. Urol. Oncol.* 16, 193-201.

- Brewer,C.A., Setterdahl,J.J., Li,M.J., Johnston,J.M., Mann,J.L., and McAsey,M.E. (2000). Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet. Gynecol.* *96*, 224-228.
- Brodin,G., ten Dijke,P., Funa,K., Heldin,C.H., and Landstrom,M. (1999). Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res.* *59*, 2731-2738.
- Brown,C.B., Boyer,A.S., Runyan,R.B., and Barnett,J.V. (1999). Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* *283*, 2080-2082.
- Brown,T.R., Lubahn,D.B., Wilson,E.M., Joseph,D.R., French,F.S., and Migeon,C.J. (1988). Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 8151-8155.
- Buchberger,A., Valencia,A., McMacken,R., Sander,C., and Bukau,B. (1994). The chaperone function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171. *EMBO J.* *13*, 1687-1695.
- Bulavin,D.V., Higashimoto,Y., Demidenko,Z.N., Meek,S., Graves,P., Phillips,C., Zhao,H., Moody,S.A., Appella,E., Piwnica-Worms,H., and Fornace,A.J., Jr. (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nat. Cell Biol.* *5*, 545-551.
- Bulinski,J.C. and Borisy,G.G. (1980). Widespread distribution of a 210,000 mol wt microtubule-associated protein in cells and tissues of primates. *J. Cell Biol.* *87*, 802-808.
- Bunz,F., Dutriaux,A., Lengauer,C., Waldman,T., Zhou,S., Brown,J.P., Sedivy,J.M., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* *282*, 1497-1501.
- Busby,E.C., Leistritz,D.F., Abraham,R.T., Karnitz,L.M., and Sarkaria,J.N. (2000). The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hChk1. *Cancer Res.* *60*, 2108-2112.
- Bylund,A., Zhang,J.X., Bergh,A., Damber,J.E., Widmark,A., Johansson,A., Adlercreutz,H., Aman,P., Shepherd,M.J., and Hallmans,G. (2000). Rye bran and soy protein delay growth and increase apoptosis of human LNCaP prostate adenocarcinoma in nude mice. *Prostate* *42*, 304-314.
- Cadigan,K.M. and Nusse,R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* *11*, 3286-3305.
- Campbell,C.L., Savarese,D.M., Quesenberry,P.J., and Savarese,T.M. (1999). Expression of multiple angiogenic cytokines in cultured normal human prostate epithelial cells: predominance of vascular endothelial growth factor. *Int. J. Cancer* *80*, 868-874.

- Cance, W.G., Craven, R.J., Weiner, T.M., and Liu, E.T. (1993). Novel protein kinases expressed in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 54, 571-577.
- Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P., and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* 115, 4727-4734.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64, 281-302.
- Carson, C., III and Rittmaster, R. (2003). The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61, 2-7.
- Carter, H.B. and Isaacs, J.T. (1988). Experimental and theoretical basis for hormonal treatment of prostatic cancer. *Semin. Urol.* 6, 262-268.
- Catz, S.D. and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20, 7342-7351.
- Catz, S.D. and Johnson, J.L. (2003). BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis*. 8, 29-37.
- Chadebech, P., Truchet, I., Brichese, L., and Valette, A. (2000). Up-regulation of cdc2 protein during paclitaxel-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* 87, 779-786.
- Chan, J.M., Giovannucci, E., Andersson, S.O., Yuen, J., Adami, H.O., and Wolk, A. (1998). Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer (Sweden). *Cancer Causes Control* 9, 559-566.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616-620.
- Chang, H., Brown, C.W., and Matzuk, M.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr. Rev.* 23, 787-823.
- Chang, W., Gruber, D., Chari, S., Kitazawa, H., Hamazumi, Y., Hisanaga, S., and Bulinski, J.C. (2001). Phosphorylation of MAP4 affects microtubule properties and cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 114, 2879-2887.
- Charest, N.J., Zhou, Z.X., Lubahn, D.B., Olsen, K.L., Wilson, E.M., and French, F.S. (1991). A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Mol. Endocrinol.* 5, 573-581.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 19027-19030.

- Cheifetz,S., Like,B., and Massague,J. (1986). Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* *261*, 9972-9978.
- Chen,J.G. and Horwitz,S.B. (2002). Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Res.* *62*, 1935-1938.
- Chevalier,S., Bleau,G., Roberts,K.D., and Chapdelaine,A. (1980). Characterization of canine prostatic cells from normal and hyperplastic glands. *Mol. Cell Endocrinol.* *20*, 59-70.
- Chevalier,S., Bleau,G., Roberts,K.D., and Chapdelaine,A. (1981). Proliferation and differentiation of canine prostatic epithelial cells in culture. *Mol. Cell Endocrinol.* *24*, 195-208.
- Chevalier,S., Bleau,G., Roberts,K.D., and Chapdelaine,A. (1984). Nonsteroidal serum factors involved in the regulation of the proliferation of canine prostatic epithelial cells in culture. *Prostate* *5*, 503-512.
- Chevalier,S. and Chapdelaine,A. (1988). Requirements for attachment and subsequent growth of canine prostatic epithelial cells in culture. *Prostate* *12*, 231-241.
- Chevalier,S., Defoy,I., Lacoste,J., Hamel,L., Guy,L., Begin,L.R., and Aprikian,A.G. (2002). Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* *189*, 169-179.
- Chevalier,S., McKercher,G., and Chapdelaine,A. (1991). Serum and prostatic growth-promoting factors for steroid-independent epithelial cells of adult dog prostate. *Prostate* *19*, 207-220.
- Chevalier,S., McKercher,G., and Chapdelaine,A. (1993). 150-kDa proteins in dog serum bind 1.5-kDa growth-promoting factors for androgen-independent canine prostatic epithelial cells. *J. Androl* *14*, 411-418.
- Chevalier,S., Aprikian,A.G., Beaugard,G., Defoy,I., Nguyen,L.T., Guenette,R.S., Tenniswood,N., and Chapdelaine,A. (1996). Action, localization and structure-fonction relationship of growth factors and their receptors in the prostate. *Reproductive medicine review* *5*, 73-105.
- Christensen,M.M. and Bruskewitz,R.C. (1990). Clinical manifestations of benign prostatic hyperplasia and indications for therapeutic intervention. *Urol. Clin. North Am.* *17*, 509-516.
- Chung,T.D., Yu,J.J., Spiotto,M.T., Bartkowski,M., and Simons,J.W. (1999). Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate* *38*, 199-207.

- Cipriano,S.C. and Chen,Y.Q. (1998). Insensitivity to growth inhibition by TGF-beta1 correlates with a lack of inhibition of the CDK2 activity in prostate carcinoma cells. *Oncogene* 17, 1549-1556.
- Clark,P.E., Peereboom,D.M., Dreicer,R., Levin,H.S., Clark,S.B., and Klein,E.A. (2001). Phase II trial of neoadjuvant estramustine and etoposide plus radical prostatectomy for locally advanced prostate cancer. *Urology* 57, 281-285.
- Colombel,M., Symmans,F., Gil,S., O'Toole,K.M., Chopin,D., Benson,M., Olsson,C.A., Korsmeyer,S., and Buttyan,R. (1993). Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am. J. Pathol.* 143, 390-400.
- Colombel,M., Vacherot,F., Diez,S.G., Fontaine,E., Buttyan,R., and Chopin,D. (1998). Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Urol.* 82, 380-385.
- Cornell,K.K., Bostwick,D.G., Cooley,D.M., Hall,G., Harvey,H.J., Hendrick,M.J., Pauli,B.U., Render,J.A., Stoica,G., Sweet,D.C., and Waters,D.J. (2000). Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. *Prostate* 45, 173-183.
- Craven,R.J., Cance,W.G., and Liu,E.T. (1995). The nuclear tyrosine kinase Rak associates with the retinoblastoma protein pRb. *Cancer Res.* 55, 3969-3972.
- Cronauer,M.V., Hittmair,A., Eder,I.E., Hobisch,A., Culig,Z., Ramoner,R., Zhang,J., Bartsch,G., Reissigl,A., Radmayr,C., Thurnher,M., and Klocker,H. (1997). Basic fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate. *Prostate* 31, 223-233.
- Culig,Z., Hobisch,A., Cronauer,M.V., Radmayr,C., Trapman,J., Hittmair,A., Bartsch,G., and Klocker,H. (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, 5474-5478.
- Cunha,G.R., Wang,Y.Z., Hayward,S.W., and Risbridger,G.P. (2001). Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* 13, 285-296.
- Cymerman,U., Vera,S., Karabegovic,A., Abdalla,S., and Letarte,M. (2003). Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum. Mutat.* 21, 482-492.
- D'Amato,R.J., Loughnan,M.S., Flynn,E., and Folkman,J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4082-4085.
- Daliani,D.D., Assikis,V., Tu,S.M., Papandreou,C.N., Pagliaro,L.C., Holtkamp,T., Wang,X., Thall,P.F., and Logothetis,C.J. (2003). Phase II trial of cyclophosphamide, vincristine, and

dexamethasone in the treatment of androgen-independent prostate carcinoma. *Cancer* 97, 561-567.

Danielpour,D., Kadomatsu,K., Anzano,M.A., Smith,J.M., and Sporn,M.B. (1994). Development and characterization of nontumorigenic and tumorigenic epithelial cell lines from rat dorsal-lateral prostate. *Cancer Res.* 54, 3413-3421.

Davidson,D., Bostwick,D.G., Qian,J., Wollan,P.C., Oesterling,J.E., Rudders,R.A., Siroky,M., and Stilmant,M. (1995). Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: predictive accuracy in needle biopsies. *J. Urol.* 154, 1295-1299.

De Marzo,A.M., Nelson,W.G., Meeker,A.K., and Coffey,D.S. (1998). Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J. Urol.* 160, 2381-2392.

DeKlerk,D.P., Coffey,D.S., Ewing,L.L., McDermott,I.R., Reiner,W.G., Robinson,C.H., Scott,W.W., Strandberg,J.D., Talalay,P., Walsh,P.C., Wheaton,L.G., and Zirkin,B.R. (1979). Comparison of spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. *J. Clin. Invest* 64, 842-849.

Dell,K.R. (2003). Dynactin polices two-way organelle traffic. *J. Cell Biol.* 160, 291-293.

Denis,L.J., Carnelro de Moura,J.L., Bono,A., Sylvester,R., Whelan,P., Newling,D., and Depauw,M. (1993). Goserelin acetate and flutamide versus bilateral orchiectomy: a phase III EORTC trial (30853). EORTC GU Group and EORTC Data Center. *Urology* 42, 119-129.

Derynck,R., Zhang,Y., and Feng,X.H. (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95, 737-740.

di Sant'Agnese,P.A. and Cockett,A.T. (1996). Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 78, 357-361.

DiPaola,R.S., Rafi,M.M., Vyas,V., Toppmeyer,D., Rubin,E., Patel,J., Goodin,S., Medina,M., Medina,P., Zamek,R., Zhang,C., White,E., Gupta,E., and Hait,W.N. (1999). Phase I clinical and pharmacologic study of 13-cis-retinoic acid, interferon alfa, and paclitaxel in patients with prostate cancer and other advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 17, 2213-2218.

Dong,C., Li,Z., Alvarez,R., Jr., Feng,X.H., and Goldschmidt-Clermont,P.J. (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol. Cell* 5, 27-34.

Dong,J.T., Suzuki,H., Pin,S.S., Bova,G.S., Schalken,J.A., Isaacs,W.B., Barrett,J.C., and Isaacs,J.T. (1996). Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res.* 56, 4387-4390.

- Drechsel,D.N., Hyman,A.A., Cobb,M.H., and Kirschner,M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* 3, 1141-1154.
- Drewes,G., Ebnet,A., and Mandelkow,E.M. (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.* 23, 307-311.
- Drewes,G., Ebnet,A., Preuss,U., Mandelkow,E.M., and Mandelkow,E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297-308.
- Drewes,G., Trinczek,B., Illenberger,S., Biernat,J., Schmitt-Ulms,G., Meyer,H.E., Mandelkow,E.M., and Mandelkow,E. (1995). Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.* 270, 7679-7688.
- Dubois,C.M., Laprise,M.H., Blanchette,F., Gentry,L.E., and Leduc,R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* 270, 10618-10624.
- Duff,S.E., Li,C., Garland,J.M., and Kumar,S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17, 984-992.
- Durocher,Y., Chapdelaine,A., and Chevalier,S. (1992). Identification of cytosolic protein tyrosine kinases of human prostate by renaturation after SDS/PAGE. *Biochem. J.* 284 (Pt 3), 653-658.
- Durocher,Y. and Chevalier,S. (1994). Detection of phosphotyrosine in glutaraldehyde-crosslinked and alkali-treated phosphoproteins following their partial acid hydrolysis in gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 28, 101-113.
- Ebnet,A., Drewes,G., Mandelkow,E.M., and Mandelkow,E. (1999). Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 44, 209-224.
- Ehara,H., Koji,T., Deguchi,T., Yoshii,A., Nakano,M., Nakane,P.K., and Kawada,Y. (1995). Expression of estrogen receptor in diseased human prostate assessed by non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemistry. *Prostate* 27, 304-313.
- Eisenberger,M.A., Blumenstein,B.A., Crawford,E.D., Miller,G., McLeod,D.G., Loehrer,P.J., Wilding,G., Sears,K., Culkin,D.J., Thompson,I.M., Jr., Bueschen,A.J., and Lowe,B.A. (1998). Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 339, 1036-1042.

Elzanaty,S., Richthoff,J., Malm,J., and Giwercman,A. (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum. Reprod.* *17*, 2904-2911.

Espinosa,L. and Navarro,E. (1998). Human serine/threonine protein kinase EMK1: genomic structure and cDNA cloning of isoforms produced by alternative splicing. *Cytogenet. Cell Genet.* *81*, 278-282.

Evangelou,A., Jindal,S.K., Brown,T.J., and Letarte,M. (2000). Down-regulation of transforming growth factor beta receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* *60*, 929-935.

Farnsworth,W.E. (1999). Estrogen in the etiopathogenesis of BPH. *Prostate* *41*, 263-274.

Feng,Y., Hodge,D.R., Palmieri,G., Chase,D.L., Longo,D.L., and Ferris,D.K. (1999). Association of polo-like kinase with alpha-, beta- and gamma-tubulins in a stable complex. *Biochem. J.* *339* (Pt 2), 435-442.

Fernandez-Ruiz,E., St Jacques,S., Bellon,T., Letarte,M., and Bernabeu,C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet. Cell Genet.* *64*, 204-207.

Finnegan,N.M., Curtin,J.F., Prevost,G., Morgan,B., and Cotter,T.G. (2001). Induction of apoptosis in prostate carcinoma cells by BH3 peptides which inhibit Bak/Bcl-2 interactions. *Br. J. Cancer* *85*, 115-121.

Fleshner,N.E. and Klotz,L.H. (1998). Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer Metastasis Rev.* *17*, 325-330.

Folkman,J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* *1*, 27-31.

Fonsatti,E., Del Vecchio,L., Altomonte,M., Sigalotti,L., Nicotra,M.R., Coral,S., Natali,P.G., and Maio,M. (2001). Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J. Cell Physiol* *188*, 1-7.

Fonsatti,E., Jekunen,A.P., Kairemo,K.J., Coral,S., Snellman,M., Nicotra,M.R., Natali,P.G., Altomonte,M., and Maio,M. (2000). Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin. Cancer Res.* *6*, 2037-2043.

Fowler,J.E., Jr., Lau,J.L., Ghosh,L., Mills,S.E., and Mounzer,A. (1988). Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: an immunohistochemical study. *J. Urol.* *139*, 857-861.

Frea,B., Annoscia,S., Stanta,G., Lozzi,C., and Carmignani,G. (1987). Correlation between liver cirrhosis and benign prostatic hyperplasia: a morphological study. *Urol. Res.* *15*, 311-314.

Friedland,D., Cohen,J., Miller,R., Jr., Voloshin,M., Gluckman,R., Lembersky,B., Zidar,B., Keating,M., Reilly,N., and Dimitt,B. (1999). A phase II trial of docetaxel (Taxotere) in hormone-refractory prostate cancer: correlation of antitumor effect to phosphorylation of Bcl-2. *Semin. Oncol.* *26*, 19-23.

Fudge,K., Wang,C.Y., and Stearns,M.E. (1994). Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor alpha and beta receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas. *Mod. Pathol.* *7*, 549-554.

Furuhashi,M., Yagi,K., Yamamoto,H., Furukawa,Y., Shimada,S., Nakamura,Y., Kikuchi,A., Miyazono,K., and Kato,M. (2001). Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* *21*, 5132-5141.

Garnier,C., Barbier,P., Gilli,R., Lopez,C., Peyrot,V., and Briand,C. (1998). Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *250*, 414-419.

Garraway,L.A., Lin,D., Signoretti,S., Waltregny,D., Dilks,J., Bhattacharya,N., and Loda,M. (2003). Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate* *55*, 206-218.

Geldof,A.A., Mastbergen,S.C., Henrar,R.E., and Faircloth,G.T. (1999). Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using in vitro assays. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *44*, 312-318.

Gentry,L.E., Lioubin,M.N., Purchio,A.F., and Marquardt,H. (1988). Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol. Cell Biol.* *8*, 4162-4168.

Gibbs,M., Stanford,J.L., McIndoe,R.A., Jarvik,G.P., Kolb,S., Goode,E.L., Chakrabarti,L., Schuster,E.F., Buckley,V.A., Miller,E.L., Brandzel,S., Li,S., Hood,L., and Ostrander,E.A. (1999). Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 776-787.

Giovannucci,E., Rimm,E.B., Liu,Y., Stampfer,M.J., and Willett,W.C. (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 391-398.

Gleason,D.F. and Mellinger,G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* *111*, 58-64.

Gleave,M., Tolcher,A., Miyake,H., Nelson,C., Brown,B., Beraldi,E., and Goldie,J. (1999). Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model. *Clin. Cancer Res.* 5, 2891-2898.

Gleave,M.E., Sato,N., Goldenberg,S.L., Stothers,L., Bruchovsky,N., and Sullivan,L.D. (1997). Neoadjuvant androgen withdrawal therapy decreases local recurrence rates following tumor excision in the Shionogi tumor model. *J. Urol.* 157, 1727-1730.

Goldstein,N.I., Prewett,M., Zuklys,K., Rockwell,P., and Mendelsohn,J. (1995). Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 1, 1311-1318.

Gooren,L.J. (1998). Endocrine aspects of ageing in the male. *Mol. Cell Endocrinol.* 145, 153-159.

Gougos,A. and Letarte,M. (1988). Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J. Immunol.* 141, 1934-1940.

Gougos,A. and Letarte,M. (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265, 8361-8364.

Green,D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94, 695-698.

Gregory,C.W., Hamil,K.G., Kim,D., Hall,S.H., Pretlow,T.G., Mohler,J.L., and French,F.S. (1998). Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer is associated with increased expression of androgen-regulated genes. *Cancer Res.* 58, 5718-5724.

Griffiths K (1996). *Textbook of Benign Prostatic Hyperplasia.*

Gronberg,H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 361, 859-864.

Gruber,D., Faire,K., and Bulinski,J.C. (2001). Abundant expression of the microtubule-associated protein, ensconsin (E-MAP-115), alters the cellular response to Taxol. *Cell Motil. Cytoskeleton* 49, 115-129.

Guerrero-Esteo,M., Sanchez-Elsner,T., Letamendia,A., and Bernabeu,C. (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J. Biol. Chem.* 277, 29197-29209.

Guillaud,L., Bosc,C., Fourest-Lieuvain,A., Denarier,E., Pirollet,F., Lafanechere,L., and Job,D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 142, 167-179.

- Guo,S. and Kemphues,K.J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.
- Guo,Y., Jacobs,S.C., and Kyprianou,N. (1997). Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer. *Int. J. Cancer* 71, 573-579.
- Guo,Y. and Kyprianou,N. (1998). Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ.* 9, 185-193.
- Guo,Y. and Kyprianou,N. (1999). Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 59, 1366-1371.
- Haga,K., Ogawa,H., Haga,T., and Murofushi,H. (1998). GTP-binding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin. *Eur. J. Biochem.* 255, 363-368.
- Haitjema,T., Westermann,C.J., Overtoom,T.T., Timmer,R., Disch,F., Mauser,H., and Lammers,J.W. (1996). Hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu disease): new insights in pathogenesis, complications, and treatment. *Arch. Intern. Med.* 156, 714-719.
- Hakimi,J.M., Rondinelli,R.H., Schoenberg,M.P., and Barrack,E.R. (1996). Androgen-receptor gene structure and function in prostate cancer. *World J. Urol.* 14, 329-337.
- Hammarsten,J., Hogstedt,B., Holthuis,N., and Mellstrom,D. (1998). Components of the metabolic syndrome-risk factors for the development of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic. Dis.* 1, 157-162.
- Han,K., Viallet,J., Chevalier,S., Zheng,W., Bazinet,M., and Aprikian,A.G. (1997). Characterization of intracellular calcium mobilization by bombesin-related neuropeptides in PC-3 human prostate cancer cells. *Prostate* 31, 53-60.
- Harper,M.E., Goddard,L., Glynne-Jones,E., Wilson,D.W., Price-Thomas,M., Peeling,W.B., and Griffiths,K. (1993). An immunocytochemical analysis of TGF alpha expression in benign and malignant prostatic tumors. *Prostate* 23, 9-23.
- Hasegawa,M., Morishima-Kawashima,M., Takio,K., Suzuki,M., Titani,K., and Ihara,Y. (1992). Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054.
- Henriksen,R., Gobl,A., Wilander,E., Oberg,K., Miyazono,K., and Funa,K. (1995). Expression and prognostic significance of TGF-beta isoforms, latent TGF-beta 1 binding

protein, TGF-beta type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest* 73, 213-220.

Hermans,E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 99, 25-44.

Hersey,P. and Zhang,X.D. (2003). Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J. Cell Physiol* 196, 9-18.

Hill,D.P. and Strome,S. (1988). An analysis of the role of microfilaments in the establishment and maintenance of asymmetry in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Dev. Biol.* 125, 75-84.

Hill,D.P. and Strome,S. (1990). Brief cytochalasin-induced disruption of microfilaments during a critical interval in 1-cell *C. elegans* embryos alters the partitioning of developmental instructions to the 2-cell embryo. *Development* 108, 159-172.

Hirokawa,N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 74-81.

Hirose,T., Fujimoto,W., Tamaai,T., Kim,K.H., Matsuura,H., and Jetten,A.M. (1994). TAK1: molecular cloning and characterization of a new member of the nuclear receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 8, 1667-1680.

Hocevar,B.A., Smine,A., Xu,X.X., and Howe,P.H. (2001). The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *EMBO J.* 20, 2789-2801.

Holy,T.E. and Leibler,S. (1994). Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 5682-5685.

Hoosein,N.M., Logothetis,C.J., and Chung,L.W. (1993). Differential effects of peptide hormones bombesin, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin analog RC-160 on the invasive capacity of human prostatic carcinoma cells. *J. Urol.* 149, 1209-1213.

Horak,E.R., Leek,R., Klenk,N., LeJeune,S., Smith,K., Stuart,N., Greenall,M., Stepniewska,K., and Harris,A.L. (1992). Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340, 1120-1124.

Horoszewicz,J.S., Leong,S.S., Kawinski,E., Karr,J.P., Rosenthal,H., Chu,T.M., Mirand,E.A., and Murphy,G.P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43, 1809-1818.

Horvitz,H.R. and Herskowitz,I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68, 237-255.

Howard,J. and Hyman,A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753-758.

Howell,B., Larsson,N., Gullberg,M., and Cassimeris,L. (1999). Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Mol. Biol. Cell* 10, 105-118.

Hu,Y. and Mivechi,N.F. (2003). HSF-1 interacts with Ral-binding protein 1 in a stress-responsive, multiprotein complex with HSP90 in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 17299-17306.

Hudes,G.R. (2002). Signaling inhibitors in the treatment of prostate cancer. *Invest New Drugs* 20, 159-172.

Huggins,C.C.P.J. (1940). Quantitative studies on prostatic secretion. II . The effect of castration and of estrogen injection on the normal and on the hyperplastic prostate glands of dogs. *Journal of experimental medicine* 72, 747-761.

Huggins,C.H.C.V. (1941). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer research* 1, 293-297.

Hurov,J.B., Stappenbeck,T.S., Zmasek,C.M., White,L.S., Ranganath,S.H., Russell,J.H., Chan,A.C., Murphy,K.M., and Piwnica-Worms,H. (2001). Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (Par-1) protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 21, 3206-3219.

Huse,M., Chen,Y.G., Massague,J., and Kuriyan,J. (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425-436.

Huse,M., Muir,T.W., Xu,L., Chen,Y.G., Kuriyan,J., and Massague,J. (2001). The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol. Cell* 8, 671-682.

Hussain,M.H., Pienta,K.J., Redman,B.G., Cummings,G.D., and Flaherty,L.E. (1994). Oral etoposide in the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 74, 100-103.

Huynh,J.R., Shulman,J.M., Benton,R., and St Johnston,D. (2001). PAR-1 is required for the maintenance of oocyte fate in *Drosophila*. *Development* 128, 1201-1209.

Hyman,A.A., Chretien,D., Arnal,I., and Wade,R.H. (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. *J. Cell Biol.* 128, 117-125.

Igawa,T., Lin,F.F., Rao,P., and Lin,M.F. (2003). Suppression of LNCaP prostate cancer xenograft tumors by a prostate-specific protein tyrosine phosphatase, prostatic acid phosphatase. *Prostate* 55, 247-258.

- Inglis, J.D., Lee, M., and Hill, R.E. (1993). Emk, a protein kinase with homologs in yeast maps to mouse chromosome 19. *Mamm. Genome* 4, 401-403.
- Isaacs, J.T. (1984). Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate* 5, 545-557.
- Isaacs, J.T. (1999). The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol. Clin. North Am.* 26, 263-273.
- Isaacs, W. and Kainu, T. (2001). Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Epidemiol. Rev.* 23, 36-41.
- Isaacs, W.B. and Shaper, J.H. (1983). Isolation and characterization of the major androgen-dependent glycoprotein of canine prostatic fluid. *J. Biol. Chem.* 258, 6610-6615.
- Iwamura, M., Sluss, P.M., Casamento, J.B., and Cockett, A.T. (1993). Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 22, 243-252.
- Jackson, M.W., Bentel, J.M., and Tilley, W.D. (1997). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* 157, 2323-2328.
- Jakobsen, H., Torp-Pedersen, S., Juul, N., and Hald, T. (1988). The long-term influence of vasectomy on prostatic volume and morphology in man. *Prostate* 13, 57-67.
- Jenster, G. (2000). Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines. *J. Pathol.* 191, 227-228.
- Jindal, S.K., Ishii, E., Letarte, M., Vera, S., Teerds, K.J., and Dorrington, J.H. (1995). Regulation of transforming growth factor alpha gene expression in an ovarian surface epithelial cell line derived from a human carcinoma. *Biol. Reprod.* 52, 1027-1037.
- Jordan, A., Hadfield, J.A., Lawrence, N.J., and McGown, A.T. (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med. Res. Rev.* 18, 259-296.
- Jordan, M.A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W.B., Copp, H., and Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res.* 56, 816-825.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., and Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 17, 16-23.

- Karan,D., Kelly,D.L., Rizzino,A., Lin,M.F., and Batra,S.K. (2002). Expression profile of differentially-regulated genes during progression of androgen-independent growth in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 23, 967-975.
- Karan,D., Lin,M.F., Johansson,S.L., and Batra,S.K. (2003). Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* 103, 285-293.
- Karlsson,C., Katich,S., Hagting,A., Hoffmann,I., and Pines,J. (1999). Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *J. Cell Biol.* 146, 573-584.
- Kato,T., Satoh,S., Okabe,H., Kitahara,O., Ono,K., Kihara,C., Tanaka,T., Tsunoda,T., Yamaoka,Y., Nakamura,Y., and Furukawa,Y. (2001). Isolation of a novel human gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement in hepatocellular carcinogenesis. *Neoplasia*. 3, 4-9.
- Kato,Y., Habas,R., Katsuyama,Y., Naar,A.M., and He,X. (2002). A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature* 418, 641-646.
- Kemphues,K.J., Priess,J.R., Morton,D.G., and Cheng,N.S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311-320.
- Kim,I.Y., Ahn,H.J., Lang,S., Oefelein,M.G., Oyasu,R., Kozlowski,J.M., and Lee,C. (1998). Loss of expression of transforming growth factor-beta receptors is associated with poor prognosis in prostate cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 4, 1625-1630.
- Kim,I.Y., Ahn,H.J., Zelner,D.J., Shaw,J.W., Sensibar,J.A., Kim,J.H., Kato,M., and Lee,C. (1996). Genetic change in transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor type I gene correlates with insensitivity to TGF-beta 1 in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 56, 44-48.
- Kleinerman,D.I., Troncoso,P., Lin,S.H., Pisters,L.L., Sherwood,E.R., Brooks,T., von Eschenbach,A.C., and Hsieh,J.T. (1995). Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res.* 55, 1215-1220.
- Koivisto,P., Kolmer,M., Visakorpi,T., and Kallioniemi,O.P. (1998). Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 152, 1-9.
- Koivisto,P.A. and Helin,H.J. (1999). Androgen receptor gene amplification increases tissue PSA protein expression in hormone-refractory prostate carcinoma. *J. Pathol.* 189, 219-223.
- Koli,K., Saharinen,J., Hyytiainen,M., Penttinen,C., and Keski-Oja,J. (2001). Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech.* 52, 354-362.
- Konishi,N., Cho,M., Yamamoto,K., and Hiasa,Y. (1997). Genetic changes in prostate cancer. *Pathol. Int.* 47, 735-747.

Kornberg,L.J. (1998). Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 20, 745-752.

Kosik,K.S. and McConlogue,L. (1994). Microtubule-associated protein function: lessons from expression in *Spodoptera frugiperda* cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 28, 195-198.

Kostenuik,P.J., Singh,G., and Orr,F.W. (1997). Transforming growth factor beta upregulates the integrin-mediated adhesion of human prostatic carcinoma cells to type I collagen. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 41-52.

Kozlowski,J.M., Fidler,I.J., Campbell,D., Xu,Z.L., Kaighn,M.E., and Hart,I.R. (1984). Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res.* 44, 3522-3529.

Krajewska,M., Krajewski,S., Epstein,J.I., Shabaik,A., Sauvageot,J., Song,K., Kitada,S., and Reed,J.C. (1996). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am. J. Pathol.* 148, 1567-1576.

Krieg,M., Nass,R., and Tunn,S. (1993). Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 77, 375-381.

Kuiper,G.G., Enmark,E., Peltö-Huikko,M., Nilsson,S., and Gustafsson,J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5925-5930.

Kumar,S., Ghellal,A., Li,C., Byrne,G., Haboubi,N., Wang,J.M., and Bundred,N. (1999). Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 59, 856-861.

Landry,F., Chapdelaine,A., Begin,L.R., and Chevalier,S. (1996). Phosphotyrosine antibodies preferentially react with basal epithelial cells in the dog prostate. *J. Urol.* 155, 386-390.

Lane,K.E., Ricci,M.J., and Ho,S.M. (1997). Effect of combined testosterone and estradiol-17 beta treatment on the metabolism of E2 in the prostate and liver of noble rats. *Prostate* 30, 256-262.

Lanzi,C., Cassinelli,G., Cuccuru,G., Supino,R., Zuco,V., Ferlini,C., Scambia,G., and Zunino,F. (2001). Cell cycle checkpoint efficiency and cellular response to paclitaxel in prostate cancer cells. *Prostate* 48, 254-264.

Lastres,P., Letamendia,A., Zhang,H., Rius,C., Almendro,N., Raab,U., Lopez,L.A., Langa,C., Fabra,A., Letarte,M., and Bernabeu,C. (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J. Cell Biol.* 133, 1109-1121.

Lastres,P., Martin-Perez,J., Langa,C., and Bernabeu,C. (1994). Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem. J.* 301 (Pt 3), 765-768.

Leav,I. and Ling,G.V. (1968). Adenocarcinoma of the canine prostate. *Cancer* 22, 1329-1345.

Lee,V.M., Balin,B.J., Otvos,L., Jr., and Trojanowski,J.Q. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251, 675-678.

Leslie,N.R. and Downes,C.P. (2002). PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal.* 14, 285-295.

Letamendia,A., Lastres,P., Botella,L.M., Raab,U., Langa,C., Velasco,B., Attisano,L., and Bernabeu,C. (1998). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J. Biol. Chem.* 273, 33011-33019.

Levin,D.E. and Bishop,J.M. (1990). A putative protein kinase gene (kin1+) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 8272-8276.

Li,C., Hampson,I.N., Hampson,L., Kumar,P., Bernabeu,C., and Kumar,S. (2000). CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 14, 55-64.

Li,D.Y., Sorensen,L.K., Brooke,B.S., Urness,L.D., Davis,E.C., Taylor,D.G., Boak,B.B., and Wendel,D.P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-1537.

Li,H., Zhu,H., Xu,C.J., and Yuan,J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li,Y., Gorbea,C., Mahaffey,D., Rechsteiner,M., and Benezra,R. (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12431-12436.

Lichtenstein,P., Holm,N.V., Verkasalo,P.K., Iliadou,A., Kaprio,J., Koskenvuo,M., Pukkala,E., Skytthe,A., and Hemminki,K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* 343, 78-85.

Ling,Y.H., Yang,Y., Tornos,C., Singh,B., and Perez-Soler,R. (1998). Paclitaxel-induced apoptosis is associated with expression and activation of c-Mos gene product in human ovarian carcinoma SKOV3 cells. *Cancer Res.* 58, 3633-3640.

- Linja,M.J., Savinainen,K.J., Saramaki,O.R., Tammela,T.L., Vessella,R.L., and Visakorpi,T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 3550-3555.
- Linja,M.J., Savinainen,K.J., Tammela,T.L., Isola,J.J., and Visakorpi,T. (2003). Expression of ERalpha and ERbeta in prostate cancer. *Prostate* 55, 180-186.
- Liu,Q.Y. and Stein,C.A. (1997). Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression. *Clin. Cancer Res.* 3, 2039-2046.
- Liu,Y., Jovanovic,B., Pins,M., Lee,C., and Bergan,R.C. (2002). Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* 21, 8272-8281.
- Lopez-Casillas,F., Cheifetz,S., Doody,J., Andres,J.L., Lane,W.S., and Massague,J. (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67, 785-795.
- Lopez-Girona,A., Furnari,B., Mondesert,O., and Russell,P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397, 172-175.
- Macaulay,V.M. (1992). Insulin-like growth factors and cancer. *Br. J. Cancer* 65, 311-320.
- Makarovskiy,A.N., Siryaporn,E., Hixson,D.C., and Akerley,W. (2002). Survival of docetaxel-resistant prostate cancer cells in vitro depends on phenotype alterations and continuity of drug exposure. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1198-1211.
- Mandelkow,E. and Mandelkow,E.M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 72-81.
- Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T., and Sudarsanam,S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marcelli,M. and Cunningham,G.R. (1999). Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84, 3463-3468.
- Marker,P.C., Donjacour,A.A., Dahiya,R., and Cunha,G.R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 253, 165-174.
- Martikainen,P., Kyprianou,N., and Isaacs,J.T. (1990). Effect of transforming growth factor-beta 1 on proliferation and death of rat prostatic cells. *Endocrinology* 127, 2963-2968.
- Martinez-Exposito,M.J., Kaplan,K.B., Copeland,J., and Sorger,P.K. (1999). Retention of the BUB3 checkpoint protein on lagging chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8493-8498.

- Massague,J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- Massague,J., Blain,S.W., and Lo,R.S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- Massague,J., Cheifetz,S., Boyd,F.T., and Andres,J.L. (1990). TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 593, 59-72.
- Massague,J. and Wotton,D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745-1754.
- Mastbergen,S.C., Duivenvoorden,I., Versteegh,R.T., and Geldof,A.A. (2000). Cell cycle arrest and clonogenic tumor cell kill by divergent chemotherapeutic drugs. *Anticancer Res.* 20, 1833-1838.
- Matsuoka,S., Huang,M., and Elledge,S.J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893-1897.
- Mazars,A., Tournigand,C., Mollat,P., Prunier,C., Ferrand,N., Bourgeade,M.F., Gespach,C., and Atfi,A. (2000). Differential roles of JNK and Smad2 signaling pathways in the inhibition of c-Myc-induced cell death by TGF-beta. *Oncogene* 19, 1277-1287.
- McAllister,K.A., Grogg,K.M., Johnson,D.W., Gallione,C.J., Baldwin,M.A., Jackson,C.E., Helmbold,E.A., Markel,D.S., McKinnon,W.C., Murrell,J., and . (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* 8, 345-351.
- McDonnell,T.J., Navone,N.M., Troncoso,P., Pisters,L.L., Conti,C., von Eschenbach,A.C., Brisbay,S., and Logothetis,C.J. (1997). Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J. Urol.* 157, 569-574.
- McGarvey,T.W. and Stearns,M.E. (1995). Keratinocyte growth factor and receptor mRNA expression in benign and malignant human prostate. *Exp. Mol. Pathol.* 63, 52-62.
- McKeehan,W.L. (1991). Growth factor receptors and prostate cell growth. *Cancer Surv.* 11, 165-175.
- McMenamin,M.E., Soung,P., Perera,S., Kaplan,I., Loda,M., and Sellers,W.R. (1999). Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 59, 4291-4296.
- McNeal,J.E. (1978). Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol.* 15, 340-345.

- McNeal,J.E. (1980). Anatomy of the prostate: an historical survey of divergent views. *Prostate 1*, 3-13.
- McNeal,J.E., Redwine,E.A., Freiha,F.S., and Stamey,T.A. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am. J. Surg. Pathol. 12*, 897-906.
- Merrill,G.F. (1998). Cell synchronization. *Methods Cell Biol. 57*, 229-249.
- Mertens,C., Kuhn,C., and Franke,W.W. (1996). Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J. Cell Biol. 135*, 1009-1025.
- Messing,E.M., Manola,J., Sarosdy,M., Wilding,G., Crawford,E.D., and Trump,D. (1999). Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer. *N. Engl. J. Med. 341*, 1781-1788.
- Migliaccio,A., Castoria,G., Di Domenico,M., de Falco,A., Bilancio,A., Lombardi,M., Barone,M.V., Ametrano,D., Zannini,M.S., Abbondanza,C., and Auricchio,F. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J. 19*, 5406-5417.
- Milross,C.G., Peters,L.J., Hunter,N.R., Mason,K.A., and Milas,L. (1995). Sequence-dependent antitumor activity of paclitaxel (taxol) and cisplatin in vivo. *Int. J. Cancer 62*, 599-604.
- Miyazono,K., Olofsson,A., Colosetti,P., and Heldin,C.H. (1991). A role of the latent TGF- β 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1. *EMBO J. 10*, 1091-1101.
- Monroe,K.R., Yu,M.C., Kolonel,L.N., Coetzee,G.A., Wilkens,L.R., Ross,R.K., and Henderson,B.E. (1995). Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat. Med. 1*, 827-829.
- Montironi,R., Magi Galluzzi,C.M., Marina,S., and Diamanti,L. (1994). Quantitative characterization of the frequency and location of cell proliferation and death in prostate pathology. *J. Cell Biochem. Suppl 19*, 238-245.
- Moos,P.J. and Fitzpatrick,F.A. (1998). Taxane-mediated gene induction is independent of microtubule stabilization: induction of transcription regulators and enzymes that modulate inflammation and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95*, 3896-3901.
- Morris,M.J. and Scher,H.I. (2002). Novel therapies for the treatment of prostate cancer: current clinical trials and development strategies. *Surg. Oncol. 11*, 13-23.

- Morris,M.J., Tong,W.P., Cordon-Cardo,C., Drobnjak,M., Kelly,W.K., Slovin,S.F., Terry,K.L., Siedlecki,K., Swanson,P., Rafi,M., DiPaola,R.S., Rosen,N., and Scher,H.I. (2002). Phase I trial of BCL-2 antisense oligonucleotide (G3139) administered by continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 679-683.
- Mortensen,K. and Larsson,L.I. (2003). Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neofomed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1007-1012.
- Mosselman,S., Polman,J., and Dijkema,R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49-53.
- Motwani,M., Delohery,T.M., and Schwartz,G.K. (1999). Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 5, 1876-1883.
- Muller,J., Ory,S., Copeland,T., Piwnica-Worms,H., and Morrison,D.K. (2001). C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol. Cell* 8, 983-993.
- Muller,J., Ritt,D.A., Copeland,T.D., and Morrison,D.K. (2003). Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *EMBO J.* 22, 4431-4442.
- Munger,J.S., Huang,X., Kawakatsu,H., Griffiths,M.J., Dalton,S.L., Wu,J., Pittet,J.F., Kaminski,N., Garat,C., Matthy,M.A., Rifkin,D.B., and Sheppard,D. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319-328.
- Nagase,T., Kikuno,R., Ishikawa,K., Hirosawa,M., and Ohara,O. (2000). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 7, 143-150.
- Navarro,D., Luzardo,O.P., Fernandez,L., Chesa,N., and Diaz-Chico,B.N. (2002). Transition to androgen-independence in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81, 191-201.
- Nelson,D.C., and Cox,M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. N.Y. worth publishers).
- Nelson,J.B., Hedican,S.P., George,D.J., Reddi,A.H., Piantadosi,S., Eisenberger,M.A., and Simons,J.W. (1995). Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat. Med.* 1, 944-949.
- Nelson,W.G., De Marzo,A.M., and Isaacs,W.B. (2003). Prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 366-381.

- Nelson,W.J. and Grindstaff,K.K. (1997). Cell polarity: par for the polar course. *Curr. Biol.* 7, R562-R564.
- Nguyen,H.L., Gruber,D., and Bulinski,J.C. (1999). Microtubule-associated protein 4 (MAP4) regulates assembly, protomer-polymer partitioning and synthesis of tubulin in cultured cells. *J. Cell Sci.* 112 (*Pt 12*), 1813-1824.
- Nguyen,L.T., Beaugard,G., Tessier,S., Allard,P., Atfi,A., Durocher,Y., Chapdelaine,A., Potier,M., and 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.
- Nguyen,L.T., Durocher,Y., Chapdelaine,A., and Chevalier,S. (1992). The major form of protein tyrosine kinase in the dog prostate is expressed by a 50 kDa polypeptide. *FEBS Lett.* 296, 215-218.
- Nieminen,A.L. (2003). Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int. Rev. Cytol.* 224, 29-55.
- Nogales,E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277-302.
- Noordzij,M.A., van Steenbrugge,G.J., van der Kwast,T.H., and Schroder,F.H. (1995). Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urol. Res.* 22, 333-341.
- Noordzij,M.A., van Weerden,W.M., de Ridder,C.M., van der Kwast,T.H., Schroder,F.H., and van Steenbrugge,G.J. (1996). Neuroendocrine differentiation in human prostatic tumor models. *Am. J. Pathol.* 149, 859-871.
- Obasaju,C. and Hudes,G.R. (2001). Paclitaxel and docetaxel in prostate cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 15, 525-545.
- Obradovich,J., Walshaw,R., and Goullaud,E. (1987). The influence of castration on the development of prostatic carcinoma in the dog. 43 cases (1978-1985). *J. Vet. Intern. Med.* 1, 183-187.
- Oesterling,J.E., Andrews,P.E., Suman,V.J., Zincke,H., and Myers,R.P. (1993). Preoperative androgen deprivation therapy: artificial lowering of serum prostate specific antigen without downstaging the tumor. *J. Urol.* 149, 779-782.
- Ogg,S., Gabrielli,B., and Piwnica-Worms,H. (1994). Purification of a serine kinase that associates with and phosphorylates human Cdc25C on serine 216. *J. Biol. Chem.* 269, 30461-30469.

Olson,K.R., McIntosh,J.R., and Olmsted,J.B. (1995). Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J. Cell Biol.* 130, 639-650.

Ono,T., Kawabe,T., Sonta,S., and Okamoto,T. (1997). Assignment of MARK3 alias KP78 to human chromosome band 14q32.3 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 79, 101-102.

Ookata,K., Hisanaga,S., Sugita,M., Okuyama,A., Murofushi,H., Kitazawa,H., Chari,S., Bulinski,J.C., and Kishimoto,T. (1997). MAP4 is the in vivo substrate for CDC2 kinase in HeLa cells: identification of an M-phase specific and a cell cycle-independent phosphorylation site in MAP4. *Biochemistry* 36, 15873-15883.

Orr,G.A., Verdier-Pinard,P., McDaid,H., and Horwitz,S.B. (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22, 7280-7295.

Ossipova,O., He,X., and Green,J. (2002). Molecular cloning and developmental expression of Par-1/MARK homologues XPar-1A and XPar-1B from *Xenopus laevis*. *Gene Expr. Patterns.* 2, 145-150.

Pansadoro,V., V and Sternberg,C.N. (1999). Neoadjuvant Hormonal Therapy and Radical Prostatectomy for Locally Advanced Prostate Cancer. *Mol. Urol.* 3, 271-274.

Paquet,M.E., Pece-Barbara,N., Vera,S., Cymerman,U., Karabegovic,A., Shovlin,C., and Letarte,M. (2001). Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1347-1357.

Parsa,I. (1988). Loss of a Mr 78,000 marker in chemically induced transplantable carcinomas and primary carcinoma of human pancreas. *Cancer Res.* 48, 2265-2272.

Parsons,J.K., Gage,W.R., Nelson,W.G., and De Marzo,A.M. (2001). p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. *Urology* 58, 619-624.

Parysek,L.M., Asnes,C.F., and Olmsted,J.B. (1984). MAP 4: occurrence in mouse tissues. *J. Cell Biol.* 99, 1309-1315.

Pece-Barbara,N., Cymerman,U., Vera,S., Marchuk,D.A., and Letarte,M. (1999). Expression analysis of four endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2171-2181.

Peehl,D.M., Wong,S.T., Bazinet,M., and Stamey,T.A. (1989). In vitro studies of human prostatic epithelial cells: attempts to identify distinguishing features of malignant cells. *Growth Factors* 1, 237-250.

Pelengaris,S., Rudolph,B., and Littlewood,T. (2000). Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 100-105.

Peng,C.Y., Graves,P.R., Ogg,S., Thoma,R.S., Byrnes,M.J., III, Wu,Z., Stephenson,M.T., and Piwnica-Worms,H. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ.* 9, 197-208.

Perry,K.T., Anthony,C.T., and Steiner,M.S. (1997). Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in normal and malignant human prostate. *Prostate* 33, 133-140.

Pettaway,C.A., Pisters,L.L., Troncso,P., Slaton,J., Finn,L., Kamoi,K., and Logothetis,C.J. (2000). Neoadjuvant chemotherapy and hormonal therapy followed by radical prostatectomy: feasibility and preliminary results. *J. Clin. Oncol.* 18, 1050-1057.

Pienta,K.J., Redman,B.G., Esper,P.S., and Flaherty,L.E. (1996). A phase II evaluation of oral tamoxifen and intermittent intravenous vinblastine in hormone-refractory adenocarcinoma of the prostate. *Am. J. Clin. Oncol.* 19, 500-503.

Pietenpol,J.A. and Stewart,Z.A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182, 475-481.

Pisters,L.L., Troncso,P., Zhau,H.E., Li,W., von Eschenbach,A.C., and Chung,L.W. (1995). c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J. Urol.* 154, 293-298.

Pitcher,J.A., Hall,R.A., Daaka,Y., Zhang,J., Ferguson,S.S., Hester,S., Miller,S., Caron,M.G., Lefkowitz,R.J., and Barak,L.S. (1998). The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J. Biol. Chem.* 273, 12316-12324.

Porter,A.C. and Vaillancourt,R.R. (1998). Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 17, 1343-1352.

Quackenbush,E.J. and Letarte,M. (1985). Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134, 1276-1285.

Quarmby,L. (2000). Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 16), 2821-2827.

Raghavan,D., Cox,K., Pearson,B.S., Coorey,G.J., Rogers,J., Watt,W.H., Coates,A.S., McNeil,E., and Grygiel,J.J. (1993). Oral cyclophosphamide for the management of hormone-refractory prostate cancer. *Br. J. Urol.* 72, 625-628.

Raich,W.B., Moran,A.N., Rothman,J.H., and Hardin,J. (1998). Cytokinesis and midzone microtubule organization in *Caenorhabditis elegans* require the kinesin-like protein ZEN-4. *Mol. Biol. Cell* 9, 2037-2049.

Ranganathan,S., Benetatos,C.A., Colarusso,P.J., Dexter,D.W., and Hudes,G.R. (1998). Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 77, 562-566.

Riechmann,V., Gutierrez,G.J., Filardo,P., Nebreda,A.R., and Ephrussi,A. (2002). Par-1 regulates stability of the posterior determinant Oskar by phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 4, 337-342.

Ritchie,C.K., Andrews,L.R., Thomas,K.G., Tindall,D.J., and Fitzpatrick,L.A. (1997). The effects of growth factors associated with osteoblasts on prostate carcinoma proliferation and chemotaxis: implications for the development of metastatic disease. *Endocrinology* 138, 1145-1150.

Robinson,D., He,F., Pretlow,T., and Kung,H.J. (1996). A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5958-5962.

Rokhlin,O.W. and Cohen,M.B. (1995). Differential sensitivity of human prostatic cancer cell lines to the effects of protein kinase and phosphatase inhibitors. *Cancer Lett.* 98, 103-110.

Rokman,A., Ikonen,T., Mononen,N., Autio,V., Matikainen,M.P., Koivisto,P.A., Tammela,T.L., Kallioniemi,O.P., and Schleutker,J. (2001). ELAC2/HPC2 involvement in hereditary and sporadic prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 6038-6041.

Ropiquet,F., Giri,D., Lamb,D.J., and Ittmann,M. (1999). FGF7 and FGF2 are increased in benign prostatic hyperplasia and are associated with increased proliferation. *J. Urol.* 162, 595-599.

Rosenberg,J. and Small,E.J. (2003). Prostate cancer update. *Curr. Opin. Oncol.* 15, 217-221.

Roth,B.J. (1999). Androgen-independent prostate cancer: not so chemorefractory after all. *Semin. Oncol.* 26, 43-50.

Rovin,J.D., Frierson,H.F., Jr., Ledin,W., Parsons,J.T., and Adams,R.B. (2002). Expression of focal adhesion kinase in normal and pathologic human prostate tissues. *Prostate* 53, 124-132.

Ruble,R. (1988). The influence of castration on the development of prostatic carcinoma in the dog. *J. Vet. Intern. Med.* 2, 108.

Ruijter,E., van de,K.C., Miller,G., Ruiten,D., Debruyne,F., and Schalken,J. (1999). Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocr. Rev.* *20*, 22-45.

Ruizeveld de Winter,J.A., Janssen,P.J., Sleddens,H.M., Verleun-Mooijman,M.C., Trapman,J., Brinkmann,A.O., Santerse,A.B., Schroder,F.H., and van der Kwast,T.H. (1994). Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am. J. Pathol.* *144*, 735-746.

Sadar,M.D., Hussain,M., and Bruchofsky,N. (1999). Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence. *Endocr. Relat Cancer* *6*, 487-502.

Scatena,C.D., Stewart,Z.A., Mays,D., Tang,L.J., Keefer,C.J., Leach,S.D., and Pietenpol,J.A. (1998). Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.* *273*, 30777-30784.

Scheid,M.P. and Woodgett,J.R. (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett.* *546*, 108-112.

Schisa,J.A., Pitt,J.N., and Priess,J.R. (2001). Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* *128*, 1287-1298.

Schmid,H.P., Maibach,R., Bernhard,J., Hering,F., Hanselmann,S., Gusset,H., Morant,R., Pestalozzi,D., and Castiglione,M. (1997). A phase II study of oral idarubicin as a treatment for metastatic hormone-refractory prostate carcinoma with special focus on prostate specific antigen doubling time. Swiss Group for Clinical Cancer Research, Berne, Switzerland. *Cancer* *79*, 1703-1709.

Schoenenberger,C.A., Bischler,N., Fahrenkrog,B., and Aebi,U. (2002). Actin's propensity for dynamic filament patterning. *FEBS Lett.* *529*, 27-33.

Schoenfeld,T.A. and Obar,R.A. (1994). Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* *151*, 67-137.

Schulman,C. and Lunenfeld,B. (2002). The ageing male. *World J. Urol.* *20*, 4-10.

Schultz-Cherry,S., Lawler,J., and Murphy-Ullrich,J.E. (1994). The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* *269*, 26783-26788.

Schuyler,S.C. and Pellman,D. (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* *105*, 421-424.

Schwarz,P.M., Liggins,J.R., and Luduena,R.F. (1998). Beta-tubulin isotypes purified from bovine brain have different relative stabilities. *Biochemistry* *37*, 4687-4692.

- Segarini,P.R., Rosen,D.M., and Seyedin,S.M. (1989). Binding of transforming growth factor-beta to cell surface proteins varies with cell type. *Mol. Endocrinol.* 3, 261-272.
- Sehgal,I., Baley,P.A., and Thompson,T.C. (1996). Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. *Cancer Res.* 56, 3359-3365.
- Seidman,A.D., Scher,H.I., Petrylak,D., Dershaw,D.D., and Curley,T. (1992). Estramustine and vinblastine: use of prostate specific antigen as a clinical trial end point for hormone refractory prostatic cancer. *J. Urol.* 147, 931-934.
- Sell,S. and Pierce,G.B. (1994). Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* 70, 6-22.
- Shah,I.A., Schlageter,M.O., Stinnett,P., and Lechago,J. (1991). Cytokeratin immunohistochemistry as a diagnostic tool for distinguishing malignant from benign epithelial lesions of the prostate. *Mod. Pathol.* 4, 220-224.
- Shah,M.A. and Schwartz,G.K. (2001). Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 7, 2168-2181.
- Shapiro,G.I. and Harper,J.W. (1999). Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J. Clin. Invest* 104, 1645-1653.
- Sherwood,E.R., Van Dongen,J.L., Wood,C.G., Liao,S., Kozlowski,J.M., and Lee,C. (1998). Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-stimulated growth of human prostatic carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 77, 855-861.
- Shi,Y. and Massague,J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shibata,Y., Ito,K., Suzuki,K., Nakano,K., Fukabori,Y., Suzuki,R., Kawabe,Y., Honma,S., and Yamanaka,H. (2000). Changes in the endocrine environment of the human prostate transition zone with aging: simultaneous quantitative analysis of prostatic sex steroids and comparison with human prostatic histological composition. *Prostate* 42, 45-55.
- Shou,J., Soriano,R., Hayward,S.W., Cunha,G.R., Williams,P.M., and Gao,W.Q. (2002). Expression profiling of a human cell line model of prostatic cancer reveals a direct involvement of interferon signaling in prostate tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 2830-2835.
- Shulman,J.M., Benton,R., and St Johnston,D. (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 101, 377-388.

- Slack,J.K., Adams,R.B., Rovin,J.D., Bissonette,E.A., Stoker,C.E., and Parsons,J.T. (2001). Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene* 20, 1152-1163.
- Smith,D.C., Jodrell,D.I., Egorin,M.J., Ambinder,R.M., Zuhowski,E.G., Kreis,W., Ellis,P.G., and Trump,D.L. (1993). Phase II trial and pharmacokinetic assessment of intravenous melphalan in patients with advanced prostate cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 31, 363-368.
- Smith,J.R., Freije,D., Carpten,J.D., Gronberg,H., Xu,J., Isaacs,S.D., Brownstein,M.J., Bova,G.S., Guo,H., Bujnovszky,P., Nusskern,D.R., Damber,J.E., Bergh,A., Emanuelsson,M., Kallioniemi,O.P., Walker-Daniels,J., Bailey-Wilson,J.E., Beaty,T.H., Meyers,D.A., Walsh,P.C., Collins,F.S., Trent,J.M., and Isaacs,W.B. (1996). Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 274, 1371-1374.
- Smith,P.C., Hobisch,A., Lin,D.L., Culig,Z., and Keller,E.T. (2001). Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 33-40.
- Spittle,C., Charrasse,S., Larroque,C., and Cassimeris,L. (2000). The interaction of TOGp with microtubules and tubulin. *J. Biol. Chem.* 275, 20748-20753.
- Sporn,M.B. and Roberts,A.B. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J. Cell Biol.* 119, 1017-1021.
- Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Fernandes-Alnemri,T., and Alnemri,E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1, 949-957.
- Srivastava,A., Laidler,P., Davies,R.P., Horgan,K., and Hughes,L.E. (1988). The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am. J. Pathol.* 133, 419-423.
- St Jacques,S., Cymerman,U., Pece,N., and Letarte,M. (1994). Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134, 2645-2657.
- Steinberg,G.D., Carter,B.S., Beaty,T.H., Childs,B., and Walsh,P.C. (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17, 337-347.
- Steiner,M.S. and Raghov,S. (2003). Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators reduce prostate cancer risk. *World J. Urol.* 21, 31-36.
- Steiner,M.S., Zhou,Z.Z., Tonb,D.C., and Barrack,E.R. (1994). Expression of transforming growth factor-beta 1 in prostate cancer. *Endocrinology* 135, 2240-2247.

- Stephenson,R.A., Dinney,C.P., Gohji,K., Ordonez,N.G., Killion,J.J., and Fidler,I.J. (1992). Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 951-957.
- Sternberg,C.N. (1992). Hormone refractory metastatic prostate cancer. *Ann. Oncol.* 3, 331-335.
- Sternberg,C.N. (2002). Highlights of contemporary issues in the medical management of prostate cancer. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 43, 105-121.
- Stone,K.R., Mickey,D.D., Wunderli,H., Mickey,G.H., and Paulson,D.F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* 21, 274-281.
- Story,M.T., Hopp,K.A., Meier,D.A., Begun,F.P., and Lawson,R.K. (1993). Influence of transforming growth factor beta 1 and other growth factors on basic fibroblast growth factor level and proliferation of cultured human prostate-derived fibroblasts. *Prostate* 22, 183-197.
- Straight,A.F. and Field,C.M. (2000). Microtubules, membranes and cytokinesis. *Curr. Biol.* 10, R760-R770.
- Strom,S.S., Yamamura,Y., Duphorne,C.M., Spitz,M.R., Babaian,R.J., Pillow,P.C., and Hursting,S.D. (1999). Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutr. Cancer* 33, 20-25.
- Strome,S. and Wood,W.B. (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* 35, 15-25.
- Sun,H., Lesche,R., Li,D.M., Liliental,J., Zhang,H., Gao,J., GavriloVA,N., Mueller,B., Liu,X., and Wu,H. (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 6199-6204.
- Sun,T.Q., Lu,B., Feng,J.J., Reinhard,C., Jan,Y.N., Fantl,W.J., and Williams,L.T. (2001). PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* 3, 628-636.
- Susin,S.A., Daugas,E., Ravagnan,L., Samejima,K., Zamzami,N., Loeffler,M., Costantini,P., Ferri,K.F., Irinopoulou,T., Prevost,M.C., Brothers,G., Mak,T.W., Penninger,J., Earnshaw,W.C., and Kroemer,G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192, 571-580.
- Susin,S.A., Lorenzo,H.K., Zamzami,N., Marzo,I., Snow,B.E., Brothers,G.M., Mangion,J., Jacotot,E., Costantini,P., Loeffler,M., Larochette,N., Goodlett,D.R., Aebersold,R., Siderovski,D.P., Penninger,J.M., and Kroemer,G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Sutkowski,D.M., Fong,C.J., Sensibar,J.A., Rademaker,A.W., Sherwood,E.R., Kozlowski,J.M., and Lee,C. (1992). Interaction of epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human prostatic epithelial cells in culture. *Prostate* 21, 133-143.

Tabibzadeh,S. (2002). Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty. *Front Biosci.* 7, d1231-d1246.

Tahir,S.K., Han,E.K., Credo,B., Jae,H.S., Pietenpol,J.A., Scatena,C.D., Wu-Wong,J.R., Frost,D., Sham,H., Rosenberg,S.H., and Ng,S.C. (2001). A-204197, a new tubulin-binding agent with antimetabolic activity in tumor cell lines resistant to known microtubule inhibitors. *Cancer Res.* 61, 5480-5485.

Takahashi,H., Furusato,M., Allsbrook,W.C., Jr., Nishii,H., Wakui,S., Barrett,J.C., and Boyd,J. (1995). Prevalence of androgen receptor gene mutations in latent prostatic carcinomas from Japanese men. *Cancer Res.* 55, 1621-1624.

Takeda,H., Lasnitzki,I., and Mizuno,T. (1986). Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. *J. Endocrinol.* 110, 467-470.

Tanagho EA McAninch JA (1992). *Smith's General Urology.* (Connecticut, CA,USA: Appleton and LANGE).

Tanaka,F., Otake,Y., Yanagihara,K., Kawano,Y., Miyahara,R., Li,M., Yamada,T., Hanaoka,N., Inui,K., and Wada,H. (2001). Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin. Cancer Res.* 7, 3410-3415.

Tanaka,Y., Gavrielides,M.V., Mitsuuchi,Y., Fujii,T., and Kazanietz,M.G. (2003). Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through the activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J. Biol. Chem.*

Tang,B., de Castro,K., Barnes,H.E., Parks,W.T., Stewart,L., Bottinger,E.P., Danielpour,D., and Wakefield,L.M. (1999). Loss of responsiveness to transforming growth factor beta induces malignant transformation of nontumorigenic rat prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 59, 4834-4842.

Tang,Y., Katuri,V., Dillner,A., Mishra,B., Deng,C.X., and Mishra,L. (2003). Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 299, 574-577.

Tanigawa,N., Amaya,H., Matsumura,M., and Shimomatsuya,T. (1997). Association of tumour vasculature with tumour progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. *Br. J. Cancer* 75, 566-571.

Taylor,S.S., Ha,E., and McKeon,F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell Biol.* 142, 1-11.

Teicher,B.A. (2001). Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev.* 20, 133-143.

Tessier,S., Chapdelaine,A., and 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.

Thalasila,A., Poplin,E., Shih,J., Dvorzhinski,D., Capanna,T., Doyle-Lindrud,S., Beers,S., Goodin,S., Rubin,E., and DiPaola,R.S. (2003). A phase I trial of weekly paclitaxel, 13- cis-retinoic acid, and interferon alpha in patients with prostate cancer and other advanced malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52, 119-124.

Theyer,G., Schirmbock,M., Thalhammer,T., Sherwood,E.R., Baumgartner,G., and Hamilton,G. (1993). Role of the MDR-1-encoded multiple drug resistance phenotype in prostate cancer cell lines. *J. Urol.* 150, 1544-1547.

Thompson,T.C., Truong,L.D., Timme,T.L., Kadmon,D., McCune,B.K., Flanders,K.C., Scardino,P.T., and Park,S.H. (1992). Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. *J. Cell Biochem. Suppl* 16H, 54-61.

Tirnauer,J.S., Grego,S., Salmon,E.D., and Mitchison,T.J. (2002). EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol. Biol. Cell* 13, 3614-3626.

Tomancak,P., Piano,F., Riechmann,V., Gunsalus,K.C., Kempfues,K.J., and Ephrussi,A. (2000). A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat. Cell Biol.* 2, 458-460.

Tremblay,L., Hauck,W., Aprikian,A.G., Begin,L.R., Chapdelaine,A., and Chevalier,S. (1996). Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 68, 164-171.

Truong,L.D., Kadmon,D., McCune,B.K., Flanders,K.C., Scardino,P.T., and Thompson,T.C. (1993). Association of transforming growth factor-beta 1 with prostate cancer: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.* 24, 4-9.

Turcotte,G., Chapdelaine,A., Roberts,K.D., and Chevalier,S. (1988). Androgen binding as evidenced by a whole cell assay system using cultured canine prostatic epithelial cells. *J. Steroid Biochem.* 29, 69-76.

- Vadgama,J.V., Wu,Y., Shen,D., Hsia,S., and Block,J. (2000). Effect of selenium in combination with Adriamycin or Taxol on several different cancer cells. *Anticancer Res.* 20, 1391-1414.
- van Brussel,J.P., van Steenbrugge,G.J., Romijn,J.C., Schroder,F.H., and Mickisch,G.H. (1999). Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *Eur. J. Cancer* 35, 664-671.
- Vandre,D.D., Centonze,V.E., Peloquin,J., Tombes,R.M., and Borisy,G.G. (1991). Proteins of the mammalian mitotic spindle: phosphorylation/dephosphorylation of MAP-4 during mitosis. *J. Cell Sci.* 98 (Pt 4), 577-588.
- Venkateswaran,V., Klotz,L.H., and Fleshner,N.E. (2002). Selenium modulation of cell proliferation and cell cycle biomarkers in human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 62, 2540-2545.
- Verhage,B.A. and Kiemeny,L.A. (2003). Genetic susceptibility to prostate cancer: a review. *Fam. Cancer* 2, 57-67.
- Verhagen,A.M., Ekert,P.G., Pakusch,M., Silke,J., Connolly,L.M., Reid,G.E., Moritz,R.L., Simpson,R.J., and Vaux,D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Vermes,I., Haanen,C., Steffens-Nakken,H., and Reutelingsperger,C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39-51.
- Vivanco,I. and Sawyers,C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489-501.
- Vlietstra,R.J., van Alewijk,D.C., Hermans,K.G., van Steenbrugge,G.J., and Trapman,J. (1998). Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res.* 58, 2720-2723.
- Walczak,C.E., Vernos,I., Mitchison,T.J., Karsenti,E., and Heald,R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr. Biol.* 8, 903-913.
- Walsh,P.C. (1975). Physiologic basis for hormonal therapy in carcinoma of the prostate. *Urol. Clin. North Am.* 2, 125-140.
- Walsh,P.C. and Wilson,J.D. (1976). The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. *J. Clin. Invest* 57, 1093-1097.
- Wang,T.H., Wang,H.S., and Soong,Y.K. (2000). Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88, 2619-2628.

Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., and Cunha, G. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 68, 270-279.

Wang, Y.Z. and Wong, Y.C. (1998). Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* 35, 165-177.

Waters, D.J. and Bostwick, D.G. (1997). Prostatic intraepithelial neoplasia occurs spontaneously in the canine prostate. *J. Urol.* 157, 713-716.

Wenner, C.E. and Yan, S. (2003). Biphasic role of TGF-beta1 in signal transduction and crosstalk. *J. Cell Physiol* 196, 42-50.

Whang, Y.E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R.E., Tran, C., Vessella, R.L., Said, J.W., Isaacs, W.B., and Sawyers, C.L. (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5246-5250.

Whittemore, A.S., Kolonel, L.N., Wu, A.H., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., Burch, J.D., Hankin, J., Dreon, D.M., West, D.W., and . (1995). Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 652-661.

Wikstrom, P., Lindh, G., Bergh, A., and Damber, J.E. (1999). Alterations of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) and TGFbeta receptor expressions with progression in Dunning rat prostatic adenocarcinoma sublines. *Urol. Res.* 27, 185-193.

Wikstrom, P., Lissbrant, I.F., Stattin, P., Egevad, L., and Bergh, A. (2002). Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 51, 268-275.

Wikstrom, P., Stattin, P., Franck-Lissbrant, I., Damber, J.E., and Bergh, A. (1998). Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 37, 19-29.

Wilks, A.F. (1993). Protein tyrosine kinase growth factor receptors and their ligands in development, differentiation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 60, 43-73.

Williams, R.H., Stapleton, A.M., Yang, G., Truong, L.D., Rogers, E., Timme, T.L., Wheeler, T.M., Scardino, P.T., and Thompson, T.C. (1996). Reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II in human prostate cancer: an immunohistochemical study. *Clin. Cancer Res.* 2, 635-640.

Williamson, S.K., Wolf, M.K., Eisenberger, M.A., O'Rourke, M.A., Brannon, W., and Crawford, E.D. (1996). Phase II evaluation of ifosfamide/mesna in metastatic prostate cancer. A Southwest Oncology Group study. *Am. J. Clin. Oncol.* 19, 368-370.

Willis,M.S. and Wians,F.H. (2003). The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clin. Chim. Acta* 330, 57-83.

Witjes,W.P., Aarnink,R.G., Ezz-el-Din,K., Wijkstra,H., Debruyne,E.M., and de la Rosette,J.J. (1997). The correlation between prostate volume, transition zone volume, transition zone index and clinical and urodynamic investigations in patients with lower urinary tract symptoms. *Br. J. Urol.* 80, 84-90.

Witkowski,C.M., Rabinovitz,I., Nagle,R.B., Affinito,K.S., and Cress,A.E. (1993). Characterization of integrin subunits, cellular adhesion and tumorigenicity of four human prostate cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119, 637-644.

Wittmann,T., Hyman,A., and Desai,A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3, E28-E34.

Wong,S.H., Hamel,L., Chevalier,S., and Philip,A. (2000). Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur. J. Biochem.* 267, 5550-5560.

Woo,R.A. and Poon,R.Y. (2003). Cyclin-Dependent Kinases and S Phase Control in Mammalian Cells. *Cell Cycle* 2, 316-324.

Woods,C.M., Zhu,J., McQueney,P.A., Bollag,D., and Lazarides,E. (1995). Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol. Med.* 1, 506-526.

Wrana,J.L., Attisano,L., Wieser,R., Ventura,F., and Massague,J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341-347.

Wu,H.C., Hsieh,J.T., Gleave,M.E., Brown,N.M., Pathak,S., and Chung,L.W. (1994). Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int. J. Cancer* 57, 406-412.

Xu,J., Meyers,D., Freije,D., Isaacs,S., Wiley,K., Nusskern,D., Ewing,C., Wilkens,E., Bujnovszky,P., Bova,G.S., Walsh,P., Isaacs,W., Schleutker,J., Matikainen,M., Tammela,T., Visakorpi,T., Kallioniemi,O.P., Berry,R., Schaid,D., French,A., McDonnell,S., Schroeder,J., Blute,M., Thibodeau,S., Trent,J., and . (1998). Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat. Genet.* 20, 175-179.

Xu,L., Chen,Y.G., and Massague,J. (2000). The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 2, 559-562.

Xue,Y., Smedts,F., Verhofstad,A., Debruyne,F., de la,R.J., and Schalken,J. (1998). Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate Suppl* 8, 62-73.

Yan,G., Fukabori,Y., McBride,G., Nikolaropolous,S., and McKeehan,W.L. (1993). Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell Biol.* 13, 4513-4522.

Yang,L., Wang,L., Lin,H.K., Kan,P.Y., Xie,S., Tsai,M.Y., Wang,P.H., Chen,Y.T., and Chang,C. (2003). Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 462-469.

Zagars,G.K., Pollack,A., and von Eschenbach,A.C. (2001). Addition of radiation therapy to androgen ablation improves outcome for subclinically node-positive prostate cancer. *Urology* 58, 233-239.

Zakaria,L., Anastasiadis,A.G., and Shabsigh,R. (2001). Common conditions of the aging male: erectile dysfunction, benign prostatic hyperplasia, cardiovascular disease and depression. *Int. Urol. Nephrol.* 33, 283-292.

Zelefsky,M.J., Kelly,W.K., Scher,H.I., Lee,H., Smart,T., Metz,E., Schwartz,L., Fuks,Z., and Leibel,S.A. (2000). Results of a phase II study using estramustine phosphate and vinblastine in combination with high-dose three-dimensional conformal radiotherapy for patients with locally advanced prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 18, 1936-1941.

Zentella,A. and Massague,J. (1992). Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5176-5180.

Zincke,H., Lau,W., Bergstralh,E., and Blute,M.L. (2001). Role of early adjuvant hormonal therapy after radical prostatectomy for prostate cancer. *J. Urol.* 166, 2208-2215.

Zitzelsberger,H., Engert,D., Walch,A., Kulka,U., Aubele,M., Hofler,H., Bauchinger,M., and Werner,M. (2001). Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* 84, 202-208.

Annexe 1.

Endoglin expression on human microvascular endothelial cells: association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- β signalling receptors. Eur J. Biochem. 267, 5550-5560 (2000).

Endoglin expression on human microvascular endothelial cells Association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- β signalling receptors

S. H. Wong¹, L. Hamel², S. Chevalier² and A. Philip¹

¹Division of Plastic Surgery and the ²Division of Urology, Montreal General Hospital and Department of Surgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Transforming growth factor- β (TGF- β) plays an important role in angiogenesis and vascular function. Endoglin, a transmembrane TGF- β binding protein, is highly expressed on vascular endothelial cells and is the target gene for the hereditary haemorrhagic telangiectasia type I (HHT1), a dominantly inherited vascular disorder. The specific function of endoglin responsible for HHT1 is believed to involve alterations in TGF- β responses. The initial interactions on the cell surface between endoglin and TGF- β receptors may be an important mechanism by which endoglin modulates TGF- β signalling, and thereby responses. Here it is shown that on human microvascular endothelial cells, endoglin is co-expressed and is associated with betaglycan, a TGF- β accessory receptor with which endoglin shares limited amino acid homology. This complex formation may occur in either a ligand-dependent or a ligand-independent manner. In addition, the occurrence of three higher order complexes containing endoglin, type II and/or type I TGF- β receptors, on these cells is demonstrated. Our findings suggest that endoglin may modify TGF- β signalling by interacting with both betaglycan and the TGF- β signalling receptors at physiological receptor concentrations and ratios.

Keywords: betaglycan; endoglin; endothelial cells; receptor heteromerization; TGF- β receptors.

Transforming growth factor (TGF- β) is a member of a large family of multifunctional proteins important in growth, differentiation and development [1]. Three distinct isoforms of TGF- β (TGF- β 1, 2, and 3) have been described in mammals, and are encoded by distinct genes [2]. There is \approx 70% homology between the isoforms which are interchangeable in most biological assays. However, the different features of their promoter sequences, their divergent expression profiles, and the dissimilar phenotypes observed in mice with targeted deletions of TGF- β 1, - β 2, or - β 3 genes, indicate that they perform distinct functions *in vivo* [3–5].

The TGF- β signal is transduced by a pair of transmembrane serine/threonine kinases, known as type I and type II receptors which are present on almost all cell types that have been analysed [6,7]. The type I receptor does not bind TGF- β in the absence of the type II receptor. The binding of TGF- β to the type II receptor, a constitutively active kinase, results in the recruitment, phosphorylation, and concomitant activation of the type I receptor [8]. The activated type I receptor in turn phosphorylates and transmits the signal to a novel family of downstream mediators, termed Smads, resulting in the regulation of target gene expression [9–11]. Although the majority of evidence supports the above model of TGF- β receptor activation and signalling, the presence of other cell surface TGF- β binding proteins which form heteromeric complexes

with the signalling receptors suggests that additional regulatory mechanisms are operative. For example, the type III TGF- β receptor (betaglycan) which is a membrane proteoglycan has been demonstrated to present TGF- β to the type II TGF- β receptor [12–14]. Endoglin, a disulfide-linked homodimeric glycoprotein highly expressed on vascular endothelial cells [15], has been shown to co-immunoprecipitate with the type II and/or type I TGF- β receptors, suggesting heteromeric complex formation with those receptors [16,17].

The cytoplasmic domain of endoglin is 70% homologous to betaglycan [12,13], but the extracellular domain shows only limited homology. Thus, while betaglycan binds all three TGF- β isoforms with high affinity, endoglin binds TGF- β 1 and TGF- β 3, but not TGF- β 2. Endoglin and betaglycan differ widely in their cellular distribution and functionally they appear to have opposing effects. Over-expression of endoglin decreased TGF- β responses in monocytes [18] and myoblasts [19] whereas over-expression of betaglycan enhanced TGF- β responses in these cells [19]. In addition, recent results indicate that unlike betaglycan, endoglin cannot bind TGF- β on its own; it requires the co-expression of the type II receptor for TGF- β binding [20]. Furthermore, endoglin appears to interact not only with TGF- β but also with activin and bone morphogenic protein in the presence of their respective ligand binding receptor.

Mutation in the endoglin gene has been shown to be involved in the hereditary haemorrhagic telangiectasia type I (HHT1), an autosomal dominant vascular disorder characterized by multi-systemic vascular dysplasia, recurrent haemorrhage and arteriovenous malformations [21–25]. It is believed that the specific function of endoglin responsible for HHT1 involves alteration in TGF- β signalling as endoglin modulates TGF- β responses [19–26]. Furthermore, recent evidence indicating

Correspondence to A. Philip, Montreal General Hospital, Room C9-177, 1650 Cedar Avenue, Montreal, Quebec, H3G 1A4 Canada.
Fax: +1 514 934 8289. Tel.: +1 514 937 6011 extn 4533,

Abbreviations: ALK-1, activin receptor like kinase; HHT1, hereditary haemorrhagic telangiectasia; TGF- β , transforming growth factor- β .

(Received 7 February 2000, revised 16 June 2000, accepted 4 July 2000)

that endoglin function and TGF- β signalling are essential for angiogenesis, using mice lacking endoglin gene, supports this conclusion [27].

A growing number of studies using *in vitro* and *in vivo* models have implicated TGF- β as a potent mediator of angiogenesis [28–30]. The microvascular endothelial cell is the principal cell type involved in the process of physiological and pathological angiogenesis. However, the expression pattern of endoglin in relation to those of other TGF- β receptor types on human microvascular endothelial cells is not well defined. Most studies which analysed TGF- β receptors on endothelial cells were focused on macrovascular endothelial cells [16,31,32]. The few studies that reported TGF- β receptor expression on microvascular endothelial cells used cells of animal origin, and in these studies endoglin was not detected [33,34]. Furthermore, endothelial cells of the microvasculature differ from those of the large vessels in several facets such as expression of cellular adhesion molecules and cell surface antigens [35–37]. Defining the expression profiles of TGF- β receptor types and the biochemical interactions between these receptors on microvascular endothelial cells is critical to understand the mechanism of TGF- β action in these cells. It is likely that the initial receptor interactions at the membrane level, leading to the formation of oligomeric complexes which contain different receptor types and ratios, may represent modes of regulating diverse actions of TGF- β in these cells.

We have shown previously that the endothelium of the microvasculature is the major cell type responsible for binding systemically administered ^{125}I -labelled TGF- β 1 *in vivo* [38]. In the present study, we determined the expression of TGF- β receptors on human microvascular endothelial cells, and show that endoglin is co-expressed and is associated with betaglycan, a TGF- β accessory receptor with which endoglin shares limited amino acid homology. This complex formation occurs in both a ligand-dependent and a ligand-independent manner. In addition, we demonstrate the occurrence of three higher order complexes containing endoglin, type II and or type I TGF- β receptors, on these cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human microvascular endothelial cell line, HMEC-1 was a gift of F. W. Ades and T. J. Lawley (Center for Disease Control and Emory University, Atlanta, GA, USA). The HMEC-1 cells (prepared by immortalizing neonatal foreskin endothelial cells with the SV40 large T antigen) have been shown to display the same morphologic, phenotypic and functional characteristics as normal human microvascular endothelial cells [39–41]. The HMEC-1 cells were cultured in MCDB 131 medium (Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM glutamine, 10 ng·mL $^{-1}$ epidermal growth factor (Collaborative Biomedical Products), 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hydrocortisone (Steraloids), 100 U·mL $^{-1}$ penicillin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin, and 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ amphotericin (all from Gibco). All cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO $_2$ /air atmosphere.

Early passage human microvascular endothelial cells prepared from neonatal foreskin were obtained from Clonetics Inc., and were grown in Endothelial Cell Basal Medium supplemented with 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bovine brain extract, 10 ng·mL $^{-1}$ human epidermal growth factor, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hydrocortisone, 5% fetal bovine serum, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gentamicin and 50 ng·mL $^{-1}$ amphotericin-B (all from Clonetics Inc.).

Luciferase reporter assay

The p3TP-Lux TGF- β -inducible luciferase reporter construct [8], containing the luciferase gene under the control of a portion of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter region, was used to determine cellular responsiveness to TGF- β . HMEC-1 cells seeded in a six-well plate at a density of 1.8×10^5 cells per well were transfected with 1 μg p3TP-Lux using 2.5 μL SuperFect (Qiagen) in MCDB 131 medium for 2 h at 37 °C under conditions of 5% CO $_2$ /air. To control for variations in transfection efficiency, the cells from each well were then trypsinized and replated in duplicates in a 12-well plate. The cells were allowed to grow overnight, and one of the duplicate wells was stimulated with 150 pM TGF- β 1 for 24 h and the other well was left untreated. They were then washed, lysed and assayed for luciferase activity using the luciferase assay system (Promega) in a ILA911 Luminometer (Tropics Inc.), and the light emission by the TGF- β treated well was expressed as a percentage of the emission by the untreated well. Optimization of transfection conditions was by using pHGFP (high green fluorescent protein plasmid; Quantum Inc.). Any alteration in the protein content in cultures due to TGF- β treatment was monitored by determining protein concentration using the Bradford method (Bio-Rad).

Thymidine incorporation assay

To confirm that endothelial cells respond to TGF- β , the regulation of DNA synthesis was determined using the thymidine incorporation assay. HMEC-1 cells were seeded in a 24-well plate at a density of 0.75×10^4 cells per well and cultured for 24 h. The cells were then treated with 200 pM TGF- β 1 under serum free conditions for 24 h. [^3H]thymidine (1 $\mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$, Amersham) was added to each well for the final 3 h of TGF- β treatment. The cells were washed three times with NaCl/P $_i$ and once with 5% trichloroacetic acid. They were then solubilized in 1% SDS and the incorporated radioactivity was determined by liquid scintillation counting.

Autoregulation of TGF- β receptors

The regulation of TGF- β receptors by TGF- β isoforms on cell monolayers was determined as described previously [42]. Briefly, this involved incubating HMEC-1 cells or early passage microvascular endothelial cells, in the absence or presence of 100 pM TGF- β 1 or TGF- β 2 in serum-free medium, for 4 h or 24 h at 37 °C in a 5% CO $_2$ /air atmosphere. The cells were then washed and incubated with ^{125}I -labelled TGF- β 1 in the absence or presence of excess unlabelled TGF- β 1 or - β 2 for 3 h at 4 °C, and the radioactivity specifically bound was determined. In some experiments, the cells were washed with 0.1% glacial acetic acid before incubation with ^{125}I -labelled TGF- β 1 to remove any prebound TGF- β , as described by Glick *et al.* [43]. Total protein content in cultures was monitored by determining protein concentrations using the Bradford method (Bio-Rad, Mississauga, Ontario). No change in protein concentration caused by treatment with TGF- β was observed during the time course of the experiment.

Affinity labelling of cells

Iodination of TGF- β 1 and - β 2 was performed as described [44], and affinity labelling was carried out as detailed previously [45]. Briefly, cell monolayers were washed with ice cold binding buffer (Dulbecco's NaCl/P $_i$ with Ca $^{2+}$ and Mg $^{2+}$,

pH 7.4 containing 0.1% BSA) and incubated with 100 pM ^{125}I -labelled TGF- β 1 or 100 pM ^{125}I -labelled TGF- β 2 in the absence or presence of indicated concentrations of unlabelled TGF- β 1, TGF- β 2 or TGF- β 3 (Austral Inc., Genzyme Inc, and R&D Systems, respectively) for 3 h at 4 °C. The receptor/ligand complexes were cross-linked with bis(sulfosuccinimidyl) substrate (BS3; Pierce). The reaction was stopped by the addition of glycine. The cells were washed twice with Dulbecco's NaCl/P_i, and solubilized in buffer containing 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), and the following protease inhibitors: 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aprotinin, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ leupeptin, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ soybean trypsin inhibitor, and 25 mM benzamide. To the solubilized membrane extracts, one-fifth volume of 5 × electrophoresis sample buffer (0.25 mM Tris/HCl pH 6.8, 5% SDS, 50% glycerol, and trace Bromophenol blue) was added, and it was analysed by 3–11% SDS/PAGE under nonreducing or reducing (presence of 5% 2-mercaptoethanol) conditions followed by autoradiography.

Immunoprecipitation of TGF- β receptors

The anti-type I TGF- β receptor Ig, specific for an epitope corresponding to amino acids 158–179, and the anti-activin receptor-like-kinase-1 (ALK-1) Ig, specific for an epitope corresponding to amino acids 471–489, were from Santa Cruz Biotechnology Inc. Anti-peptide Ig against the type II TGF- β receptor and betaglycan were a gift from M. O'Connor-McCourt (Biotechnology Research Institute, Montreal, Quebec, Canada). The procedure and peptide sequences used for the preparation of the types II receptor and betaglycan Igs were as described by Moustakas *et al.* [46]. In comparison studies, these Igs showed the same specificity as those obtained from A. Moustakas (Cambridge, MA, USA). The monoclonal anti-endoglin Ig (44G4) which recognizes human endoglin was a gift from S. St. Jacques (Université Laval, Quebec, Canada).

Immunoprecipitation studies were performed as described previously [45]. Cells were affinity labelled with 200 pM ^{125}I -labelled TGF- β 1, and solubilized as described above. It was then centrifuged at 5000 g for 10 min. Aliquots of the supernatant were incubated overnight at 4 °C with anti-type I, anti-type II, anti-betaglycan, or anti-endoglin Ig in the absence or presence of equimolar amounts of their respective immunizing peptides, or endoglin in the case of anti-endoglin Ig. (The endoglin protein was prepared from HOON cells essentially as described by Gougos and Letarte [47]). Immune complexes were incubated at 4 °C for 2 h with a protein A-Sepharose (Pharmacia-Biotech) slurry prepared as 50% packed beads in Dulbecco's NaCl/P_i containing 0.2% Triton X-100. The beads were pelleted by centrifugation and washed thoroughly with Dulbecco's NaCl/P_i containing 0.2% Triton X-100. The immune complexes were resuspended in 1 × electrophoresis sample buffer (see above), and analysed by SDS/PAGE as above.

Western blot analysis

Membrane extracts of cells were prepared, and not immunoprecipitated or immunoprecipitated with anti-betaglycan Ig or with control IgG (nonimmune rabbit serum). In parallel experiments, cells were washed with a mild acid (0.1% glacial acetic acid) to ensure complete removal of endogenous TGF- β [42,43] before membrane extraction and subsequent immunoprecipitation. The extracts were then fractionated by 3–11%

SDS/PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose (Schleicher & Schuell). The membrane was blocked for 2 h in NaCl/Tris/Tween (30 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20) containing 5% skimmed milk and then incubated with the SN6h anti-(human endoglin) Ig (Dako) overnight at 4 °C. After washing with NaCl/Tris/Tween, the membrane was incubated for 1.5 h with anti-mouse Ig conjugated to horseradish peroxidase and detected using the ECL system (Pharmacia Biotech Inc).

Two-dimensional (nonreducing/reducing) gel electrophoresis

Two-dimensional gel electrophoresis was performed as described by MacKay *et al.* [48], except that 3-mercaptopropionic acid was omitted in the second dimension. Cells were affinity labelled with 100 pM ^{125}I -labelled TGF- β 1 in the absence or presence of 100 pM TGF- β 2 as described above. Membrane extracts were electrophoresed on a 1.0-mm thick 3–11% gradient gel under nonreducing conditions in the first dimension and then on a 1.5-mm-thick 3–11% gradient gel under reducing conditions in the second dimension. Results were analysed by autoradiography.

RESULTS

TGF- β -induced regulation of TGF- β receptors and cellular signalling on microvascular endothelial cells

To demonstrate that the human microvascular endothelial cells used in the present study to characterize the expression of TGF- β receptors are responsive to TGF- β , we tested whether these receptors mediate TGF- β -induced cellular signalling, and exhibit ligand-induced regulation. The TGF- β -induced cellular signalling in endothelial cells was determined by a luciferase reporter assay using p3TP-Lux which has been used extensively as a marker for TGF- β responsiveness [8,13]. HMEC-1 cells were transiently transfected with p3TP-lux and the induction of luciferase activity by exogenous TGF- β 1 was measured. Fig. 1A shows that luciferase activity in transfected cells treated with 150 pM TGF- β 1 was significantly higher ($P < 0.003$) than in transfected cells not treated with TGF- β 1, indicating TGF- β 1 signalling in HMEC-1 cells. That the HMEC-1 cells respond to TGF- β was confirmed by determining the regulation of DNA synthesis by TGF- β 1 using the thymidine incorporation assay. Fig. 1B shows that DNA synthesis by HMEC-1 cells treated with 200 pM TGF- β 1 was significantly higher ($P < 0.002$) than that by cells not treated with TGF- β 1, demonstrating TGF- β 1 signalling in these cells. The autoregulatory effect of TGF- β 1 and - β 2 on TGF- β receptors on HMEC-1 is shown in Fig. 1C. Pretreatment of cells with 100 pM TGF- β 1 or - β 2 at 37 °C for 4 h ($P \leq 0.05$) or 24 h ($P \leq 0.004$) significantly decreased ^{125}I -labelled-TGF- β 1 binding to HMEC-1 cells. Identical results were observed when primary human microvascular endothelial cells were used instead of HMEC-1 (data not shown). The down-regulation observed is not due to competition with prebound TGF- β as similar results were obtained when cells were washed with mild acid before incubation with ^{125}I -labelled-TGF- β 1. In control experiments the acid wash was sufficient to remove >95% prebound ^{125}I -labelled TGF- β 1, and did not diminish the ability of receptors to bind TGF- β subsequently (data not shown) [42].

Human microvascular endothelial cells display three high molecular mass TGF- β 1- β 3 binding complexes that have little affinity for the TGF- β 2 isoform

To analyse endoglin expression pattern on microvascular endothelial cells, in relation to those of other TGF- β receptors, cells were affinity labelled with ^{125}I -labelled TGF- β 1 or ^{125}I -labelled TGF- β 2 and the labelled receptors were analysed by SDS/PAGE. Endoglin is a disulfide linked homodimer which migrates on SDS/PAGE as a 180-kDa complex under nonreducing conditions and as a 100-kDa complex under reducing conditions. Analysis under nonreducing conditions revealed seven binding complexes on HMEC-1 (Fig. 2A): 68, 85, 180, 200–400, 240, 270, and 320 kDa. Often, two other minor complexes were observed at 115 and 145 kDa. An identical receptor profile was observed for early passage microvascular endothelial cells (data not shown). The isoform specificities and migration patterns of the 68-, 85-, 200–400- and 180-kDa complexes are characteristic of the three cloned TGF- β receptors, type I, type II betaglycan, and endoglin, respectively. The identities of these proteins were confirmed later by immunoprecipitation experiments (see below). The competition profiles in the presence of unlabelled TGF- β 1, β 2, and β 3 demonstrated that all receptor components (types I and II receptors, betaglycan and endoglin) have high affinity for TGF- β 1 and - β 3 with TGF- β 1 showing greater affinity than TGF- β 3. As expected, endoglin showed virtually no affinity for TGF- β 2, whereas betaglycan displayed good affinity for that isoform. The higher molecular mass complexes (240, 270 and 320 kDa) displayed high affinity for TGF- β 1 and - β 3 (TGF- β 1 > TGF- β 3), but very little or no affinity for TGF- β 2. In fact, these higher molecular mass complexes are only revealed when the affinity labelling was carried out in the presence of unlabelled TGF- β 2. Under these conditions betaglycan, which has a relatively higher affinity for TGF- β 2, is effectively competed out by that isoform, thus unmasking the higher molecular mass complexes. The minor complexes, 115 kDa and 145 kDa were identified later as type I homodimer and types I and II heterodimer (see below).

When HMEC-1 cells (Fig. 2B) or early passage microvascular endothelial cells (data not shown) were affinity labelled with ^{125}I -labelled ITGF- β 2 instead of ^{125}I -labelled TGF- β 1, and analysed as above, the only labelled binding protein observed was betaglycan. This observation is supported by the data presented in Fig. 2A which showed that TGF- β 2

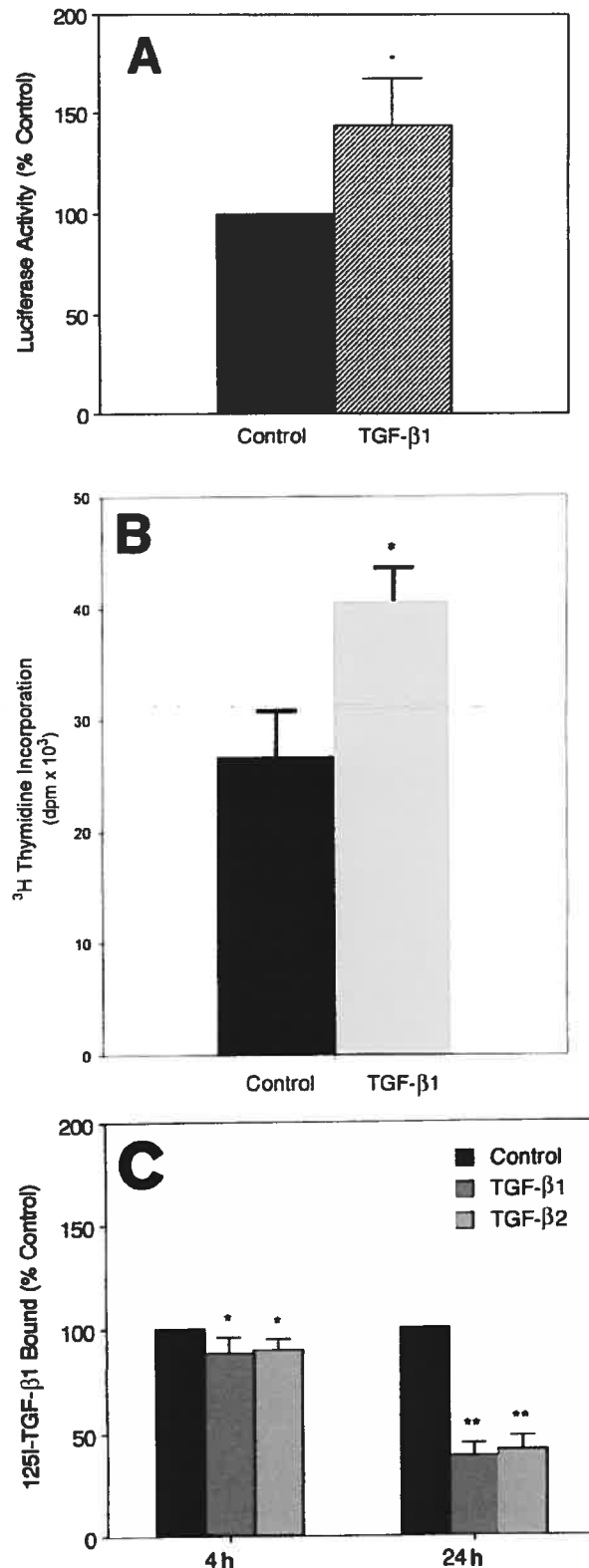


Fig. 1. Luciferase reporter assay showing TGF- β -induced cellular signalling (A), thymidine incorporation assay (B) and autoregulation of TGF- β receptors (C) on human microvascular endothelial cells. (A) HMEC-1 cells were transiently transfected with luciferase reporter p3TP-Lux; 24 h after transfection, cells were left untreated or treated with 150 pM TGF- β 1 for 24 h. Luciferase activity was determined and expressed as a percentage of the control. The mean of three independent experiments performed in triplicates is shown. * $P < 0.003$. (B) HMEC-1 cells were treated with 200 pM TGF- β 1 under serum free conditions for 24 h. [^3H]Thymidine ($1\mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added for the final 3 h of TGF- β treatment, and the incorporated radioactivity was determined by liquid scintillation counting. * $P < 0.002$. (C) HMEC-1 cells were pretreated with 100 pM TGF- β 1 or TGF- β 2 at 37 °C in a 5% CO_2 /air for 4 h or 24 h. Subsequently, the cells were incubated with ^{125}I -labelled TGF- β 1 in the absence or presence of excess unlabelled TGF- β 1 at 4 °C for 3 h, and the radioactivity specifically bound was determined by gamma counting, and expressed as a percentage of the control (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.004$).

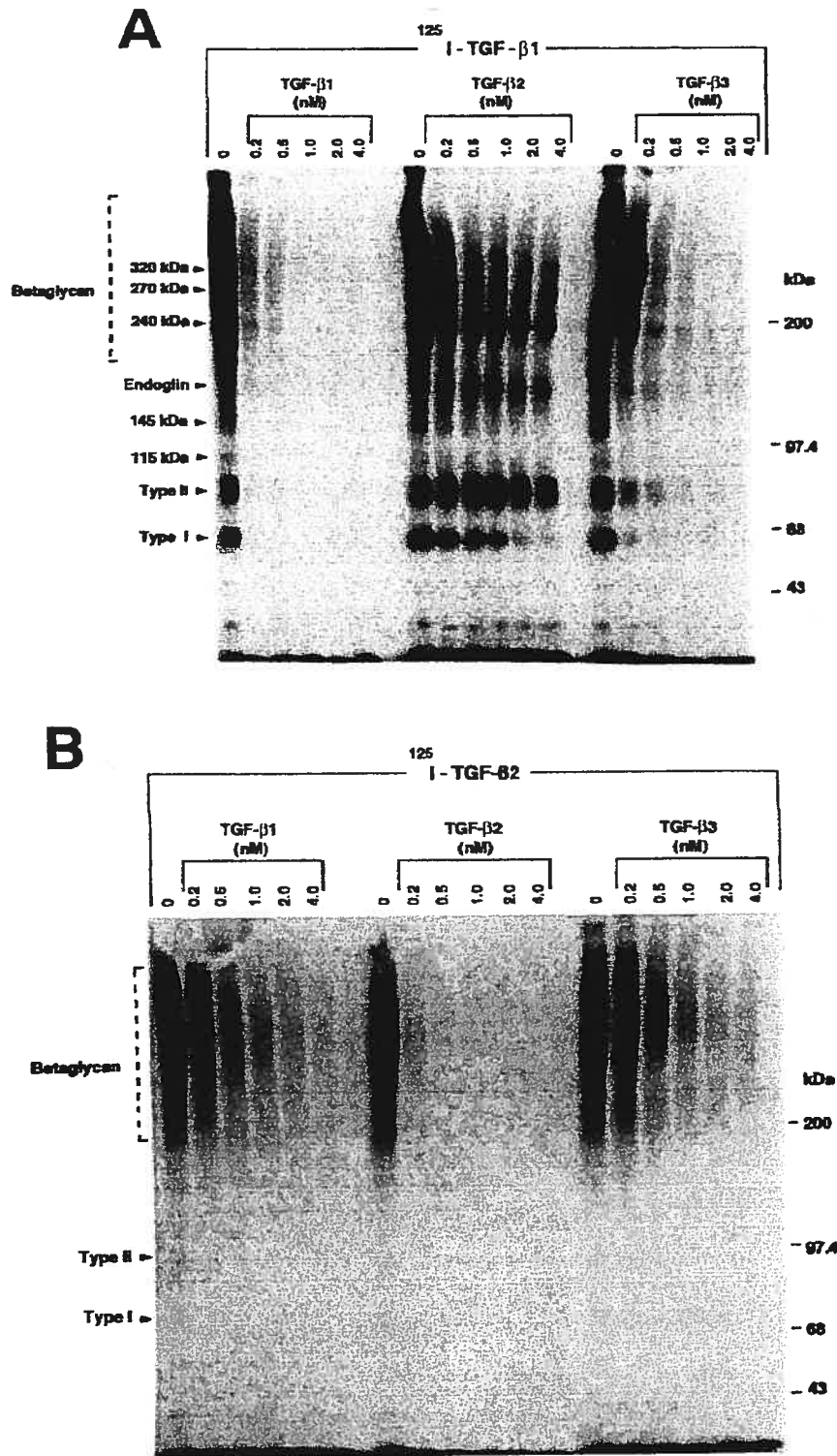


Fig. 2. Affinity labelling of human microvascular endothelial cells with ¹²⁵I-labelled TGF-β1 or ¹²⁵I-labelled TGF-β2. Confluent monolayers of HMEC-1 were affinity labelled with 100 pM ¹²⁵I-labelled TGF-β1 (A) or 100 pM ¹²⁵I-labelled TGF-β2 (B) in the absence or presence of the indicated concentrations of unlabelled TGF-β1, TGF-β2 or TGF-β3. Solubilized membrane extracts were analysed by 3–11% SDS/PAGE under nonreducing conditions.

has little affinity for any of the TGF-β binding complexes except betaglycan. Interestingly, in cells labelled with ¹²⁵I-labelled TGF-β2, the affinity of betaglycan for TGF-β2 was higher than that for TGF-β1 and -β3 (Fig. 2B). This suggests

that a portion of betaglycan exists in a state in which it can bind TGF-β2 with high affinity on microvascular endothelial cells. This phenomenon has been described previously in human endometrial cells [45] and skin fibroblasts [42]. Endoglin and

the higher molecular mass complexes were not observed, and the type I and II TGF- β receptors were barely detectable, reflecting their low affinity for TGF- β 2.

Immunoprecipitation of TGF- β receptors with specific anti-receptor Ig

To confirm the identity of the TGF- β receptors and binding complexes observed on endothelial cells and to study the potential cell surface associations between endoglin and TGF- β receptors, immunoprecipitation experiments were performed using specific anti-type I, anti-type II, anti-betaglycan or anti-endoglin Ig. Thus, in these studies, whereas immunoprecipitation with a specific anti-receptor Ig confirmed the identity of its cognate receptor, co-immunoprecipitation of a second type of receptor which is not recognized by this antibody is indicative of heteromeric complex formation between the two types of receptors.

Figure 3A shows the immunoprecipitation results with the anti-receptor Ig as analysed under reducing conditions using HMEC-1 cells. Immunoprecipitation with a specific anti-type I Ig (lane 1) resulted in the precipitation of the type I receptor, and co-immunoprecipitation of type II receptor and betaglycan. Similarly, an antibody specific for the type II TGF- β receptor (lane 3) precipitated the types I and II receptors and betaglycan. In addition, the endoglin monomer (which migrates at 100 kDa under reducing conditions, just above the type II receptor) appears to be precipitated. Co-immunoprecipitation of types I and II TGF- β receptors, with anti-type I or anti-type II Ig has been well documented [6,42,49]; the detection of heteromeric complexes between type II and betaglycan [14], and between endoglin and type II [16] confirm previous such reports on other cell types. Significantly, immunoprecipitation with anti-betaglycan Ig (lane 5) revealed that in addition to the types I and II receptors, this antibody precipitated the endoglin monomer which can be seen as a distinct band just above the type II band. Similarly, the anti-endoglin Ig (lane 7) precipitated the types I and II receptors and betaglycan in addition to the endoglin monomer. The immunoprecipitation reactions were specific as no labelled proteins were precipitated when equimolar amounts of the corresponding immunizing peptide was included in the reaction to block the antibody (lanes 2, 4, and 6).

The immunoprecipitation results with anti-betaglycan and anti-endoglin Ig analysed under nonreducing conditions using HMEC-1 are shown in Fig. 3B. The anti-betaglycan Ig (lane 1) immunoprecipitated betaglycan. Co-immunoprecipitation of the endoglin dimer (180 kDa) although weak, was also detectable. However, the co-immunoprecipitation of types I and II TGF- β receptors were not detected with this anti-betaglycan Ig. The inability of this antibody to co-immunoprecipitate the type I and II receptors has been reported previously using other cell types [42,45]. A possible explanation is that the epitope recognized by this antibody is masked upon complex formation with the types I and II receptors. The anti-endoglin Ig precipitated the endoglin dimer and the higher molecular mass complexes (lane 3). Significantly, co-immunoprecipitation of betaglycan and types I and II also become detectable upon longer exposure (lane 5). The addition of the respective immunizing peptide specific to the anti-betaglycan Ig (lane 2) and anti-endoglin Ig (lane 4) blocked the immunoprecipitation reaction, demonstrating the specificity of these antibodies. The immunoprecipitation results with anti-betaglycan and anti-endoglin Ig obtained under reducing (Fig. 3A) and nonreducing (Fig. 3B) conditions suggest that endoglin associates with

betaglycan in the presence of ligand, and that the higher molecular mass complexes may contain endoglin (confirmed later). Similar immunoprecipitation results were obtained using the primary human microvascular endothelial cells (data not shown).

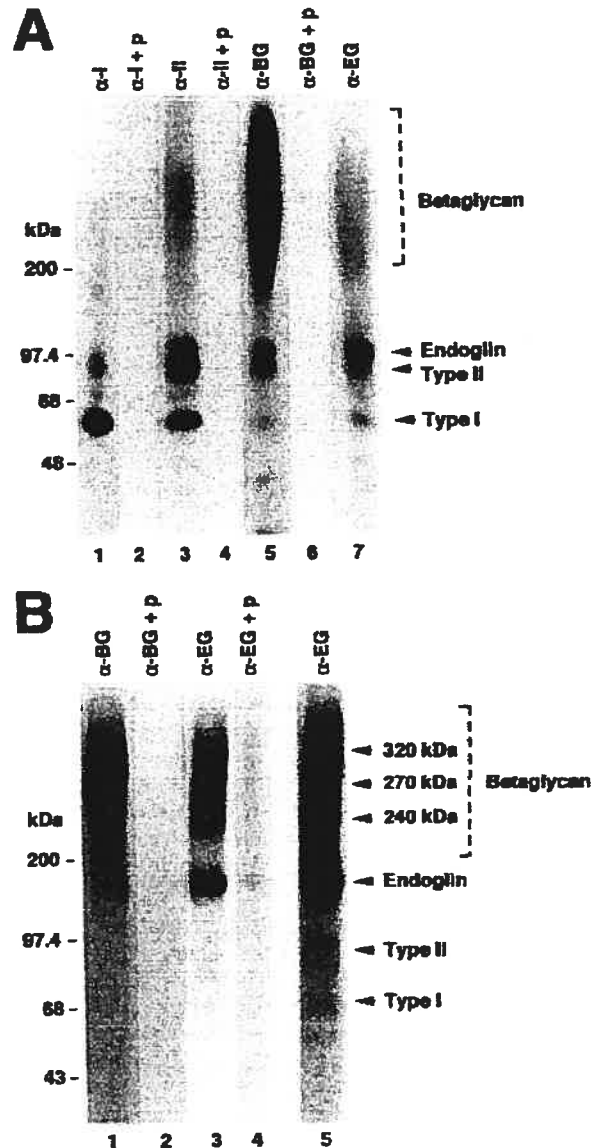


Fig. 3. Immunoprecipitation of TGF- β receptors on human microvascular endothelial cells. Confluent monolayers of HMEC-1 cells were affinity labelled with 200 pM 125 I-labelled TGF- β 1, and solubilized membrane extracts were immunoprecipitated with anti-receptor Ig in the absence or presence of their corresponding immunizing peptides. The complexes were analysed by 3–11% SDS/PAGE. (A) Membrane extracts of HMEC-1 were immunoprecipitated with anti-type I (α -I), anti-type II (α -II), anti-betaglycan (α -BG) or anti-endoglin (α -EG) Ig in the absence (lanes 1, 3, 5, 7) or presence (lanes 2, 4, 6) of their corresponding immunizing peptide (+ P) and analysed under reducing conditions. (B) Membrane extracts of HMEC-1 were immunoprecipitated with anti-betaglycan (α -BG) or anti-endoglin (α -EG) Ig in the absence (lanes 1, 3, 5) or presence (lanes 2, 4) of their corresponding immunizing peptide or protein (+ P), and analysed under nonreducing conditions. Lane 5 represents lane 3 exposed for a longer period of time.

Endothelial cells have been shown to express ALK-1 in addition to the type I TGF- β receptor [50]. Although both will migrate on SDS/PAGE as a 65-kDa complex, the bulk of the 65-kDa band affinity labelled with ^{125}I -labelled TGF- β 1 in the present study corresponds to the type I TGF- β receptor, as immunoprecipitation with a specific anti-ALK1 Ig resulted in the precipitation of only minimal amount of labelled 65-kDa protein. In addition a major portion of the 65-kDa band was sensitive to dithiothreitol, a hallmark of the type I TGF- β receptor (data not shown).

Association of endoglin with betaglycan as shown by Western blot analysis

Because the immunoprecipitation studies using affinity labelled cells suggested that endoglin forms a complex with betaglycan, it was important to confirm this and to determine whether such complex formation also occurs in a ligand independent manner. Membrane extracts of endothelial cells were prepared, and either immunoprecipitated with anti-betaglycan Ig or with control IgG, or were not immunoprecipitated. They were then analysed by Western blot using anti-endoglin Ig (Fig. 4). Western blot analysis of extracts that were separated by SDS/PAGE under nonreducing and reducing conditions without immunoprecipitation (nip) is shown in lanes 1 and 2, respectively. Under nonreducing conditions a 180-kDa band (lane 1), and under reducing conditions a 100-kDa band (lane 2), were detectable, confirming that these two bands correspond to endoglin dimer and monomer, respectively. Significantly, Western blot of extracts immunoprecipitated with anti-betaglycan Ig, revealed the 100 kDa endoglin monomer under reducing conditions (lane 3). This observation — demonstrating that endoglin and betaglycan can be co-immunoprecipitated in the absence of TGF- β — illustrates that these TGF- β binding proteins form ligand-independent complexes. In addition, parallel experiments in which cells were washed with mild acid to ensure complete removal of any endogenous TGF- β [42,43], before membrane extraction and immunoprecipitation, revealed similar levels of endoglin upon Western blot (lane 4), confirming that endoglin complexes with betaglycan in the absence of ligand. The band closer to the bottom of the gel (approximately 50 kDa) detected in lanes 3 and 4 probably corresponds to IgG as this was the only band observed when nonimmune rabbit IgG instead of anti-betaglycan Ig was used for immunoprecipitation (lane 5).

The 240-, 270-, and 320-kDa binding complexes on endothelial cells contain endoglin, type II and/or type I TGF- β receptors

When endothelial cells affinity labelled with ^{125}I -labelled TGF- β 1 were analysed under nonreducing conditions, in addition to the types I, II receptors and betaglycan, binding complexes of 115, 145, 180, 240, 270, and 320 kDa were also observed (Fig. 2A). To understand the nature of these complexes, we tested whether they represent oligomeric complexes of known TGF- β receptors, using two-dimensional gel electrophoresis under nonreducing conditions in the first dimension and reducing conditions in the second dimension. Cells were affinity labelled with ^{125}I -labelled TGF- β 1 in the absence (Fig. 5A) or in the presence of unlabelled TGF- β 2 (Fig. 5B). The results illustrated show that a spot with identical mobility as the type I receptor fell from the 115-kDa complex (Fig. 5A and B). Two spots with mobilities identical to those of the types I and type II receptors often fell from the 145-kDa

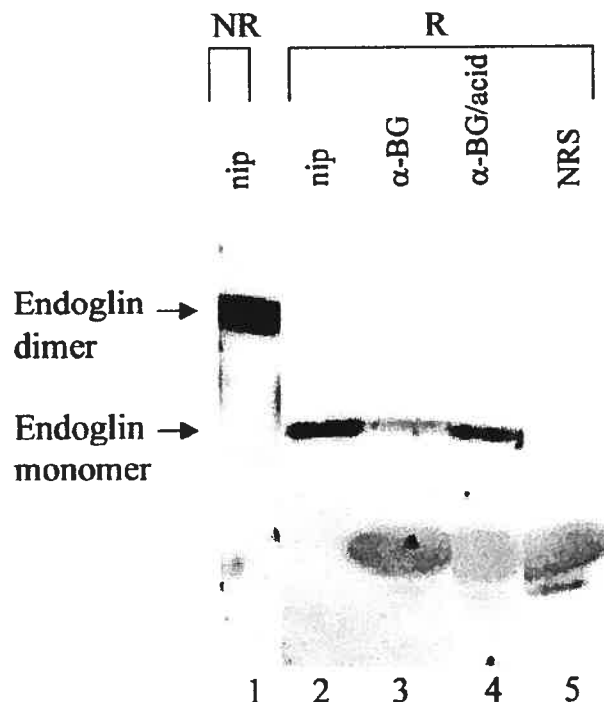


Fig. 4. Western blot analysis demonstrating complex formation between endoglin and betaglycan. Solubilized HMEC-1 membrane extracts were not immunoprecipitated (nip, lanes 1 and 2) or immunoprecipitated with anti-betaglycan Ig (α -BG, lanes 3 and 4), or with nonimmune rabbit serum IgG (NRS, lane 5). In lane 4, cells were washed with mild acid to ensure complete removal of any endogenous TGF- β before membrane extraction and immunoprecipitation. The extracts were then analysed by 3–11% SDS/PAGE under nonreducing (NR, lane 1) or reducing (R, lanes 2, 3, 4 and 5) conditions, and the gel was electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane. After blocking, the membrane was incubated overnight with anti-endoglin Ig (SN6h), and subsequently with anti-mouse-HRP Ig. The ECL system was used for chemiluminescence detection.

complex at reduction (Fig. 5B). Similarly, one spot (detectable in trace amounts), with the same mobility as type II, was often observed as falling from the position of 165 kDa (Fig. 5B). These results suggest that the 115-kDa complex corresponds to two type I receptors (type I receptor homodimer), that the 145 kDa complex represents a type I/type II heterodimer, and that the 165-kDa band corresponds to a type II receptor homodimer.

The 180-kDa complex gave rise to a single spot of identical mobility as the endoglin monomer, confirming that the 180-kDa band corresponds to endoglin dimer (Fig. 5A and B). Similarly, endoglin monomer, type II and often traces of type I fell from the 240-kDa complex (Fig. 5A). On the two-dimensional gels, it was not always possible to get good resolution of the bands representing endoglin monomer and type II (Fig. 5A vs. B). However, as the type II band (spot falling from 145 kDa) migrated at the tail end of the endoglin monomer (spot falling from 180 kDa), they were distinguishable. Thus, endoglin, type II and traces of type I originated from 270 kDa (Fig. 5B). Similarly, endoglin and traces of type II and type I fell from 320 kDa (data not shown). The 180- to 200-kDa spot that fell from the 240-, 270- and 320-kDa complexes may represent endoglin dimer that is either reductant insensitive, or that in which the monomers got inadvertently

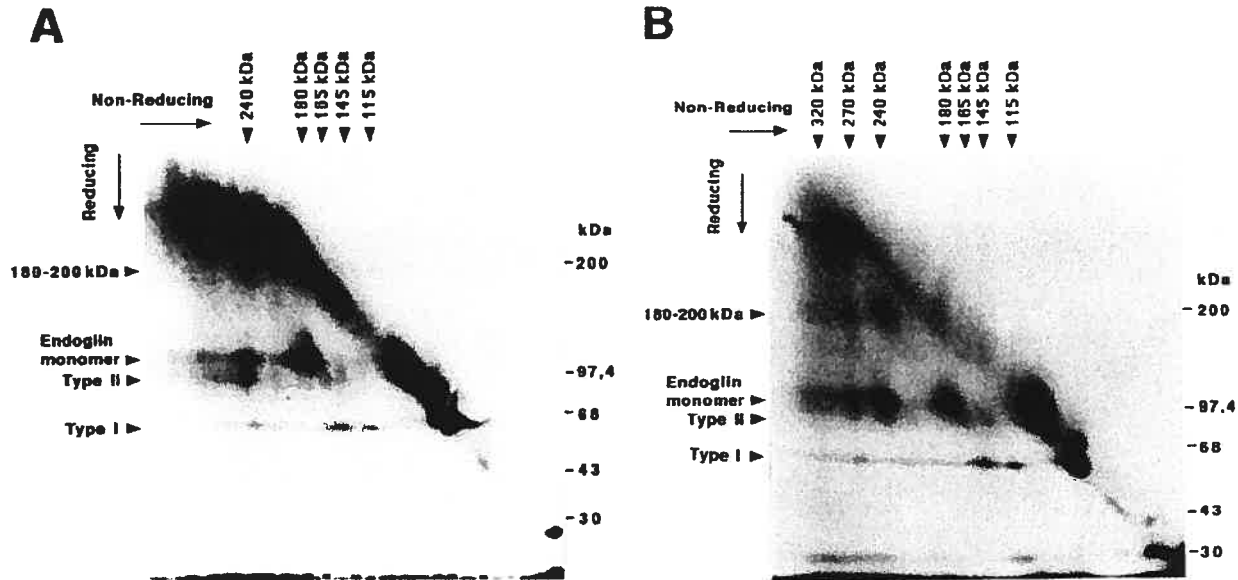


Fig. 5. Two-dimensional (nonreducing/reducing) gel electrophoresis of TGF- β receptor complexes on human microvascular endothelial cells. (A) HMEC-1 cells were affinity labelled with 100 pM ^{125}I -labelled TGF- β 1 and the membrane extracts were analysed by 3–11% SDS/PAGE under nonreducing conditions in the first dimension. The individual lane was cut out, laid horizontally and subjected to 3–11% SDS/PAGE under reducing conditions in the second dimension. (B) HMEC-1 monolayers were affinity labelled with 100 pM ^{125}I -labelled TGF- β 1 in the presence of 100 pM unlabelled TGF- β 2, and the membrane extracts were processed as described for (A).

cross-linked during the affinity labelling procedure. Alternatively, it may correspond to an endoglin monomer cross-linked to type II and/or type I receptor.

DISCUSSION

Mutation in the endoglin gene has been shown to be involved in HHT1. The specific function of endoglin responsible for HHT1 is likely to be related to alterations in TGF- β action [19,26]. However, the molecular mechanisms by which endoglin participates in TGF- β signalling remain to be elucidated. Several studies have described the expression profiles of endoglin and TGF- β receptors on macrovascular endothelial cells [16,31,33,51]. However, such studies on microvascular endothelial cells are few, and in these studies endoglin was not detected by affinity labelling [33,52]. On the other hand, increased immunostaining with endoglin-specific antibody, of angiogenic areas such as healing wounds and tumour endothelial cells has been reported [53,54]. Defining the expression of endoglin and its contribution to the TGF- β receptor complex on microvascular endothelial cells are critical for understanding endoglin function in endothelial cells. The initial interactions of endoglin with the other TGF- β receptors at the membrane level may be of critical importance in this regard.

Two of the most important findings in the present study are that betaglycan and endoglin are co-expressed at relatively high amounts on human microvascular endothelial cells, and that endoglin forms a complex with betaglycan on these cells. Although endoglin has been shown to interact with the type II and/or type I TGF- β receptors [16,17,20], this is the first time that endoglin has been shown to form a complex with its homologue, betaglycan. In addition, we demonstrate that three higher order receptor complexes containing endoglin, type II and/or type I TGF- β receptors, occur on these cells. Studies analysing the interactions between TGF- β receptors and the stoichiometry of the signalling complex used mainly cell mutants

or cells over-expressing these receptors or chimeric receptors [55–57]. In the present study, normal TGF- β responsive human microvascular endothelial cells were used to demonstrate the association of endoglin with betaglycan, and the formation of higher order complexes containing endoglin and TGF- β signalling receptors. Thus, these results illustrate that these associations occur at physiological receptor concentrations and ratios.

The microvascular endothelial cells used in the present study are responsive to TGF- β as shown by the TGF- β -induced stimulation of cell signalling (Fig. 1A and B) and by the TGF- β -induced autoregulation of receptors (Fig. 1C). Although all of the TGF- β receptor complexes exhibited a much higher binding affinity for TGF- β 1 than for TGF- β 2 (Fig. 2A), both isoforms down-regulated the receptors with similar potency (Fig. 1C). The failure to observe significant difference between the two TGF- β isoforms in the down-regulation of receptors may be explained by the data which suggest that a portion of the betaglycan exists in a state in which they can bind TGF- β 2 with high affinity. This receptor state becomes detectable when ^{125}I -labelled TGF- β 2 is used for the affinity labelling procedure (Fig. 2B). Because betaglycan displays a higher affinity for TGF- β 2 under these conditions, this receptor via presentation of ligand or receptor hetero-oligomerization may be responsible for the obliteration of differences in the receptor down-regulation response between the two TGF- β isoforms.

The two-dimensional electrophoresis, in addition to providing information on the nature of the higher molecular mass receptor complexes, provided evidence indicating the occurrence of type I TGF- β receptor homodimers and type I and II TGF- β receptor heterodimers. The occurrence of such dimers on normal TGF- β responsive cells has been demonstrated previously using skin fibroblasts [42]. In the type I homodimer, a type I receptor molecule is cross-linked to each subunit of the ^{125}I -labelled TGF- β 1 dimer, and in the type I-II heterodimer, a type I receptor molecule is cross-linked to the one subunit while a

type II molecule is cross-linked to the other subunit of the ^{125}I -labelled TGF- β 1 dimer. The reducing agent disrupts the disulfide bond between the subunits of the TGF- β dimer, but not the cross-links between TGF- β and the receptor. Thus, after reduction, complexes composed of one receptor molecule and a ^{125}I -labelled TGF- β monomer are seen in the second dimension.

That ligand dependent complex formation may occur between endoglin and betaglycan was indicated by the immunoprecipitation studies which demonstrated co-immunoprecipitation of endoglin with the anti-betaglycan Ig, and that of betaglycan with the anti-endoglin Ig, under both reducing and nonreducing conditions. Western blot analysis confirmed that endoglin exists in a heteromeric complex with betaglycan on endothelial cells by demonstrating the immunodetection of endoglin in endothelial membrane extracts immunoprecipitated with anti-betaglycan Ig. In addition, as the latter study was performed in the absence of TGF- β , it suggested that formation of the endoglin/betaglycan complex can occur in a ligand-independent manner. Although immunoprecipitation results provided evidence for the occurrence of TGF- β -induced complex formation between endoglin and betaglycan, it was not possible to detect an endoglin/betaglycan heteromeric complex by SDS/PAGE. The very large molecular mass of such a complex and the highly heterogeneous nature of betaglycan will preclude the detection of that complex.

The observation that the betaglycan–endoglin association can occur in a ligand-induced manner and in a ligand independent fashion is intriguing. It can be argued that the association between betaglycan and endoglin observed in this study is a result of the type II receptor complexing with betaglycan as well as with endoglin. However, because betaglycan does not associate with the type II receptor in the absence of ligand [58], it is unlikely that the type II receptor is involved when betaglycan complexes with endoglin in the absence TGF- β . The significance of the complex formation between endoglin and its homologue, betaglycan, in TGF- β signalling remains to be determined. As it has been postulated that endoglin may diminish while betaglycan may augment TGF- β signal transduction [19], the interaction of endoglin with betaglycan may be required for maintaining the balance between positive and negative regulation of the TGF- β signalling pathway in the microvascular endothelial cells.

That the three TGF- β binding complexes observed at 240, 270, and 320 kDa detected under nonreducing conditions contain endoglin, type II and/or type I TGF- β receptors are based on the results from two-dimensional gel electrophoresis. The immunoprecipitation data supported this and confirmed the identities of the receptor components. As high molecular mass glycoprotein complexes are known to migrate anomalously on SDS/PAGE, the true molecular masses of the 240-, 270- and 320-kDa complexes are likely to be very different. While it is difficult to estimate the precise stoichiometry of these complexes, it is possible that they are derived from higher order complexes. Current evidence indicates that the TGF- β signalling complex is a heterotetramer consisting of one molecule each of the type I and type II receptor associated with each monomer of a TGF- β dimer molecule [59]. It is possible that endoglin associates with the heterotetrameric complex. In this scenario, several high molecular mass receptor complexes containing endoglin, type I and type II receptors can be formed depending on the efficiency of the individual receptor components to become cross-linked to the ^{125}I -labelled TGF- β 1 subunits. Alternatively, TGF- β receptor complexes of different subtypes and ratios may exist in parallel. Formation of TGF- β

receptor complexes of differing subtype composition and ratio may represent modes of regulating distinct TGF- β responses.

In conclusion, the present results demonstrate for the first time that endoglin forms a complex with betaglycan on human microvascular endothelial cells. In addition, the occurrence of three high molecular mass complexes containing endoglin, type II and/or type I TGF- β receptors has been demonstrated on these cells. Our findings suggest that endoglin may modify TGF- β signalling by interacting with betaglycan and with the TGF- β signalling receptors at physiological receptor concentrations and ratios.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank A. Forster, Department of Pharmacology, McGill University for photography. We also thank M. O'Connor-McCourt, Biotechnology Research Institute, Montreal, Quebec for the gifts of anti-type II and anti-type III receptor Ig. This work was supported by the Medical Research Council of Canada (A. P.; S. C.), and Heart and Stroke Foundation, Quebec (A. P.). A.P. is a recipient of a Chercheur Boursier scholarship from the Fonds de la Recherche en santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

1. Roberts, A.B. & Sporn, M.B. (1990) The transforming growth factor β s. In *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. (Sporn, M.B. & Roberts, A.B., eds), pp. 419–472. Springer-Verlag, New York.
2. Roberts, A.B. (1998) Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner. Electrolyte Metab.* 24, 111–119.
3. Proetzel, G., Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J., Ferguson, M.W. & Doetschman, T. (1995) Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* 11, 409–419.
4. Letterio, J.J. & Roberts, A.B. (1996) Transforming growth factor- β 1 deficient mice: identification of isoform specific activities *in vivo*. *J. Leuko. Biol.* 59, 769–774.
5. Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L. & Doetschman, T. (1997) TGF- β 2 knock out mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGF- β knockout phenotypes. *Development* 124, 2659–2670.
6. Franzen, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schultz, P., Heldin, C.H. & Miyazono, K. (1993) Cloning of TGF- β type I receptor that forms a heterodimeric complex with the type II TGF- β receptor. *Cell* 75, 681–692.
7. Lin, H.Y., Wang, X.-F., Ng-Eaton, E., Wainberg, R.A. & Lodish, H.F. (1992) Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a function transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68, 775–785.
8. Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F. & Massague, J. (1992) TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003–1014.
9. Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massague, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370, 341–347.
10. Wieser, R., Wrana, J.L. & Massague, J. (1995) GS domain mutations that constitutively activate T β R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J.* 14, 2199–2208.
11. Souchelnytskyi, S., ten Dijke, P., Miyazono, K. & Heldin, C.H. (1996) Phosphorylation of Ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1-induced cellular responses. *EMBO J.* 15, 6231–6240.
12. Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J., Lane, W.S. & Massague, J. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 67, 785–795.
13. Wang, X.F., Lin, H.F., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H.F. & Weinberg, R.A. (1992) Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell* 69, 797–805.

14. Lopez-Casillas, P., Wrana, J.L. & Massague, J. (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF- β signalling receptor. *Cell* 73, 1435–1444.
15. Gougos, A. & Letarte, M. (1988) Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J. Immunol.* 141, 1925–1933.
16. Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Moren, A., ten Dijke, P. & Miyazono, K. (1994) Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 269, 1995–2001.
17. Zhang, H., Shaw, A.R.E., Mak, A. & Letarte, M. (1996) Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)- β receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J. Immunol.* 156, 565–573.
18. Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almenro, N., Raab, U., Lopez, L.A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M. & Bernabeu, C. (1996) Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J. Cell Biol.* 133, 1109–1121.
19. Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L.M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L. & Bernabeu, C. (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- β . A comparative study with betaglycan. *J. Biol. Chem.* 273, 33011–33019.
20. Pece Barbara, N., Wrana, J.L. & Letarte, M. (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signalling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J. Biol. Chem.* 274, 584–594.
21. McAllister, K.A., Grogg, K.M., Johnson, D.W., Gallione, C.J., Baldwin, M.A., Jackson, C.E., Helmbold, E.A., Markel, D.S., McKinnon, W.C., Murrell, J. et al. (1994) Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type I. *Nat. Genet.* 8, 345–351.
22. Guttmacher, A.E., Marchuk, D.A. & White, R.I.J. (1995) Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* 333, 918–924.
23. Kumar, P., Wang, J.M. & Bernabeu, C. (1996) CD105 and angiogenesis. *J. Pathol.* 178, 363–366.
24. Shovlin, C.L. (1997) Molecular defects in rare bleeding disorders: hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb. Haemostasis* 78, 145–150.
25. Wirth, J.A., Pollak, J.S. & White, R.I. Jr (1996) Pulmonary arteriovenous malformations. *Curr. Pulmonol. Crit. Care Med.* 17, 261–298.
26. Pece, N., Vera, S., Cymmerman, U., White, R.I., Wrana, J.L. & Letarte, M. (1997) Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type I is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J. Clin. Invest.* 100, 2568–2579.
27. Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Umess, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B. & Wendel, D.P. (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534–1537.
28. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, W.S., Wakefield, L.A. et al. (1986) Transforming growth factor β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 4167–4171.
29. Gajdusek, C.M., Luo, Z. & Mayberg, M.R. (1993) Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- β 1: synergistic mediators of angiogenesis *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 157, 133–144.
30. Pepper, M.S., Vassalli, J.D., Orci, L. & Montessano, R. (1993) Biphasic effect of transforming growth factor- β 1 on *in vitro* angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 204, 356–363.
31. Segarini, P.R., Rosen, D.M. & Seyedin, S.M. (1989) Binding of transforming growth factor- β to cell surface proteins varies with cell type. *Mol. Endocrinol.* 3, 261–272.
32. Hirai, R. & Kaji, K. (1992) Transforming growth factor- β 1 specific binding proteins on human vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 201, 119–125.
33. Morello, J.P., Plamondon, J., Meyrick, B., Hoover, R. & O'Connor-McCourt, M.D. (1995) Transforming growth factor- β receptor expression on endothelial cells: heterogeneity of type III receptor expression. *J. Cell. Physiol.* 165, 201–211.
34. Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Bensen, L., McCarthy, T.L., Centrella, M. & Madri, J.A. (1996) Modulation of transforming growth factor β receptor levels on microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 97, 1436–1446.
35. McCarthy, S.A., Kuzu, I., Gatter, K.C. & Bicknell, R. (1991) Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. *Trends Pharm. Sci.* 12, 462–467.
36. Lee, K.H., Lawley, T.J., Xu, Y.L. & Swerlick, R.A. (1992) VCAM-1, ELAM-1, and ICAM-1 independent adhesion of melanoma cells to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 98, 79–85.
37. Madri, J.A. & Sankar, S. (1997) The biphasic effects of transforming growth factor β in angiogenesis. In *Tumour Angiogenesis* (Bicknell, R., Lewis, C.E. & Ferrara, N.), eds. pp. 239–249. Oxford University Press, Oxford.
38. Dickson, K., Philip, A., Warshawsky, H., O'Connor-McCourt, M. & Bergeron, J.J. (1995) Specific binding of endocrine transforming growth factor- β 1 to vascular endothelium. *J. Clin. Invest.* 95, 2539–2555.
39. Ades, E.W., Candal, F.J., Swerlick, R.A., George, V.G., Summers, S., Bosse, D.C. & Lawley, T.J. (1992) HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell. *J. Invest. Dermatol.* 99, 683–690.
40. Cornelius, L.A., Nehring, L.C., Roby, J.D., Parks, W.C. & Welgus, H.G. (1995) Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases. *J. Invest. Dermatol.* 105, 170–176.
41. Ribeiro, M.J.A., Phillips, D.J., Benson, J.M., Evatt, B.L., Ades, E.W. & Hooper, W.C. (1995) Hemostatic properties of the SV-40 transduced human microvascular endothelial cell line (HMEC-1), a representative *in vitro* model for microvascular endothelium. *Thrombosis Res.* 79, 153–161.
42. Tam, B.Y.Y. & Philip, A. (1998) Transforming growth factor- β receptor expression on human skin fibroblasts: dimeric complex formation of type I and type II receptors and identification of glycosyl phosphatidylinositol-anchored transforming growth factor- β binding proteins. *J. Cell. Physiol.* 176, 553–564.
43. Glick, A.B., Danielpour, D., Morgan, D., Sporn, M.B. & Yuspa, S.H. (1990) Induction and autocrine receptor binding of TGF- β 2 during terminal differentiation of primary mouse keratinocytes. *Mol. Endocrinol.* 4, 46–52.
44. Philip, A. & O'Connor-McCourt, M.D. (1991) Interaction of transforming growth factor- β with alpha-2-macroglobulin: Role in transforming growth factor beta clearance. *J. Biol. Chem.* 266, 22290–22296.
45. Dumont, N., O'Connor-McCourt, M. & Philip, A. (1995) Transforming growth factor- β receptors on human endometrial cells: Identification of the type I, II and III receptors, and glycosylphosphatidylinositol anchored TGF- β binding proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 111, 57–66.
46. Moustakas, A., Lin, H.Y., Henis, Y.I., Plamondon, J., O'Connor-McCourt, M.D. & Lodish, H.F. (1993) The TGF- β receptors types I, II and III, form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J. Biol. Chem.* 268, 22215–22218.
47. Gougos, A. & Letarte, M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265, 8361–8364.
48. MacKay, K., Robbins, A.R., Bruce, M.D. & Danielpour, D. (1990) Identification of disulfide linked transforming growth factor- β 1-specific binding proteins in rat glomeruli. *J. Biol. Chem.* 265, 9351–9356.
49. Bassing, C.H., Yingling, J.M., Howe, D.J., Wang, T.W., He, W.W., Gustafson, M.L., Shah, P., Donahoe, P.K. & Wang, X.F. (1994) A transforming growth factor- β type I receptor that signals to activate gene expression. *Science* 263, 87–89.
50. Panchenko, M.P., Williams, M.C., Brody, J.S. & Yu, Q. (1996) Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am. J. Physiol.* 270, L547–L558.
51. Cheifetz, S. & Massague, J. (1991) Isoform-specific transforming growth factor- β binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 266, 20767–20772.
52. Cai, J.-P., Falanga, V., Richard Taylor, J. & Chin, Y.-H. (1996) Transforming growth factor- β receptor binding and function are

- decreased in psoriatic dermal endothelium. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 225–231.
53. Letarte, M., Greaves, A. & Vera, S. (1995) CD105 (endoglin). In *Leukocyte Typing V* (Schlossman, S.F., Baumsell, L., Gilks, W. eds), pp. 1756–1759. Oxford University Press, Oxford.
54. Miller, D.W., Graulich, W., Karges, B., Stahl, S., Ernst, M., Ramaswamy, A., Sedlacek, H.-H., Muller, R. & Adamkiewicz, J. (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF- β -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int. J. Cancer* **81**, 568–572.
55. Laiho, M., DeCaprio, J., Ludlow, J.W., Livingston, D.M. & Massague, J. (1990) Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* **62**, 175–185.
56. Luo, K. & Lodish, H.F. (1996) Signaling by chimeric erythropoietin-TGF- β receptors: homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF- β receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *EMBO J.* **5**, 4485–4496.
57. Wells, R.G., Gilboa, L., Sun, Y., Liu, X., Henis, Y.I. & Lodish, H.F. (1999) Transforming growth factor - β induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/type II receptor complex in live cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 5716–5722.
58. Matsuzaki, K., Kan, M. & McKeehan, W.L. (1996) Reconstitution of a pentameric complex of dimeric transforming growth factor beta ligand and a type I, II III receptor in baculoviral-infected insect cells. *In Vitro Cellular Dev. Biology Animal* **32**, 345–360.
59. Massague, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* **67**, 753–791.