

CARLOS REYES MORENO

**INTERACTIONS CELLULE-CELLULE AU NIVEAU DES MÉTASTASES
OSSEUSES: IMPLICATIONS DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA
RÉACTION OSSEUSE ET LA CHIMIORÉSISTANCE TUMORALE**

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

MAI 1998

© Carlos Reyes Moreno, 1998



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-36318-X

Canada

RÉSUMÉ COURT

Le traitement des métastases osseuses d'origine mammaire et prostatique serait inefficace en partie à cause de leurs caractères hormono-indépendants et chimiorésistants. Les expériences portant sur la chimiorésistance des cellules métastatiques ostéophiles ont pu démontrer que des facteurs de survie sécrétés par les ostéoblastes (MG-63) possèdent la capacité de protéger les cellules hormono-indépendantes du cancer de la prostate (PC-3/AR-) contre l'apoptose induite par l'adriamycine. Les études portant sur le rôle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans l'interaction entre les cellules métastatiques du cancer de la prostate (cellules PC-3 et PA-III) et les ostéoblastes (cellules MG-63 et UMR-106) a permis de démontrer que l'activation du GR pourrait favoriser la régression de la tumeur, inhiber la réaction ostéoblastique subséquente, et modifier la production de facteurs de survie impliqués dans la résistance tumorale à la chimiothérapie. Ces résultats permettraient donc d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques dans la lutte contre le cancer .

RÉSUMÉ LONG

Le pronostic des cancers secondaires des os est fatal. Une approche thérapeutique efficace pour traiter les métastases osseuses requiert donc un grand nombre de données sur la biologie des métastases ostéophiles et une description détaillée des interactions pathogéniques entre les cellules tumorales et le tissu osseux. Dans le but d'étudier les interactions autocrines et paracrines impliquées dans la réaction osseuse et la chimiorésistance tumorale des métastases osseuses d'origine prostatique, nous avons utilisé plusieurs systèmes cellulaires *in vitro*. Ainsi, une étude a été réalisée sur la cytotoxicité de l'adriamycine, un agent chimiothérapeutique, dans les cellules métastatiques du cancer de la prostate, les cellules PC-3. Ces expériences, effectuées en monocouches (en présence et absence du MC MG-63 et les facteurs IGF-I et TGF β 1) et dans un système tridimensionnel en gel de collagène de type I (en présence et absence des ostéoblastes) ont démontré que les facteurs de survie dérivés des ostéoblastes possèdent la capacité de protéger les cellules PC-3(AR-) contre l'apoptose induite par l'adriamycine. Étant donné le caractère hormono-réfractaire du cancer métastatique de la prostate, nos travaux ont porté aussi sur le rôle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans les cellules humaines PC-3, une lignée androgéno-indépendante du cancer de la prostate, ainsi que dans les cellules ostéoblastoïdes humaines MG-63. Nous avons déterminé que les actions du GR dans l'inhibition de la prolifération de ces cellules impliquent une augmentation de l'expression du facteur de croissance TGF β 1 dans les cellules PC-3 et une augmentation de l'activation du TGF β 1 latent dans les cellules MG-63. Une autre étude chez le rat avec les cellules métastatiques du cancer de la prostate PA-III et les ostéoblastoïdes UMR-106 a démontré que l'activation du GR peut modifier les facteurs impliqués dans la réaction ostéoblastique et la chimiorésistance tumorale par de mécanismes impliquant une régulation de l'expression et/ou de l'activité de la protéase uPA et des facteurs TGF β 1 et IGF-I. L'ensemble de ces travaux pourrait donc constituer la base pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de cette pathologie, pour expliquer les effets bénéfiques de l'utilisation d'un traitement en glucocorticoïdes à un stade avancé du cancer de la prostate, et enfin pour étudier les mécanismes d'action de facteurs de survie afin de proposer de futurs traitements chimiothérapeutiques en ciblant les facteurs de survie dérivés des ostéoblastes.

À la mémoire de tous ceux
qui, par leurs conseils,
leurs bonnes attentions et intentions
m'ont permis de concrétiser mon rêve.
Voici le fruit de mon travail,
ma façon de leur dire merci.

À Hélène et Johany,
À ma mère et ma grand-mère.

AVANT-PROPOS

Il est venu le moment de compléter enfin une autre étape de ma carrière. Un projet de cinq ans aux études graduées qui aboutit aujourd'hui dans le manuscrit que vous lisez en ce moment. Prenez le temps de vous arrêter sur ces quelques lignes. Vous allez mieux vous situer dans le contexte de mes études et les hommes et les femmes qui ont longuement collaboré à l'accomplissement de mon projet. Depuis le début de mon association avec le Dr Michael Koutsilieris, mon directeur de recherches à la maîtrise et au doctorat, j'avais la certitude que la science est un domaine où tout est possible mais rien n'est absolument certain ! La preuve : à plusieurs reprises des résultats très intéressants se sont finalement avérés des artéfactes ou très difficiles à reproduire. Ainsi, sans trop désespérer, le Dr Koutsilieris m'a proposé d'étudier le rôle du récepteur des glucocorticostéroïdes dans la biologie des cellules humaines du cancer de la prostate et les ostéoblastes. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude d'un des problèmes de santé les plus difficiles à gérer par le corps médical : le cancer secondaire des os d'origine prostatique, et dans une certaine mesure à celui d'origine mammaire.

Comme la plupart de maladies graves, une connaissance de base au niveau cellulaire et moléculaire permet de bien définir la stratégie à adopter pour mieux traiter les patients qui en sont atteints. Un survol sur quelques faits actuels sur le cancer au Canada et sur les étapes de la cancérogenèse est présenté dans la première section de l'introduction. Par la suite, la physiologie du tissu osseux est abordé à la section deux. Cette section apprendra certainement au lecteur comment le tissu osseux est formé et quels sont les composantes qui sont affectées par la formation de foyers métastatiques. Les deux types de réaction que les cellules métastatiques produisent au niveau du tissu osseux sont abordées à la section trois. Les métastases du cancer de la prostate produisent une réaction qui affecte de préférence les cellules ostéoblastiques, responsables de la formation du tissu osseux. L'autre réaction, soit celle conduisant à la destruction de l'os, est typiquement observée par les métastases d'origine mammaire. Il s'agit en fait de la section portant sur le sujet et la problématique de nos études. Quelque soit la réaction que ces deux types de cancer produisent, un fait demeure : une fois implantée dans l'os la maladie atteint un niveau d'agressivité optimale : capacité d'invasion et métastatique accrue et résistance, entre autres, aux traitements anti-hormonal et chimiothérapeutique. Les traitements de second ligne ne sont alors que palliatifs visant surtout à atténuer la douleur des patients. Le problème est donc de taille et il faut, par tous les moyens possibles, trouver de nouvelles voies thérapeutiques.

Je tiens à remercier d'abord le Dr Michael Koutsilieris non seulement pour avoir guidé mes recherches mais aussi pour sa franche amitié, ses conseils et ses encouragements. Je lui souhaite une deuxième fructueuse carrière en Grèce à côté de ses enfants et d'Antigone, sa femme, que je remercie aussi pour son aide avec les résultats en immunohistochimie. Je remercie le Dr MV Govindan pour la précieuse aide technique apportée au cours de ma maîtrise. Je remercie également Mme Eliane Lavergne et M. Gilles Frenette à qui je dois mes premiers pas en culture cellulaire et toutes les autres techniques courantes en laboratoire. Je tiens à souligner la précieuse disponibilité de tout le matériel et l'équipement offert par le Centre de recherches en Endocrinologie Moléculaire et remercie son directeur, le Dr Fernand Labrie.

Je tiens à remercier le Dr Marie Audette pour toute l'attention qu'elle a porté à la pré-lecture de la thèse. Ces nombreux commentaires et corrections m'ont grandement guidé à la clarté du texte. Je remercie aussi, pour leur agréable compagnie, Isabelle, Frédéric, Jocelyn et Caroline. Je profite pour remercier pour ses conseils le Dr Roland Tremblay, directeur du Laboratoire en Biorégulation Hormonale, mon premier laboratoire d'accueil. Je remercie en passant le Centre de Recherche du CHUL et le FRSQ-FCAR pour leur soutien financier au cours de mes études.

Je remercie toute l'équipe en Infographie et en Photographie Médicale : France Couture, Marie-Claude Bouthot, Gilles Chabot, Marc Auger, Bertrand Vaillancourt, Marjolaine Rondeau et les autres, pour leur précieuse aide à la préparation des diapos, des images et les nombreux montages au cours de mes études.

Enfin, j'adresse des remerciements très particuliers à mes deux complices à la maison, Hélène et Johany, pour leur soutien moral et physique et qui ont longuement souffert de mon absence au cours de la rédaction de ma thèse. À ces deux-là je leur dit : Tenez bon! Je finis! Je suis tout à vous maintenant !

TABLE DES MATIÈRES

	<u>page</u>
AVANT-PROPOS.....	i
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iv
INTRODUCTION.....	1
1 <u>CANCER ET MÉTASTASES</u>	2
1.1 Le cancer	3
1.1.1 Actualité sociale et économique du cancer	3
1.1.2 Contexte historique du cancer	4
1.1.3 La cellule cancéreuse.....	6
1.1.4 Les causes du cancer.....	7
1.1.5 Contexte actuel en cancérogenèse.....	8
1.2 Le processus métastatique	15
1.2.1 L'invasion locale.....	15
1.2.1.1 <i>Le détachement</i>	15
1.2.1.2 <i>La migration vers le tissu adjacent</i>	16
1.2.2 La néovascularisation tumorale.....	18
1.2.3 L'invasion à distance: les métastases	21
1.2.3.1 <i>L'adhésion des cellules cancéreuses aux parois</i> <i>des cellules endothéliales</i>	21
1.2.3.2 <i>L'entrée dans les vaisseaux sanguin et lymphatique</i>	22
1.2.3.3 <i>La dissémination à travers les voies sanguine</i> <i>et lymphatique</i>	22
1.2.3.4 <i>L'arrêt dans un organe-cible</i>	23
1.2.3.5 <i>Le développement des cellules métastatiques</i>	24
2 <u>PHYSIOLOGIE DU TISSU OSSEUX ET CANCER</u>	26
2.1 Structure, fonction et homéostasie osseuse	26
2.1.1 <i>Structure osseuse</i>	26
2.1.2 <i>La vascularisation osseuse</i>	28
2.1.3 <i>Les cellules du tissu osseux</i>	28
2.1.4 <i>Le remodelage du tissu osseux</i>	29

2.1.5	<i>La régulation du remodelage osseux</i>	29
2.2	Hormones stéroïdes et physiologie osseuse	31
2.2.1	Production et régulation des hormones stéroïdes.....	31
2.2.2	Mécanismes d'action moléculaire des hormones stéroïdes.....	32
2.2.3	Rôle des hormones stéroïdes dans l'homéostasie osseuse.....	36
2.2.3.1	<i>Les glucocorticostéroïdes</i>	36
2.2.3.2	<i>Les œstrogènes</i>	38
2.2.3.3	<i>Les androgènes</i>	39
2.3	Facteurs de croissance peptidiques et physiologie osseuse	40
2.3.1	Les IGFs (insulin-like growth factors type I and II).....	40
2.3.1.1	<i>Production et sécrétion des IGFs</i>	40
2.3.1.2	<i>Mécanismes d'action des IGFs</i>	41
2.3.1.3	<i>Rôle des IGFs dans la physiologie osseuse</i>	42
2.3.2	Les TGFβs.....	43
2.3.2.1	<i>Production et sécrétion des TGFβs</i>	43
2.3.2.2	<i>Mécanismes d'action des TGFβs et ses récepteurs</i>	44
2.3.2.3	<i>Rôle des TGFβs dans la physiologie osseuse</i>	45
2.3.3	IGFs et TGFβs : récepteurs et voies de signalisation.....	46
2.3.3.1	<i>Facteurs de croissance et phénomène de conversation croisée</i>	48
2.4	Matrice extracellulaire osseuse et facteurs de croissance	49
3	<u>LES MÉTASTASES OSSEUSES</u>	51
3.1	Les métastases ostéoblastiques : le modèle du cancer de la prostate	51
3.1.1	Genèse et progression du cancer de la prostate.....	52
3.1.1.1	<i>Les mutations génétiques à l'origine du cancer de la prostate</i>	52
3.1.1.2	<i>Rôle des androgènes et des interactions épithélium/stroma dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate</i>	53
3.1.2	Modes de propagation des métastases du cancer prostatique.....	56
3.1.3	Développement des métastases du cancer de la prostate et réaction ostéoblastique.....	56
3.1.4	Rôle de la MEO et des protéases tumorales dans le développement des métastases du cancer de la prostate et la réaction ostéoblastique.....	60
3.2	Les métastases ostéolytiques : le modèle du cancer du sein	63
3.2.1	Le cancer du sein: origines, développement et progression.....	63
3.2.2	Modes de propagation des métastases du cancer du sein.....	66

3.2.3	Développement des métastases osseuses du cancer du sein et réaction ostéolytique.....	67
3.3	Thérapies anticancéreuses du cancer métastatique et résistance aux thérapies systémiques: le modèle du cancer de la prostate	72
3.3.1	Le traitement hormonal.....	72
3.3.2	La résistance au traitement hormonal.....	73
3.3.2.1	<i>Le récepteurs des androgènes: mutations et amplifications.....</i>	<i>73</i>
3.3.2.2	<i>Mécanismes alternatifs de résistance à l'hormonothérapie.....</i>	<i>74</i>
3.3.2.3	<i>Bcl-2 et la résistance à l'hormonothérapie.....</i>	<i>76</i>
3.3.3	Le traitement chimiothérapeutique	78
3.3.4	La chimiorésistance tumorale.....	78
3.3.4.1	<i>Rôle de la glycoprotéine-P.....</i>	<i>79</i>
3.3.4.2	<i>Rôle de bcl-2 et p53.....</i>	<i>80</i>
3.3.4.3	<i>Rôle des IGFs.....</i>	<i>82</i>
3.3.4.4	<i>Rôle des TGFβs.....</i>	<i>83</i>
4	<u>HYPOTHÈSE, OBJECTIFS ET MODÈLES DE TRAVAIL.....</u>	85
4.1	Problématique et sujet d'étude.....	85
4.2	Hypothèse de travail et objectifs.....	85
4.3	Cancer métastatique du cancer de la prostate et modèles d'études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	87
5	<u>CHAPITRE I</u>	
	Les facteurs de survie dérivés des ostéoblastes protègent les cellules PC-3 du cancer de la prostate contre l'apoptose induite par l'adriamycine.....	90
6	<u>CHAPITRE II</u>	
	L'activité biologique du récepteur des glucocorticoïdes est effectué via l'expresion du facteur transformant de type beta 1 (TGFβ1) dans les cellules humaines du cancer de la prostate PC-3.....	114

7 CHAPITRE III

L'activité biologique du récepteur des glucocorticoïdes est médiée par l'activation de la forme latente de TGF- β 1 (latent transforming growth factor beta 1) dans les cellules MG-63.....140

8 CHAPITRE IV

L'activité biologique du récepteur des glucocorticoïdes agirait comme modulateur des interactions cellule-cellule au niveau des métastases ostéoblastiques chez le rat160

CONCLUSION.....193

BIBLIOGRAPHIE.....206

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH : Adrenocorticotropie hormone
ADN : Acide désoxiribonucléique
ADR : Adriamycine
AIF : Apoptosis-inducing factor
AMPC : Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 : Activating protein-1
Apaf : Apoptosis protease-activating factor
AR : Androgen receptor
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATF : Amino-terminal factor
ATP : Adénosine triphosphate
BPH : Hyperplasie bénigne de la prostate
BRCA : Breast cancer susceptibility gene
CAT : Choramphenicol acetylated-transferase
CDK : Cycline-dependent kinase
CM : Conditionned media
CPP32 : Cystein protease protein-32
CRH : Corticosteroid-releasing hormone
CT : Calcitonine
DBD : DNA binding domain
DEXA : Dexaméthasone
DHEA : Dihydroépiandrostendione
DHT : Dihydrotestosterone
DPC-4 : Deleted in pancreatic carcinoma-4
DR-3 : Death receptor-3
EGF : Epidermal growth factor

EPO : Erythropoïétine

ER : Estrogen receptor

ERK : Extracellular regulated kinase

FADD : Fas-associating protein with death domain

FGF : Fibroblast growth factor

FGFBP : FGF binding protein

GADD45 : Growth arrest and DNA damage inducible protein-45

GCs : Glucocorticostéroïdes

GFD : Growth factor domain (or ATF of uPA)

GH : Growth hormone

GM-CSF : Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor

GnRH : Gonadotropin-releasing hormone

GR : Glucocorticoid receptor

Grb-2 : Growth factor receptor-bound protein-2

HBD : Hormone binding domain

HGIPN : High-grade intraepithelial prostatic neoplasia

hK2 : human kallikrein-2

(β)-HSD : beta-hydroxysteroid dehydrogenase

HSP : Heat shock protein

HRE : Hormone response element

ICE : Interleukin-1 β -converting enzyme

IGF : Insulin-like growth factor

IGFBP : IGF binding protein

IL : Interleukin

IRS-1 : Insulin receptor substrate-1

JNK : jun N-terminal protein kinase

KDa : Kilodalton

KGF : Keratinocyte growth factor
LAP : Latent-associated protein
LH : Leutinizing hormone
LHRH : Leutinizing hormone-releasing hormone
LIF : Leukemia inhibitory factor
LOH : Loss of heterozygosity
LTBP : Latent-TGF binding protein
MAP-kinase : Mitogen-activated protein kinase
MAPKKK : MAP kinase kinase kinase
MB : Membrane basale
mdm2 : Murine double minutes-2
MDR : Multidrug resistance phenotype
MEC : Matrice extracellulaire
MEO : Matrice extracellulaire osseuse
 μM : micro(10^{-6}) molaires
MMP : Matrix metalloproteinase
MMTV : Mouse mammary tumor virus
NK- κB : Nuclear factor-kappaB
NGF : Nerve growth factor
NK : Natural killer
nM : nano(10^{-9}) molaires
OB : ostéoblaste
OC : Ostéoclaste
PA : Plasminogen activator
PAI : plasminogen activator inhibitor
PAP : Prostatic acidic phosphatase

PARP : Poly(ADP)-ribose polymerase

PCR : Polymerase chain reaction

PDGF : Platelet derived growth factor

pg/mL : pico(10^{-12})grammes/millilitre

PI-3 : Phosphatidylinositol-3

PKA : protein kinase A

PKC : protein kinase C

PSA : Prostatic specific antigen

PTH : Parathyroid hormone

PTHrP : PTH-related peptide

RB : Rétinoblastome

SAPK : Stress-activated protein kinase

SH-2 : Src homology domain

Shc : SH2 containing protein

snRNP : small nuclear Ribonucleic-protein

tk : thymidine kinase

TIMP : Tissue inhibitor metalloproteinase

TNF : Tumor necrosis factor

tPA : tissu-type plasminogen activator

TRAF : TNF receptor-associated factor

TRAIL : TNF-related apoptosis induced ligand

TSP : Thrombospondine

uPA : urokinase-type plasminogen activator

VEGF : Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

1 CANCER ET MÉTASTASES

Entre 1990 et 1994, le taux de mortalité par cancer de la prostate a diminué d'environ 0,5% par année, en Amérique du Nord [1]. En 1996, 317 100 nouveaux cas ont été diagnostiqués, comparativement à 184 500 qui seront diagnostiqués en 1998. Cette diminution serait attribuable, entre autres, au dépistage par le PSA et l'analyse transrectale aux ultrasons [1]. Cependant, malgré les efforts pour détecter et traiter le cancer de la prostate à un stade précoce et curable de la maladie, 39 200 patients mourront cette année, aux Etats-Unis, comparativement à 41 200 patients morts en 1996 [1]. La lutte contre le cancer de la prostate, à même titre que le cancer du sein, constitue encore de nos jours une préoccupation majeure pour un grand nombre des cliniciens et des chercheurs partout dans le monde.

L'un des aspects le plus critique du cancer constitue l'émergence de métastases car à ce stade de la maladie les traitements disponibles sont, pour la grande majorité des cancers, à caractère palliatif. Lors du diagnostic, les métastases sont souvent trop petites pour être détectées (< 5mm de diamètre) et la tumeur peut alors être extirpée par chirurgie avec possibilité de guérison. Hélas! Dans près de 50 % des cas, l'excision chirurgicale de la tumeur primaire n'est pas curative en raison de la présence des métastases. Parmi les cancers secondaires, les métastases osseuses sont les plus fréquentes. Environ la moitié de tous les cancers produisent des métastases au niveau des os. Par contre, certains démontrent une ostéophilie très marquée: surtout les cancers du sein et de la prostate, puis ceux du rein, du poumon et du corps thyroïde.

Puisque le développement du cancer secondaire des os est particulièrement critique pour la survie de patients, les futures interventions thérapeutiques doivent tenir compte des principes physiques et des mécanismes biologiques qui permettent l'implantation et le développement de cellules tumorigènes au niveau des os. Un grand nombre de ces renseignements peuvent être obtenus en approfondissant nos connaissances sur la biologie de cellules métastatiques ostéophiles, sur les interactions paracrines et autocrines entre ces dernières et le tissu osseux en regard de la réaction osseuse et de la résistance tumorale aux traitements effectifs proposés tels que l'hormonothérapie et la chimiothérapie.

1.1 LE CANCER

1.1.1 Actualité sociale et économique du cancer

Le cancer constitue aujourd'hui la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés, après les maladies cardio-vasculaires [1]. Au Canada, on avait estimé à 130 800 les nouveaux cas de cancer et à 60 700 les décès dus à cette maladie en 1997 [2]. Le cancer frappe surtout les personnes âgées, puisque 71% des nouveaux cas et 80% des décès dus à cette maladie surviennent dans la population âgée d'au moins 60 ans. Au cours de la vie, une femme canadienne sur 9 sera atteinte du cancer du sein, une sur 18 du cancer du côlon ou du rectum et une sur 21 présentera un cancer du poumon. En ce qui concerne les hommes, 1 sur 8 sera atteint du cancer de la prostate, principalement après l'âge de 70 ans, et 1 sur 11 sera atteint du cancer du poumon. Le cancer du sein chez la femme et le cancer de la prostate chez l'homme sont les formes de cancer les plus courantes au Canada et la deuxième cause de mortalité par cancer dans chaque catégorie de sexe, après le cancer du poumon. En 1994, l'Institut National du Cancer du Canada a estimé que le cancer a entraîné la perte globale de 891 000 années potentielles de vie. Selon cette mesure, le cancer est la principale cause de mortalité prématurée au Canada, donnant lieu à 28.9% des décès prématurés [2,3].

En 1993, sur le plan économique, le cancer occupait la quatrième place au Canada, en terme de dépenses attribuées aux soins des maladies, derrière les maladies cardio-vasculaires, les maladies respiratoires et les maladies digestives. Pour cette année, sur les 68 milliards de dollars dépensés pour les soins de santé, 3,5 milliards (5%) ont été dépensés pour les soins liés au cancer. Sur ce montant, 2,7 milliards (79%) ont été attribués aux soins hospitaliers, 435 millions (12%) aux salaires des médecins, environ 234 millions (7%) pour les drogues anticancéreuses administrées aux patients et 72 millions (2%) pour la recherche sur le cancer [3].

Aujourd'hui, bien que près de 50% des patients peuvent être sauvés et que les taux comparatifs d'incidence et de mortalité ont régressé ou sont restés constants pour certains types de cancer, il demeure que le fardeau du cancer a augmenté au Canada [2]. À la lumière de ces données, il nous apparaît que la société devrait, de toute évidence, porter une attention particulière à cette maladie qui, malgré nos croyances, n'est pas une maladie contemporaine due à l'industrie ou à la modernité, mais principalement à la croissance et au vieillissement de la

population, parfois aux facteurs héréditaires et même souvent en raison de nos habitudes de vie comme le tabagisme et l'alcool.

1.1.2 Contexte historique du cancer

Le cancer est une pathologie cellulaire inhérente à la vie et l'on doit s'attendre à une évolution de cette maladie en parallèle à la vie sur terre. Par ailleurs, des paléontologistes ont trouvé un dinosaure vieux d'un million d'années avec un cancer osseux sur un fragment de la queue ainsi qu'une tumeur osseuse située à l'extrémité supérieure du fémur d'un anthropoïde exhumé à Java en 1891 [4]. En Égypte, des sarcomes de l'humérus et du fémur ont été retrouvés sur des momies datant de la IV^e dynastie égyptienne, qui a régné de 2900 à 2700 av. J.-C. [4,5].

Plusieurs papyrus découverts au XIX^e siècle ont montré que le cancer, ses symptômes et son traitement constituaient une grande préoccupation des gens à l'époque de l'Égypte ancienne: ils y réfèrent clairement aux tumeurs du cancer du sein [4,5]. Cependant, même si le cancer était reconnu à cette époque, on distinguait avec difficulté une tumeur bénigne ou maligne d'un simple abcès ou encore d'une inflammation purulente. Au cours de l'âge d'or de la Grèce antique au Ve siècle, Hyppocrate proposait que "*chaque maladie a une cause naturelle et que sans cause naturelle aucune maladie ne se produit*" permettant ainsi de démystifier l'art de guérir associé jusqu'alors à la divinité ou à la sorcellerie [4,5]. Il a d'ailleurs décrit plusieurs tumeurs comme celles du cancer du sein, de l'estomac et de l'utérus. Ses observations l'ont même amené à penser "*qu'il est préférable de n'appliquer aucun traitement au malade atteint de cancer occulte, en effet si on le traite, sa mort est rapide et si on ne le traite pas, sa vie est prolongée*" [4,5]. Après sa mort, la médecine grecque resta stagnante et c'est à Alexandrie que se poursuivit la recherche scientifique. Parmi les étudiants formés à Alexandrie, Galien s'est illustré en écrivant près de 400 ouvrages de médecine dont *Le traité des tumeurs* où il donnait une excellente description de ce que peut être une métastase et il proposait, lorsque la maladie est avancée, des infusions de têtes de pavot (opium) pour calmer la douleur. Il décrivait également les tumeurs carcinomateuses comme des tumeurs qui apparaissent dans toutes les parties du corps et principalement au niveau des seins chez la femme.

Au Moyen Âge, la médecine est devenue sous le contrôle de l'Église de sorte que les connaissances et les traitements du cancer ont connu une longue période de stagnation. À partir de la Renaissance, les sciences médicales se sont enfin installées sur des bases solides et

l'anatomie, surtout, avançait à pas de géant grâce à la permission de disséquer des cadavres [4,5]. En France, le chirurgien Ambroise Paré, grâce aux connaissances anatomiques répandues à l'époque, conseillait " *d'extirper le cancer par l'oeuvre manuelle du chirurgien dans le cas où il est petit et puisse être amputé* ". C'est à cette époque aussi que Galilée a mis au point son microscope qui a permis par la suite l'observation des cellules cancéreuses. Plus tard, Malpighi jeta les bases de l'histologie et Leeuwenhoek devint, en 1683, le père de la bactériologie en découvrant les premiers micro-organismes [4,5].

Au XVIII^e siècle, l'anglais William Harvey fit la découverte de vaisseaux sanguins et démontra expérimentalement la circulation sanguine. À la même époque, le chirurgien allemand Hildanus réussit à extirper des ganglions lymphatiques à la suite d'une opération pour un cancer du sein [5]; au Québec, le chirurgien Michel Sarrazin effectua la première mastectomie totale, en Amérique du Nord à l'Hôtel-Dieu de Québec, sur une religieuse Augustine en 1766 [4]. En Angleterre, en 1775, Percival Pott, le tuteur de l'oncologie expérimentale, établit à Londres une relation entre la profession de ramoneur, l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et le cancer du scrotum [4,5].

Le XIX^e siècle fut marqué par les travaux de Virchow qui, en se penchant sur l'origine du cancer et l'envahissement, proposa que toute cellule doit naître d'une autre cellule. Il proposa aussi pour la première fois l'existence d'une prédisposition héréditaire au cancer, d'une relation entre le tissu cancéreux et le tissu embryonnaire indifférencié et l'existence d'un mécanisme métastatique [4,5]. Le 8 novembre 1895, Roentgen découvrit les rayons X ainsi que certaines de ses applications. Dès 1896, on suggéra l'utilisation des rayons X pour le traitement du cancer du sein et des métastases [4]. Le travail de la fin du XIX^e siècle en chirurgie cancéreuse fut grandement amélioré grâce à l'oeuvre du chirurgien français Claude Bernard [4].

Au début du XX^e siècle, la recherche fut accentuée sur le développement de techniques permettant d'effectuer un diagnostic précoce du cancer et des médicaments ou de nouvelles méthodes pour le traiter [5]. Ainsi, en 1928, Georges Papanicolaou trouva une méthode de frottis vaginal pour détecter de façon précoce le cancer des ovaires et celui du col de l'utérus. Ce fut aussi le début de la culture cellulaire, de la découverte des agents cancérogènes, de la radiothérapie et de la chimiothérapie modernes. Cependant, ce n'est qu'après la Seconde Guerre mondiale que la chimiothérapie connut des succès grandissants: en 1947, Sydney Farber trouve qu'un dérivé de l'acide folique inhibe la leucémie aiguë; en 1948, Georges Hitchings synthétise par des procédés de chimie organique le *cis*-mercaptopurine pour traiter la leucémie infantine.

En 1964, le premier virus lié au cancer humain, soit le virus d'Epstein-Barr, fut mis en évidence dans le développement du lymphome de Burkitt. Hubner et Todaro proposèrent alors l'hypothèse que le développement tumoral chez l'humain était aussi lié aux oncogènes [4].

Depuis les années 1950, la science a connu une période ininterrompue de grandes découvertes. Notamment, la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick ainsi que les enzymes de transcription et la transcriptase inverse par Temin et David Baltimore. Toutes ces découvertes permirent, entre autre, le développement de la biologie moléculaire et celui de certaines applications en biotechnologie. De nos jours, avec le développement de nouvelles biotechnologies, de la biologie moléculaire, du génie génétique et les progrès accomplis en chirurgie, en radiothérapie et en chimiothérapie, pour ne nommer que ceux-là, nous sommes en meilleure position pour comprendre et combattre le cancer à l'aube du prochain millénaire. Grâce à tous ces pionniers, les connaissances actuelles permettront et permettent déjà d'élucider les mécanismes qui influencent le développement, le contrôle de la prolifération de la cellule cancéreuse et l'envahissement des organes périphériques.

1.1.3 La cellule cancéreuse

Le cancer pourrait être défini comme étant une maladie intrinsèque de la cellule qui se répercute à un moment donné sur tout l'organisme. Elle serait reliée à la multiplication d'un clone de cellules dites "*transformées*" qui échappent aux systèmes coordonnés normaux de régulation de la différenciation et de la prolifération et qui aboutissent à la formation d'une tumeur, souvent maligne et génétiquement hétérogène, dont l'évolution et l'envahissement local et à distance serait fatal pour l'organisme tout entier. La cellule cancéreuse constitue donc l'unité de base du processus cancéreux, d'où l'importance d'en décrire au moins ses principales caractéristiques phénotypiques [6,7].

La cellule cancéreuse conserve, en fonction de son niveau de différenciation, quelques caractéristiques de son tissu d'origine (la sécrétion de mucus dans l'épithélioma glandulaire par exemple). Les cellules cancéreuses ont un taux de prolifération cellulaire anormal et anarchique. En culture cellulaire, leur besoin en sérum est moins élevé que les cellules normales. Leur prolifération, quoique hypothétiquement illimitée, est fragile car on observe une importante mort cellulaire par hypoxie au centre des tumeurs. Le cytoplasme des cellules cancéreuses est souvent très basophile et leurs noyaux sont souvent volumineux, irréguliers et parfois multiples ce qui

explique une augmentation du rapport noyau/cytoplasme. Les cellules cancéreuses présentent de fréquentes aberrations chromosomiques, surtout de type hyperploïde. La cellule cancéreuse a la capacité d'induire des tumeurs lorsqu'injectées dans des souris immuno-tolérantes dites *nudes*.

La cellule cancéreuse consomme beaucoup plus de glucose qu'il ne lui est possible d'en métaboliser efficacement. Cet état la conduit à sécréter, par glycolyse anaérobie, de grandes quantités d'acide lactique (phénomène de Warburg). D'autre part, la cellule cancéreuse produit des quantités anormales de certains enzymes cellulaires normaux et certaines cellules tumorales sécrètent des facteurs qui altèrent leur propre croissance, tels que les TGFβs, et des facteurs angiogéniques, tel que le FGF-2. Ces facteurs sont supposés être impliqués dans l'établissement du phénotype transformant, dans l'invasion et le processus métastatique de nombreux cas de cancer.

Durant le processus de carcinogénèse, un grand nombre de gènes reliés au développement sont réexprimés chez la cellule cancéreuse. Ainsi, leurs membranes externes comportent des antigènes oncofœtaux mutés surexprimés. Ce phénomène, appelé "*expression de gènes oncodéveloppementaux*", procure à la cellule des propriétés immunologiques particulières. La cellule cancéreuse se caractérise aussi par une perte de l'inhibition de contact. Ce phénomène est aisément mis en évidence en culture car les cellules cancéreuses peuvent s'empiler et continuer à proliférer, même en suspension, après et parfois même avant que la couche cellulaire atteigne la confluence. De plus, les cellules cancéreuses perdent leur capacité normale d'adhérence ce qui les rend incapables de se localiser auprès de leur voisins cellulaires appropriés, favorisant ainsi le processus invasif et métastatique .

1.1.4 Les causes du cancer

Tel que rapporté dans la partie historique du cancer, l'un des premiers facteurs cancérogènes connus a été mis en évidence par Percival Pott en 1776. Il découvra alors que le cancer du scrotum chez les ramoneurs londoniens était causé par la suie incrustée dans les cheminées [4]. De nos jours, on connaît un grand nombre des facteurs cancérogènes, mais on n'a pas encore réussi à bien déterminer les mécanismes d'action du processus transformant de ces agents. Les principaux facteurs cancérogènes comprennent des facteurs physiques, chimiques, génétiques ou héréditaires ainsi que les virus [6]. Ils sont rapportés au Tableau I où ils sont classés arbitrairement en facteurs endogènes et en facteurs exogènes.

Tableau I: Principaux facteurs cancérigènes.

A. Facteurs endogènes

1. Génétiques

- a. Cancers héréditaires: rétinoblastome, tumeur de Willms.
- b. Anomalies chromosomiques prédisposant au cancer: trisomie 21 (leucémie).

2. Endocriniens

- a. Hormones: œstrogènes (cancer du sein, de l'endomètre).
- b. Altération ou déficience immunitaire: augmentation de l'incidence des leucémies et des lymphomes (SIDA).

B. Facteurs exogènes

1. Chimiques

- a. Hydrocarbures polycycliques insaturés: tabac, suie (cancer du poulmon).
- b. Amines aromatiques: 2-naphtylamine (cancer de la vessie).
- c. Substances chimiques diverses: chlorure de vinyle (angiosarcome hépatique).
- d. Minéraux et métaux lourds: chrome, cadmium (cancer de la prostate).
- e. Agents " promoteurs ": alcool, ester de phorbol.

2. Physiques

- a. Radiations ionisantes: rayons X, radiations γ et β (cancer de la peau, du sein).
- b. Rayons ultraviolets (cancer cutanés).

3. Virus

- a. Virus à ADN: virus Epstein Barr (lymphome de Burkitt).
 - b. Virus à ARN (retrovirus): virus des leucémies T humaines (HTLV).
-

1.1.5 Contexte actuel en cancérogénèse

Les études réalisées avec des cancérogènes chimiques ont permis de démontrer que le développement du cancer pourrait se faire en étapes multiples : *l'initiation, la promotion et la progression* [6]. *L'initiation* est une étape pendant laquelle une ou des cellules subiraient des dommages irréversibles, surtout au niveau de l'ADN. *La promotion* est une étape réversible et non additive dont les agents promoteurs présents permettent une augmentation du taux de prolifération de foyers cellulaires initiés; cette étape est modulée par une variété de facteurs environnementaux, incluant la diète, l'âge, la balance hormonale, les processus inflammatoires et autres. *La progression* se définit par des changements associés avec une augmentation de la

croissance et du caractère envahissant et métastatique des cellules cancéreuses et par des altérations des caractéristiques biochimiques et structurales des tumeurs.

La découverte des virus cancérogènes, surtout chez les animaux, a permis de comprendre les mécanismes moléculaires de la cancérogenèse : les oncogènes. Cette théorie a été le fruit des travaux des virologistes dont Dulbecco qui détermina, en 1963, que les cellules normales peuvent acquérir le phénotype transformant suite à une infection par un virus tumorigène et par Temin et Baltimore qui, en 1970, démontrèrent que ces virus étaient capables de s'intégrer dans le génome cellulaire, via la transcriptase inverse. Kinzler et Vogelstein ont récemment proposé un modèle plus "global" des mécanismes causals de l'oncogenèse [7]. Ce modèle est représenté par deux types de gènes : les gènes *caretaker* ou de maintenance et les gènes *gatekeepers* ou gènes garde-barrières. Les premiers assurent l'intégrité du génome et comprennent l'ensemble de gènes de réparation, tels que les complexes d'excision de nucléotides, de réparation des mésappariements, les gènes de la famille ATM (gène muté responsable de l'ataxia telangiectasia), et probablement BRCA1 et BRCA2 (gènes de susceptibilité au cancer du sein et de l'ovaire). Les seconds contrôlent directement la croissance tumorale par leurs effets inhibiteurs de croissance ou leurs effets sur l'apoptose et correspondent, *grosso modo*, aux gènes suppresseurs de tumeurs. Selon le modèle proposé, le scénario serait le suivant : l'inactivation d'un gène de maintenance induit une instabilité génomique qui favoriserait l'apparition de mutations dans tous les gènes, y compris les gènes gardes-barrières. Si l'un de ceux-ci est inactivé, la progression cellulaire s'emballe en même temps que s'accroît l'instabilité génétique, synonyme de nouvelles mutations. Ainsi, les auteurs proposent que lorsqu'un individu hérite d'un allèle muté de gène de maintenance, il faut une seconde mutation de l'allèle normal de ce gène pour l'inactiver, et deux mutations supplémentaires d'un gène garde-barrière. Le risque pour ces individus de développer une tumeur serait alors de 5 à 50 fois plus élevé que pour les sujets normaux.

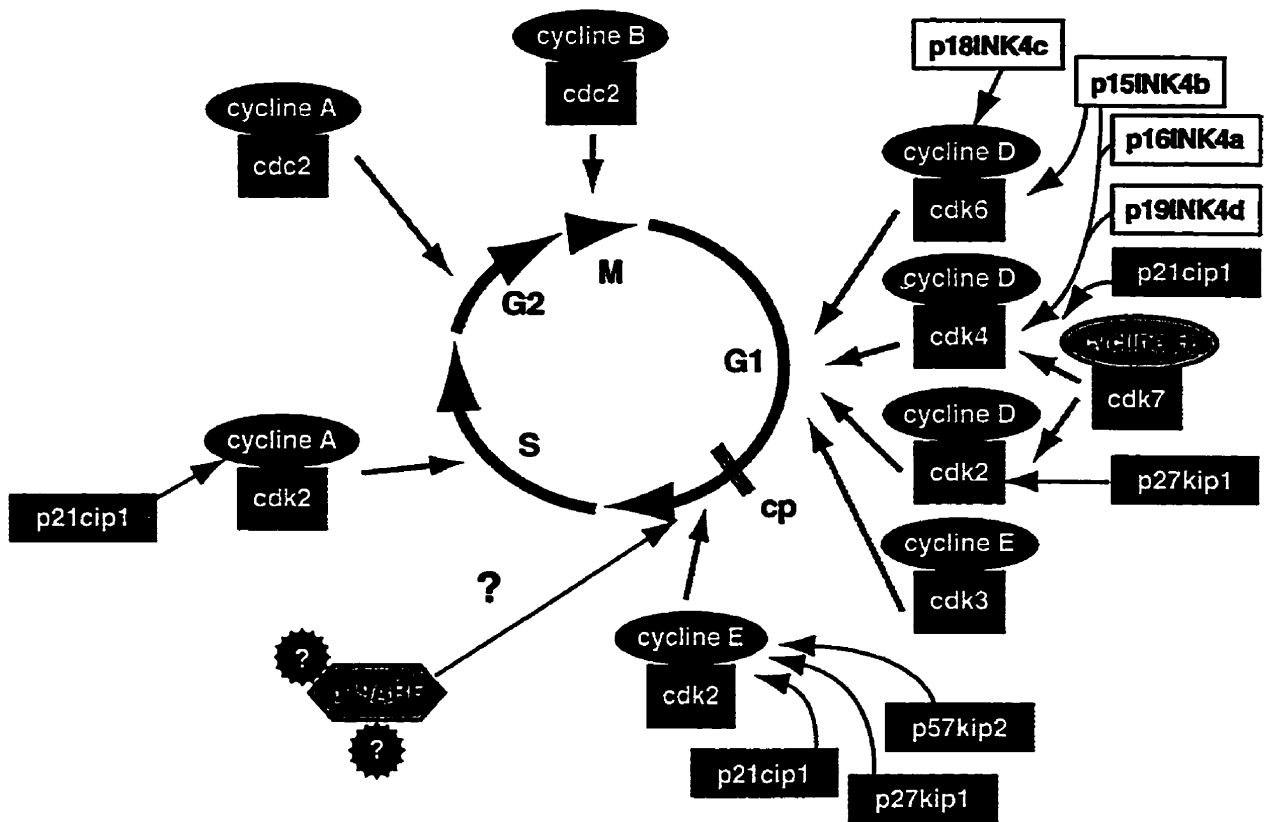


Figure 1.1 : Représentation simplifiée des phases du cycle cellulaire. Seulement les complexes cyclines-CDK (*cyclin-dependent kinase*) et les inhibiteurs des CDK ou CKI (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) sont représentés sur ce schéma. La dégradation des cyclines et d'inhibiteurs de certains complexes, l'autre étape essentielle de la progression dans le cycle n'est pas représentée. La protéine $p19^{ARF}$ codée par le transcrit alternatif β du gène $p16^{INK4a}$ (inhibiteur de CDK4/6) est également illustrée. Des partenaires de $p19^{ARF}$, à ce jour non identifiées, sont représentés par des étoiles avec un point d'interrogation. La protéine $p19^{ARF}$ arrête la progression du cycle en phase G_1/S (et peut-être en G_2/M). Le passage au travers du point de restriction (CP, *control point*) et l'entrée dans la phase S sont contrôlés par les CDKs, qui sont séquentiellement régulées par les cyclines D, E et A. La stimulation des cellules par les facteurs de croissance induit la production et l'assemblage de cyclines D (D1, D2 et D3) avec les kinases cdk4 et cdk6. Ces complexes phosphorylent des substrats, tel que le suppresseur du rétinoblastome (RB), dont la modification est requise pour la sortie en G_1 . Sous la forme phosphorylée, RB se dissocie des protéines E2Fs, une famille de régulateurs de la transcription de la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidine kinase (TK), la thymidylate synthétase (TS), la DNA polymérase- α (POL), la CDK2, la cycline E, possiblement la cycline A, et la E2F-1 elle-même. Ce processus établit alors un effet de rétroaction positive qui favorise la phosphorylation de RB par le complexe cycline E-CDK2, et qui contribue à l'irréversibilité de la restriction du point contrôle. Le déroulement de la progression se fait alors indépendamment de stimuli mitogènes. L'activité des complexes cyclines D-CDKs et la régulation par les protéines inhibitrices INK4, par exemple, sont donc essentielles dans la régulation du cycle au niveau du point de restriction. Les nombreuses mutations sur les produits de ces gènes donne du crédit au modèle généralement admis de leur participation à une voie commune définie comme la voie RB (*RB pathway*).

Les régulateurs du cycle cellulaire, particulièrement ceux qui contrôlent la progression cellulaire en phase G₁, constituent des cibles potentielles des processus oncogéniques (figure 1.1 [8]). Une des raisons est que les cellules restent sensibles à des stimuli mitogènes tant qu'elles n'ont pas atteint un point de restriction tardif (le point R). Passé ce point, elles deviennent refractaires à ces stimuli et la suite va se dérouler de façon autonome. Il est donc logique qu'une pression de sélection s'exerce en faveur d'une levée du blocage à ce niveau du cycle. L'incidence très élevée des lésions affectant les gènes RB (rétinoblastome), cycline D1, CDK(*cyclin-dependent protein kinase*)-4, p16^{INK4a} (inhibiteur spécifique de CDK4) et p27^{kip1} (inhibiteur de CDKs) dans un large spectre de tumeurs s'accorde avec cette interprétation [8].

Le gène p53 encode le suppresseur de tumeur le plus fréquemment inactivé dans les cancers humains. Les mutations que le gène comporte se concentrent surtout dans la région centrale correspondant au domaine de liaison à l'ADN, abolissant ainsi la capacité transactivatrice de la protéine [9]. Dans sa forme sauvage, le caractère multifonctionnel de p53 s'exerce via la stimulation d'une variété de gènes cibles. Les plus connus sont p21^{cip1} (inhibiteur du cycle cellulaire), cycline G₁ et RPA (réparation de l'ADN), mdm2 (antagoniste de p53), GADD45 (réplication et réparation de l'ADN), bax (pro-apoptotique) et bcl-2 (anti-apoptotique).

Des percées majeures en oncogénèse permettent actuellement de mieux comprendre le phénomène d'apoptose. La chronologie des grandes phases de l'apoptose comporte une phase de déclenchement du signal, une phase de contrôle et une phase d'exécution du signal (figure 1.2). Les mitochondries seraient impliquées dans le contrôle et l'exécution du signal [10,11]. Schématiquement, une cellule recevant un stimulus exogène (hormone, cytokine, agent pharmacologique, etc.) pourrait activer un récepteur de type fas/APO-1/CD95 ou l'un des récepteurs au TNF (*tumor necrosis factor*), soit le récepteur à TRAIL/APO-2 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ou le DR-3 (*Death receptor-3*) par exemple. Il s'ensuit la transmission d'un signal "de mort" via une série de protéines (de types FADD, TRADD, TRAF, etc.) interagissant physiquement avec les récepteurs par des domaines homologues (*death domain* ou DD, *death effector domain* ou DED) [12]. Ces signaux aboutissent à l'activation d'une cascade de protéases à cystéine connues désormais sous le nom de caspases. Les caspases situées au bout de la cascade (ICE/caspase 1, CPP32/caspase 3) vont dégrader toute une série de protéines effectrices vitales [10-12] : soit des composants de structures cellulaires (lamine A nucléaire), soit à des carrefours de fonctions cellulaires telles que le contrôle du cycle cellulaire (protéine Rb), au niveau des enzymes de réparation de l'ADN (protéine ku, PARP),

ou encore de la maturation de l'ARN messenger (protéine 70k de la snRNP U1). Les phases ultimes de l'apoptose sont caractérisées, entre autres, par une dégradation de l'ADN (multiples de 180-200 paires de bases) et par la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules normales adjacentes ou les macrophages (figure 1.2).

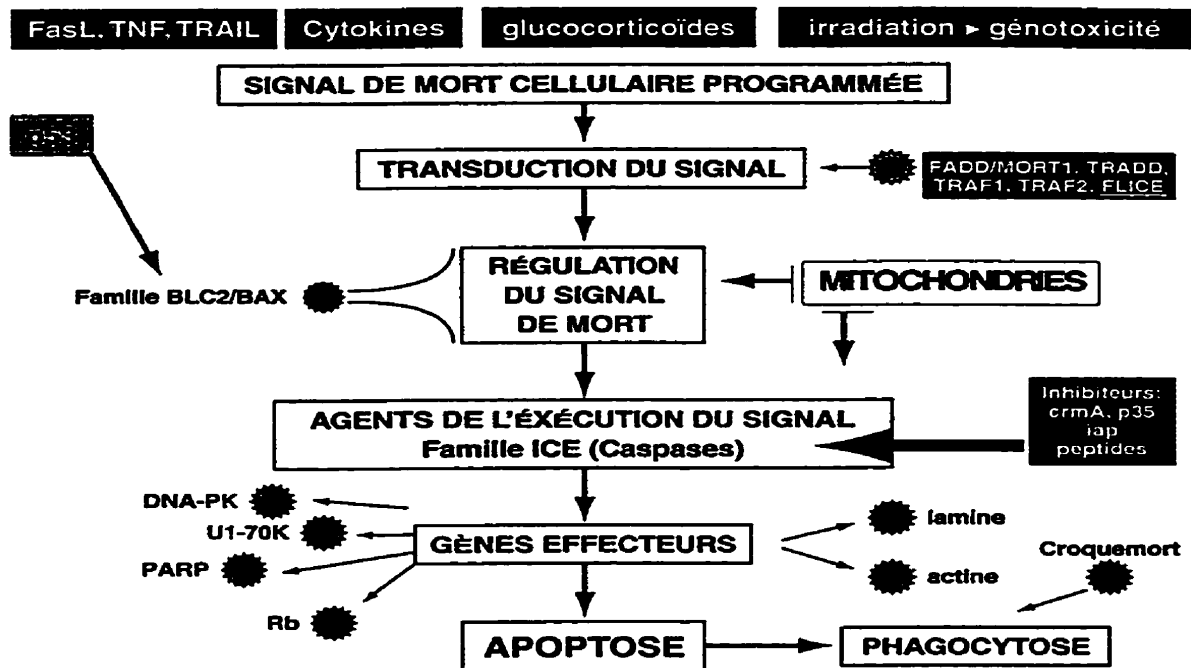


Figure 1.2 : Les étapes séquentielles de la mort cellulaire programmée, ou apoptose. Schématiquement l'apoptose peut être subdivisée en trois phases: une phase de réception du signal de mort cellulaire, une phase de contrôle du signal et une phase d'exécution du signal. Lorsqu'un signal de mort cellulaire endogène est captée par un récepteur à la surface, il est transduit vers l'intérieur de la cellule grâce à des protéines de types FADD, TRADD, TRAF, etc. Il en résulte une chute du potentiel transmembranaire des mitochondries qui relarguent dans le cytosol différentes molécules (cytochrome c, facteur AIF-1, etc.). Cette phase est contrôlée par des régulateurs anti-apoptotiques (bcl-2, bcl-xL) ou pro-apoptotiques (bax, bad, bak) capables de se lier aux membranes mitochondriales. Dans certaines conditions, l'absence de signaux de survie conduit à l'activation d'une cascade de protéases à cystéines, les caspases, dont les ultimes représentants dégradent des protéines cibles impliquées dans le maintien de l'intégrité structurale (lamine, actine) ou de l'homéostasie (prolifération, réparation de l'ADN, épissage de l'ARN messenger, etc.). Ces caspases sont spécifiquement régulées par différents inhibiteurs viraux (v-iap, crmA, p53) ou cellulaires (c-iap). Après la phase d'apoptose nucléaire, vient la phase d'élimination des "cadavres" assurée par des macrophages reconnaissant les cellules mortes. *"Les mitochondries seraient donc accusées de meurtre, les caspases de complicité et les macrophages de dissimulation de la preuve."*

Les travaux de Kroemer [13] ont démontré que la dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial survient précocement par rapport à la fragmentation nucléaire, et elle est détectable quelque soit l'inducteur de l'apoptose. L'analyse des mitochondries de cellules engagées en apoptose a mis en évidence une diminution de leur potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$), caractérisée par l'ouverture de mégapores. Chez les mammifères, comme chez les nématodes (*C. elegans*), les protéines de la famille Bcl-2/Bcl-X/Ced-9 inhibent l'apoptose à deux niveaux : régulation du passage d'ions ou de molécules pro-apoptotiques au travers de pores transmembranaires, et ancrage, au niveau des mitochondries, de protéines impliquées dans la transduction de signaux apoptotiques [11]. Les gènes de la famille BCL-2, composée des protéines protectrices de l'apoptose (bcl-2, bcl-x_L, Bag-1, Mcl-1) et des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bcl-x_S, Bad), seraient impliqués dans la phase réversible de l'apoptose. Leur effet régulateur s'effectue en amont de l'activation de caspases. La plupart de ces protéines seraient capables de s'incruster dans des membranes intracellulaires, notamment la membrane mitochondriale externe, le réticulum endoplasmique, l'enveloppe nucléaire, et former de canaux ioniques [14]. L'ouverture de mégapores mitochondriales semble finement réglée par bcl-2 et ses partenaires [15]. Cette régulation semble se définir comme suit : bcl-2 ou bcl-x_L (homologues de Ced-9 chez *C. elegans*), ancrées dans la membrane externe des mitochondries, serait liées aux chaperones Apaf (pour *apoptosis protease-activating factors*, homologues de Ced-4), qui à leur tour seraient liées aux caspases (homologues de Ced-3). Les formes anti-apoptotiques de la famille bcl-2 (Bax, Bad, Bik), en absence de signaux de survie, dissocieraient les complexes Apaf-caspases et ouvriraient les mégapores mitochondriales. L'ouverture de mégapores serait responsable de la libération dans le cytoplasme de facteurs qui vont déclencher l'activation des caspases (cytochrome c) ou leur clivage protéolytique, par une protéase " apoptotique " nommée AIF, pour *apoptosis-inducing factor* [10,11,14]. En outre, l'ouverture de mégapores mitochondriales contribue à amplifier la phase effectrice de la mort de la cellule par le relargage dans le cytosol de radicaux libres et de calcium et l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale avec déplétion en ATP [10].

Étant donné que le développement et la progression d'une tumeur dépend aussi d'un équilibre entre croissance cellulaire et apoptose, il est clair que toute inactivation de l'apoptose pourrait aboutir à une augmentation du nombre de cellules et, en conséquence, à une prolifération incontrôlée. Il est même vraisemblable de penser que certaines tumeurs malignes soient, en fait, la conséquence de facteurs qui suppriment l'apoptose. Les travaux de Magi-Galuzzi et ses collègues en fournissent un exemple, et font le lien entre les oncogènes mitogéniques et ceux impliqués dans l'apoptose [16]. Ce groupe de chercheurs ont déterminé

l'expression de la protéine MKP(mitogen-activated protein kinase phosphatase)-1 dans 51 tumeurs prostatiques de patients dont 13 avaient subi préalablement une thérapie par privation aux androgènes. La protéine MKP-1 est induite par plusieurs oncogènes à travers la voie de *ras* et peut activer aussi la voie de MAP-kinases. Cette voie permet de relayer vers le noyau, les signaux de prolifération, via les kinases ERK(*extracellular regulated kinases*), ou les signaux d'apoptose, via les kinases JNK(*jun N-terminal protein kinases*). Les résultats ont démontré que dans les tumeurs des patients non traités, la protéine MKP-1 est surexprimée, surtout dans les tumeurs à un stade pré-invasif. Par contre, son expression diminue graduellement dans les stades histologiques plus élevés. Dans ces tumeurs pré-invasives, l'activité enzymatique de la protéine ERK-1 est augmentée; celle de JNK-1 est diminuée; les niveaux d'apoptose sont plus bas et en association avec une augmentation de l'expression de *bcl-2*. Dans les tumeurs des patients traités avec une thérapie par blocage total des androgènes, l'expression de protéines MKP-1 et *bcl-2* diminue tandis que celle de JNK-1 est augmentée. Ces résultats suggèrent que la participation des oncogènes pourraient être à l'origine de la transformation néoplasique du tissu prostatique et que la surexpression de MKP-1 peut inhiber l'apoptose dans les tumeurs humaines de la prostate, probablement en bloquant la voie JNK. Ces résultats soulignent également l'importance de traiter efficacement le cancer à un stade précoce et éviter que les cellules tumorales progressent et soient engagées dans le processus métastatique.

1.2 LE PROCESSUS MÉTASTATIQUE

Une tumeur maligne est le résultat de la croissance dérégulée d'une cellule tumorigène qui prolifère sans respecter ses propres mécanismes de régulation (absence de régulation autocrine); ni celles dictées par les interactions cellule-cellule avec les cellules des tissus adjacents (absence de régulation paracrine), pas plus que les mécanismes de régulation systémique telle que la régulation par les hormones. Ainsi, les caractères les plus spécifiques d'une tumeur maligne, par opposition à la tumeur bénigne, demeurent ses capacités à envahir et à former des métastases, c'est-à-dire à former des foyers cancéreux secondaires dans un tissu ou organe situé à distance de la tumeur primaire d'où ils sont issus.

Les événements qui conduisent au développement des métastases peuvent être divisés en trois étapes: **1) l'invasion locale**, qui comporte: (a) le détachement des cellules métastatiques de la tumeur primaire, (b) la migration vers les tissus adjacents; **2) la néovascularisation des foyers formés**; et **3) la dissémination à distance**, dont la séquence comporte: (a) l'adhésion des cellules métastatiques aux parois des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, (b) l'intravasation ou infiltration de ces vaisseaux pour atteindre la circulation, (c) l'arrêt dans les parois des capillaires d'un organe spécifique distant, (d) l'extravasation ou la traversée de la paroi capillaire vers le tissu-hôte, et (e) l'implantation des cellules métastatiques dans un organe distant dont les interactions avec le tissu-hôte permettent le développement d'une tumeur dite secondaire, et fatalement des nouvelles métastases. Avant de commencer à décrire plus en détails les étapes énoncées ci-haut, il m'apparaît important de souligner que celles-ci découlent des observations rapportées surtout dans le cas de tumeurs d'origine épithéliale, communément appelées carcinomes, et qui représentent environ 90% de tous les cancers humains tels que ceux produits par le cancer du sein et de la prostate.

1.2.1 L'invasion locale

1.2.1.1 *Le détachement*

La première étape d'une invasion carcinomateuse suppose que les cellules cancéreuses soient capables de se détacher les unes des autres. Ce détachement semble être affecté par certains facteurs biologiques et moléculaires tels que la perte d'expression des molécules d'adhésion

cellulaire, la nécrose tumorale et certains enzymes lytiques ou protéases d'origine tumorale. Les molécules d'adhésion telles que les protéines laminine, E-cadhérine et les récepteurs des protéines de la MEC (matrice extracellulaire), les intégrines, jouent un rôle clé dans plusieurs événements importants impliqués dans les processus d'invasion et de métastase. Ces molécules, en plus de diriger les interactions cellule-cellule et cellule-substrat, coordonnent aussi l'adhésion des cellules (normales et cancéreuses) à la matrice extracellulaire [17]. Ainsi la perte d'expression de ces molécules d'adhésion aux sites primaires causerait la rupture des interconnexions entre les cellules cancéreuses et provoquerait le détachement des cellules de la tumeur primaire. Par ailleurs, les régions nécrotiques constituent un bassin riche en enzymes protéolytiques. Cependant, puisque les macrophages ont tendance à migrer vers les régions nécrotiques, il est possible que les macrophages soient la source principale pour ce bassin d'enzymes d'origine "nécrotique". De plus, l'activité protéolytique exercée par les protéases sécrétées par les cellules tumorales elles-mêmes constitue un facteur majeur du détachement cellulaire. Parmi les protéases d'origine tumorale, on retrouve les hydrolases lysosomiales, les enzymes collagénolytiques et celles du système de la plasmine [18].

1.2.1.2 *La migration vers le tissu adjacent*

L'étape suivante de l'invasion locale consiste en la pénétration de la membrane basale (MB) et du tissu conjonctif sous-jacent par les cellules cancéreuses détachées de la tumeur primaire. Puisque la fonction de la MB consiste à séparer l'épithélium du tissu conjonctif adjacent, il est possible de concevoir que la migration des cellules carcinomateuses vers le tissu conjonctif implique la formation des brèches à travers les matrices extracellulaires des deux structures. Le tissu conjonctif sous-jacent peut être composé des fibroblastes ou des cellules mésenchymateuses par exemple, dont l'un des principaux rôles est de servir d'emballage et d'amarrage des structures corporelles, incluant les nerfs et les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. La MB est une mince structure en trois couches distinctes composées principalement de collagène de type IV, de la glycoprotéine laminine, de fibronectine et d'une protéoglycane de type héparan-sulfate [17]. Dans l'espace interstitiel, les éléments structurels sont organisés en fibres contenant des collagènes de type I et III en forme hélicoïdale, du collagène de type V, ainsi que de fibres élastiques contenant de l'élastine. Avec la fibronectine, ces éléments stabilisent les autres glycoprotéines et protéoglycans qui composent la matrice extracellulaire stromale au-dessous de la MB [17].

Parmi les mécanismes d'invasion du tissu conjonctif généralement acceptés, on peut considérer (a) la motilité active des cellules cancéreuses, reliée à leur capacité accrue de locomotion due à la perte de l'inhibition de mouvement au contact et à la diminution de l'adhérence à cause de la diminution en fibronectine à la surface cellulaire et (b) l'invasion exercée par la pression intra-tissulaire locale reliée à l'augmentation progressive du nombre de cellules tumorales. Cependant, le facteur d'invasion le plus important demeure la destruction de la matrice extracellulaire (MEC) par les enzymes lytiques [17].

Parmi les enzymes lytiques connus, les métalloprotéases matricielles et les enzymes du système activateur du plasminogène (PA) semblent jouer un rôle majeur dans la dégradation de la matrice extracellulaire lors de l'invasion tumorale et le processus métastatique [18]. Les PA de types urokinase (uPA) ou tissu-spécifique (tPA) se retrouvent dans les tissus normaux et cancéreux, et sont impliqués autant dans les processus pathologiques que physiologiques nécessitant une protéolyse extracellulaire localisée. Le PA est une sérine-protéase qui active une autre sérine-protéase, la plasmine, qui peut briser directement les liens lysil-lysine présents dans la fibronectine, la laminine, les glycoprotéines matricielles et les protéoglycannes. De plus, la plasmine active certaines pro-collagénases et peut ainsi promouvoir indirectement la dégradation du collagène [18]. Ces protéines sont contrôlées par l'expression de plusieurs inhibiteurs protéiques [18]: les PA par PAI-1 et PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor -1 et -2*) et les métalloprotéases par deux inhibiteurs bien caractérisés, soit le TIMP-1 et TIMP-2 (*tissue inhibitor of metalloproteinase -1 et -2*).

La dégradation de la MEC peut être effectuée par des enzymes lytiques produites non seulement par les cellules cancéreuses elles-mêmes mais aussi par d'autres cellules en conséquence de différentes interactions cellule-cellule entre les cellules cancéreuses, le stroma tumoral et le tissu envahi [18]. Ainsi, il existe une collagénase d'origine tumorale spécifique pour le collagène de type IV mais inactive contre le collagène des types I, II et III. Les collagènes de types I, II et III sont en fait dégradés spécifiquement par des collagénases interstitielles qui n'ont pas d'activité contre le collagène de type IV. Les autres composantes du tissu conjonctif, telles la fibronectine et la laminine, sont dégradées par le plasmine, générée soit par les cellules cancéreuses ou par les macrophages; la fibronectine peut aussi être dégradée par les cathepsines, l'élastase leucocytaire et les thiol-protéases, pour lesquelles la laminine est résistante; les protéoglycannes peuvent être attaquées par tous ces enzymes et par certaines métalloprotéases et autres sérines-protéases sauf le PA [18].

À ce stade-ci, le plus important facteur dans la progression tumorale est la capacité des cellules cancéreuses à activer localement les cellules du tissu hôte (fibroblastes, macrophages, lymphocytes, etc.) et à obliger celles-ci à produire des conditions spécifiques favorables à leur croissance et à leurs activités (protéines et protéases de la MEC, facteurs solubles, cytokines, facteurs angiogéniques, etc.). Ainsi, il a été démontré que les cellules cancéreuses sécrètent de grandes quantités de TGF β sous forme latente et dont l'activation conduit à la différenciation d'une population spécifique des fibroblastes en myofibroblastes qui entourent la tumeur et les foyers tumoraux des cellules détachées [19]. Les auteurs suggèrent que la réponse myofibroblastique à l'invasion tumorale pourrait protéger les cellules cancéreuses des effets cytotoxiques des cellules immunitaires et ainsi contribuer à l'invasion tumorale, à leur survie et à leur capacité de métastasier. Il en est ainsi aussi pour le tissu mésenchymateux qui sert à édifier le stroma de la tumeur et à favoriser le développement ultérieur du nodule cancéreux primitif en lui fournissant un support conjonctivo-vasculaire [18].

1.2.2 La néovascularisation tumorale

Le docteur Judah Folkman avait déjà proposé en 1971 la théorie que les tumeurs restent dans un état de " *dormance* " pendant une longue et variable période de temps, puisqu'incapables de grossir de plus de 2 à 3 mm de diamètre en absence de néovascularisation. Ainsi, bien que les tumeurs de 1 à 2 mm³ peuvent recevoir des éléments nutritifs par diffusion, leur croissance dépendra absolument d'un apport sanguin adéquat par angiogénèse [20]. Folkman, proposait que dans la progression tumorale, le processus d'angiogénèse semblait être un facteur essentiel, et qu'il serait déterminé par le relâchement d'un facteur provenant de la cellule tumorale, le TAF pour *tumor angiogenesis factor*. Durant la progression tumorale d'un carcinome, on peut donc distinguer deux phases: la phase pré-vasculaire et la phase vasculaire. Pendant la phase de pré-vascularisation, la tumeur provenant des cellules épithéliales transformées, appelée un carcinome *in situ*, atteint un plateau de croissance et peut rester inactive pendant des années; le taux de prolifération est alors balancé par le taux de mort cellulaire (apoptose), résultant ainsi en une masse qui reste constante [21]. Il faut alors attendre l'évolution des cellules cancéreuses plus agressives qui vont envahir la membrane basale pour déclencher la vascularisation de la tumeur grâce à la libération des facteurs angiogéniques. Ainsi, pendant la phase vascularisée on assistera à une croissance exponentielle de la tumeur et à l'éventuelle invasion générale des cellules métastatiques.

L'angiogénèse tumorale est un processus séquentiel initié par une phase d'activation des cellules endothéliales et une phase de résolution ou maturation des vaisseaux néo-formés [21]. Cette séquence (fig.1), comme dans les conditions physiologiques normales, comporte plusieurs processus distincts mais interdépendants : (a) la stimulation des cellules endothéliales par différents facteurs angiogéniques d'origine tumorale; (b) la dégradation de la membrane basale de la matrice extracellulaire séparant les cellules endothéliales du tissu adjacent; (c) la migration des cellules endothéliales vers la tumeur; (d) la prolifération des cellules endothéliales pour former les nouveaux vaisseaux; et finalement (e) la sécrétion des composantes de la membrane basale qui contribuent à la formation d'un réseau de capillaires et au remodelage du tissu [21,22].

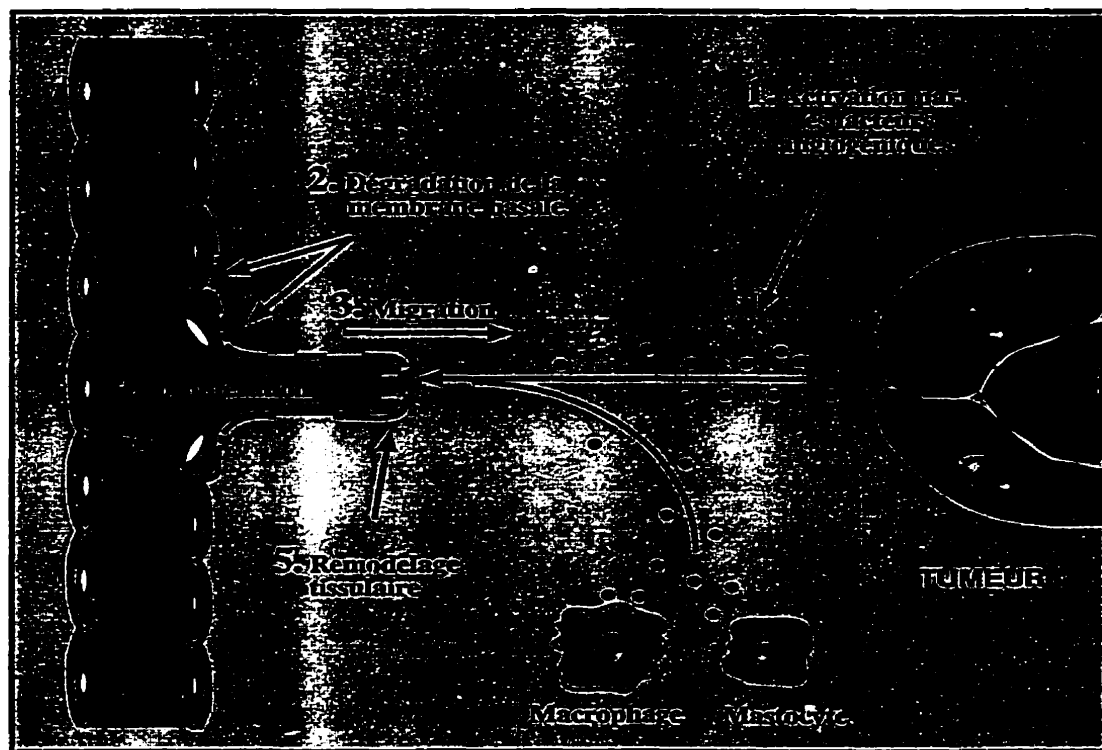


Figure 1.3 : Principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales au cours de l'angiogénèse. (1) Les tumeurs sécrètent divers facteurs angiogéniques, telles que le VEGF et FGF-2, qui diffusent à travers le tissu pour atteindre les vaisseaux. (2) Ces facteurs angiogéniques stimulent la production de collagénases et de l'activateur du plasminogène par les cellules endothéliales permettant la dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau. (3) Les cellules endothéliales peuvent alors migrer vers la source du stimulus et amorcer le bourgeonnement du vaisseau parental. (4) Les cellules endothéliales prolifèrent rapidement pour permettre aux vaisseaux de prendre une expansion. (5) La synthèse de composantes de la matrice extracellulaire par les cellules constituant les nouveaux vaisseaux permet le remodelage du réseau capillaire (Selon Gingras et Béliveau [22]).

La plupart des facteurs angiogéniques, tels que le FGF-2 et le VEGF, exercent une stimulation trifonctionnelle sur les cellules endothéliales: protéolyse, migration et prolifération [21]. L'activation des cellules endothéliales par ces cytokines induit l'expression des protéases qui dégradent la membrane basale autour des capillaires avant la migration vers la tumeur [23]. La migration de cellules endothéliales à travers la matrice extracellulaire est facilitée par l'activité d'un groupe de métalloprotéases sécrétées par les cellules tumorales, les cellules endothéliales et les cellules du stroma tumoral [18,23]. Ces métalloprotéases (cathepsines, collagénases de type I et IV, etc.) sont sécrétées sous une forme pro-enzymatique dont l'activation serait effectuée en partie via le système uPA et son récepteur, uPA/uPA.R [23]. Par ailleurs, de très récents travaux ont déterminé que les cellules du cancer de la prostate PC-3 sécrètent deux protéases, l'uPA et une autre nommée FSDs (*Free Sulfhydryl Donors*), capables de convertir le plasminogène en angiostatine, un puissant inhibiteur naturel de l'angiogénèse et de la croissance des métastases tumorales [24]. La présence d'un plasminogène de type sauvage (i.e. non muté) est par contre nécessaire pour que le plasminogène devienne de l'angiostatine. Ces données suggèrent que la progression métastatique tumorale dépend d'une balance entre facteurs inhibiteurs et stimulateurs de l'angiogénèse.

Il existe au moins trois mécanismes par lesquels une tumeur dormante peut acquérir le phénotype angiogénique : soit par la libération de facteurs angiogéniques fixés à la membrane basale lors de la dégradation de la MEC, tels que la forme basique du FGF (*fibroblast growth factor*, ou FGF-2) et le VEGF (*vascular endothelial growth factor*); soit par l'exportation du FGF-2 vers les cellules cancéreuses tel qu'observé dans le développement de fibrosarcomes chez les souris transgéniques contenant le génome du virus du papillome bovin de type 1 [25]; soit par la présence d'une protéine de liaison au FGF, la FGF-BP (*fibroblast growth factor-binding protein*) sécrétée par les cellules tumorales et qui serait responsable, selon les récents travaux de Czubayko et Liaudet-Coopman, de l'immobilisation et de l'activation locale de FGFs emmagasinés dans la matrice extracellulaire [26]. Par ailleurs, certains chercheurs ont mis en évidence les changements génétiques qui pourraient être associés avec l'acquisition du phénotype angiogénique. Ces travaux, compilés par James Pluda [27], proposent que le contrôle de l'angiogénèse dans les fibroblastes humains se fasse via le suppresseur de tumeurs p53; la protéine p53 exerçant une régulation positive sur la synthèse de la thrombospondine-1 (TSP-1), un puissant inhibiteur de l'angiogénèse; ainsi la perte de la fonction du gène p53, observée dans un grand nombre des tumeurs humaines, serait associée avec une réduction de l'expression de TSP-1 et le subséquent changement vers le phénotype angiogénique [27]. De plus, il a été proposé que l'acquisition du phénotype angiogénique soit associée à une diminution du taux

d'apoptose tumorale qui résulterait alors en une augmentation du taux de croissance et à la subséquente invasion et formation des métastases [27]. Ces observations sont basées sur le fait que l'administration des agents anti-angiogéniques aux souris portant des tumeurs humaines xéno greffées conduit à une régression des tumeurs dans un état dormant avec un taux d'apoptose tumorale plus élevé.

Les processus d'invasion tumorale et d'angiogénèse sont donc tout à fait similaires car ils impliquent d'abord la dissolution de la membrane basale et l'action conjointe de la dégradation de la matrice extracellulaire et la migration des cellules en prolifération vers le stroma interstitiel. De plus, l'angiogénèse constitue aussi une étape critique dans le processus de formation de métastases: il a été démontré que le déversement des cellules cancéreuses dans la circulation commence seulement après que la tumeur soit entrée dans la phase vascularisée, et que le nombre des cellules cancéreuses entrant dans la circulation soit proportionnel à la surface de vaisseaux d'origine tumorale déterminée par le degré de néovascularisation tumorale [28].

1.2.3 L'invasion à distance: les métastases

1.2.3.1 *L'adhésion des cellules cancéreuses aux parois des cellules endothéliales*

Les plus abondantes molécules d'adhésion cellulaire, les intégrines, semblent être des facteurs clés dans la colonisation tumorale [17]. En effet, il a été démontré que les intégrines dirigent l'attachement entre les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales vasculaires, et aux protéines de la MEC telles que la laminine et la fibronectine [29]. Par ailleurs, Brooks et al. ont mis en évidence que l'intégrine $\alpha v \beta 3$, un récepteur d'adhésion capable d'interagir avec une grande variété de composantes de la MEC, est sélectivement exprimée au niveau de vaisseaux en voie de formation et maturation mais est absente dans les vaisseaux sanguins quiescents. Cette expression est induite lors de l'angiogénèse par des cytokines telles que FGF-2 et TNF α ainsi que par des facteurs d'origine tumorale [30]. De plus, Brooks a démontré que l'intégrine $\alpha v \beta 3$ s'associe à la métalloprotéase matricielle MMP(*matrix metalloproteinase protein*)-type 2 à la surface des cellules endothéliales et des cellules invasives de mélanome *in vivo*. Cette interaction faciliterait ainsi la dégradation du collagène de la membrane basale endothéliale et de la MEC [31]. Il apparaît donc que l'intégrine $\alpha v \beta 3$ fonctionnerait en coopération avec la métalloprotéase MMP-2 pour promouvoir non seulement l'adhésion cellulaire mais aussi la

migration et la dégradation contrôlée de la MEC, résultant ainsi à une invasion concertée par les cellules tumorales et endothéliales.

1.2.3.2 *L'entrée dans les vaisseaux sanguin et lymphatique*

Le phénomène d'intravasation ou infiltration des vaisseaux sanguins ou lymphatiques par les cellules cancéreuses semble être dirigé par un mécanisme conjugué de pression intra-tissulaire et de protéolyse exercées par la tumeur. En effet, puisque les veinules et les petits vaisseaux sanguins ont une paroi relativement mince, la pression exercée par la tumeur permettrait aux cellules endothéliales de se séparer facilement de la matrice et faciliterait alors le passage des cellules cancéreuses dans la circulation. Cependant, les artères et les artérioles sont entourées d'un tissu conjonctif contenant du collagène et des fibres élastiques, et affichent ainsi une plus grande résistance à l'invasion. Leur pénétration ne serait donc facilitée que par les enzymes protéolytiques tumoraux et les enzymes hydrolytiques sécrétés en réponse à la réaction inflammatoire [32]. Il s'agirait virtuellement des mêmes enzymes impliqués dans la dégradation et l'invasion de la membrane basale et le tissu conjonctif sous-jacent (section 1.2.1).

1.2.3.3 *La dissémination à travers les voies sanguine et lymphatique*

Dans la suite de la formation des métastases, les cellules cancéreuses doivent d'abord emprunter les principales voies de transport, soit la circulation sanguine et la circulation lymphatique. Il semblerait que les carcinomes emprunteraient avant tout la voie lymphatique. Cependant, il n'existe pas de distinction nette entre ces deux systèmes de diffusion car la circulation lymphatique se déverse dans le courant sanguin au niveau du canal thoracique [33]. Ainsi, il a été déterminé que les cellules qui se détachent de la tumeur prostatique circulent dans le sang périphérique, et que le nombre de cellules circulantes est plus faible dans les cas des tumeurs prostatiques localisées que chez les patients atteints de cancer de la prostate à un stade avancé hormono-réfractaire [34].

Peu importe la voie empruntée, il ne demeure pas moins que les systèmes de circulation constituent des environnements très hostiles pour les cellules tumorales circulantes. Il a été démontré que plusieurs millions de cellules sont déversées quotidiennement dans la circulation mais à peine 0.1% y survivent et font des métastases. Les études menées par Hart [35] ont mis

en évidence que des cellules des mélanomes (B16F10) et des sarcomes (M5070), marquées au ^{125}I et injectées dans les veines de la queue des souris, sont virtuellement toutes éliminées de la circulation après 15 minutes. Trente minutes après leur injection, celles qui survivent se logent surtout dans les poumons mais très rarement dans le foie, le rein ou le cœur. De celles-ci, moins de 1% seulement y survivent après 24 heures. Cette situation pourrait être provoquée par le stress mécanique imposé par la circulation, le manque d'éléments nutritionnels, la toxicité due à la haute concentration en oxygène, ou bien à des facteurs immunologiques provoqués par les lymphocytes T, les polymorphonucléaires, les macrophages et les cellules NK (*natural killer*).

1.2.3.4 *L'arrêt dans un organe-cible et extravasation*

Après avoir envahi les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, les cellules cancéreuses forment des embolies locales soit par interaction avec d'autres cellules tumorales et les cellules sanguines (plaquettes, lymphocytes, neutrophiles) ou bien par stimulation de la déposition de fibrine qui forme alors un petit thrombus, favorisé surtout par certains facteurs thromboplastiques tumoraux. Les embolies ainsi formées par des cellules individuelles ou en grappes de cellules tumorales sont alors transportées et vont se loger dans les capillaires des organes distants, et souvent de façon tissu-spécifique par adhésion avec l'endothélium capillaire du tissu-hôte. La faculté d'adhésion des cellules tumorales constitue une propriété essentielle pour la progression du processus métastatique; du moins elle semble attribuer une spécificité d'invasion des cellules cancéreuses pour un organe donné. Les cellules métastatiques du cancer du sein et de la prostate, par exemple, démontrent une spécificité d'adhésion pour les cellules endothéliales de la moelle osseuse [36,37]. Cependant, cette propriété est d'une grande complexité puisque la cellule cancéreuse doit alors supprimer l'expression de certaines molécules d'adhésion cellulaire pour se détacher des autres cellules de la tumeur primaire et envahir la membrane basale et en exprimer d'autres à leur surface pour adhérer aux membranes interne et externe des cellules endothéliales et pour envahir à distance un tissu-hôte et conduire à la formation de métastases. Il est possible qu'une fois dans la circulation, les cellules cancéreuses expriment à nouveau les récepteurs nécessaires à l'adhésion sur d'autres protéines matricielles et poursuivre leur progression.

L'intravasation des cellules tumorales en circulation emprunte certains mécanismes semblables à ceux impliqués dans l'invasion au niveau de la tumeur primaire: soit une destruction de la membrane basale de l'endothélium capillaire par des collagénases sécrétées par

les cellules tumorales, ou une adhésion de cellules tumorales à l'endothélium capillaire dans les organes-cibles qui endommage la paroi des vaisseaux. Ces dommages conduisent à une accumulation des neutrophiles qui peuvent alors pénétrer les espaces entre les cellules endothéliales et ouvrir un passage pour faciliter l'entrée des cellules cancéreuses dans le stroma du tissu-hôte. De plus, la présence du thrombus entourant les cellules tumorales produit l'agrégation des plaquettes qui sécrètent des facteurs, tels que l'histamine, qui induisent la perméabilité des capillaires permettant ainsi la migration des cellules potentiellement métastatiques à travers l'endothélium [32].

1.2.3.5 *Le développement des cellules métastatiques*

Pour que le développement des métastases se produise, il faut que les cellules qui réussissent à franchir la paroi vasculaire et envahir le parenchyme de l'organe-hôte puissent y proliférer. La régulation de cette croissance cellulaire par des facteurs stimulateurs et inhibiteurs, dirigée en grande partie par les interactions entre les cellules métastatiques et le tissu-hôte, semble être le facteur déterminant pour le développement des foyers métastatiques et la réaction subséquente avec les cellules de l'organe envahi. En général, la prolifération des cellules métastatiques conduit à la formation de petites colonies qu'on peut appeler des micrométastases. Il y aurait alors deux phases successives dans le développement de ces foyers: une phase avasculaire durant laquelle les interactions paracrines entre les cellules tumorales et le tissu-hôte se font par simple diffusion; dans la seconde phase, la néovascularisation tumorale jouerait encore une fois un rôle essentiel, et elle serait aussi sous le contrôle des facteurs angiogéniques sécrétés par les cellules cancéreuses. Toutefois, l'angiogénèse ne semble pas être un facteur limitant aussi important pour le processus métastatique de métastases que dans la tumeur *in situ*.

L'importance des interactions entre les cellules métastatiques et le tissu-hôte est un aspect central de notre travail: la réaction osseuse, ostéoblastique surtout, autant que la résistance des cellules métastatiques ostéophiles à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie, sont influencées par les interactions avec les cellules du tissu osseux, l'ostéoblaste et l'ostéoclaste. Avant d'aborder le sujet sur les métastases osseuses, il est donc important de comprendre la physiologie du tissu-hôte : le tissu osseux. Une partie de notre sujet de recherche est basée sur le fait que la néoformation pathologique de l'os dans les métastases ostéoblastiques est toujours produite par un mécanisme local impliquant directement l'activation et la différenciation des ostéoblastes, tandis que la résorption osseuse (ostéolyse) peut être produite soit par l'activation

des ostéoclastes ou bien par une ostéolyse effectuée, de façon directe ou indirecte, par la cellule tumorale. En effet, les facteurs de croissance tels le TGF β 1 et le IGF-I semblent jouer un rôle essentiel dans la régulation des interactions entre les cellules métastatiques hormono-indépendantes et les ostéoblastes en regard de la réaction osseuse.

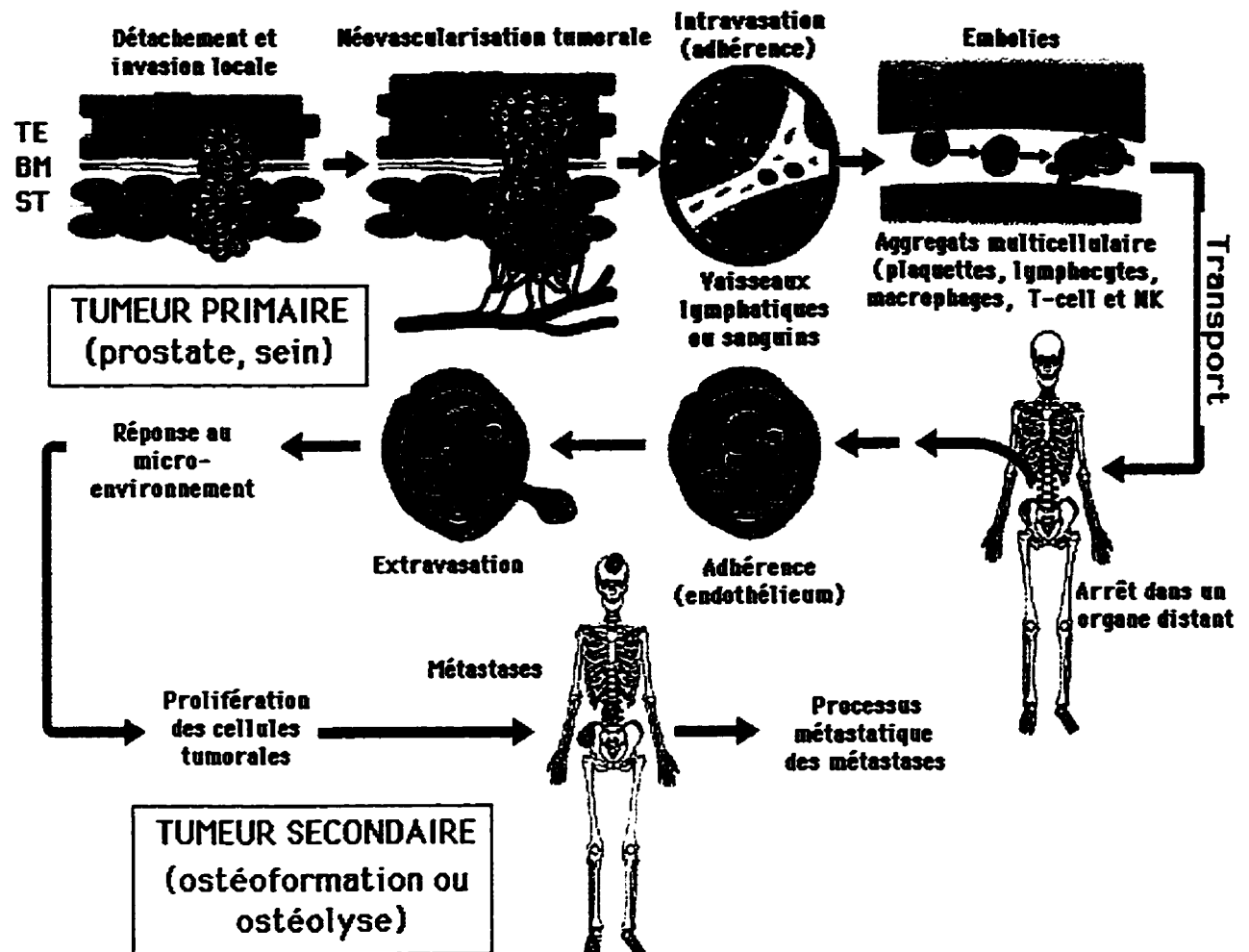


Figure 1.4 : Processus métastatique. Les cellules épithéliales du cancer du sein et de la prostate métastasent au niveau du tissu osseux selon un processus séquentiel : 1) détachement de la tumeur primaire et envahissement du tissu conjonctif adjacent; 2) réveil de la tumeur par un phénomène d'angiogénèse; 3) envahissement des vaisseaux sanguins ou lymphatiques; 4) transport à travers la circulation ; 5) arrêt et envahissement de l'endothélium du tissu osseux; 6) développement des métastases osseuses: réaction ostéoblastique ou ostéolytique, et 7) fatalement dissémination extrêmement rapide d'autres métastases. TE, tissu épithélial; MB, membrane basale; ST stroma.

2 PHYSIOLOGIE DU TISSU OSSEUX ET CANCER

L'os est un tissu vivant qui se retrouve normalement dans un cycle constamment équilibré de formation et de destruction visant à remplacer le tissu caduque ou lésé et de maintenir le tissu osseux en santé. Certaines maladies peuvent perturber cet équilibre (ostéoporose, maladie de Paget), tout comme les effets secondaires de certaines drogues thérapeutiques ou des glucocorticoïdes. Cependant, la présence des cancers secondaires des os constitue la plus inquiétante manifestation clinique pour un grand nombre de cancers. Cette affliction provient du fait que leur développement s'avère trop souvent fatal pour les patients qui en sont atteints, et pour qui la médecine moderne ne procure que des traitements palliatifs visant seulement à réduire leurs souffrances.

2.1 Structure, fonction et homéostasie du tissu osseux

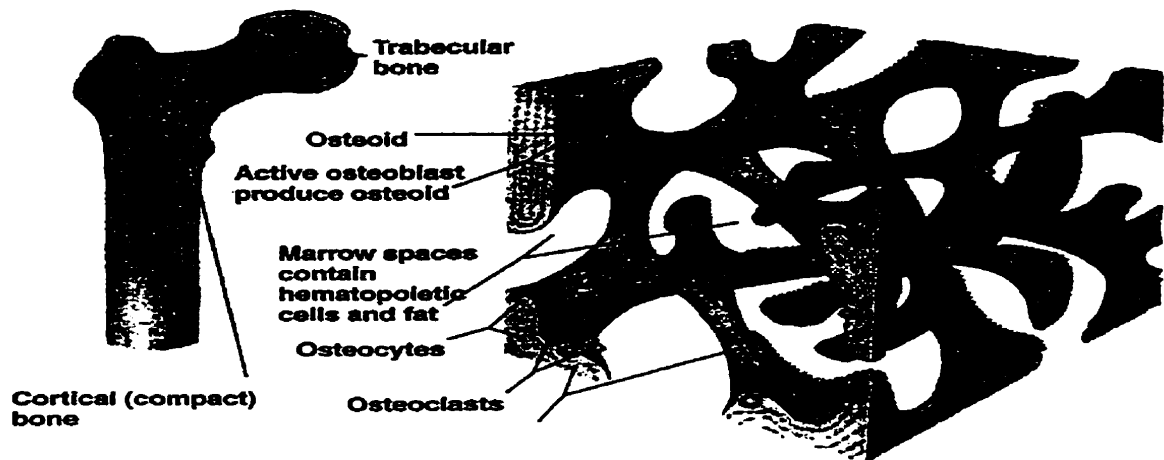
2.1.1 *Structure osseuse*

Le tissu osseux est un tissu conjonctif qui compose avec le cartilage, le système squelettique. Ses fonctions principales sont de servir de support et de site d'attachement pour les muscles nécessaires à la locomotion, comme structure protectrice pour les organes vitaux et la moelle osseuse, et comme réservoir des ions calcium et phosphates pour l'organisme tout entier [38,39]. En tant que tissu, l'os est composé de cellules spécialisées, soient les ostéoclastes et les ostéoblastes, et d'une matrice extracellulaire osseuse (MEO). Cette matrice est composée d'une substance intercellulaire contenant des fibres de collagène de type I et une substance amorphe riche en glycoprotéines et protéoglycanes. La structure et l'orientation des fibres de collagène sont définies par leur association avec des cristaux d'hydroxyapatite, qui rendent à l'os la particularité de pouvoir se calcifier et de durcir. En tant qu'organe, l'os est principalement formé de tissu osseux spongieux et de tissu osseux compact, dont la répartition diffère selon qu'il s'agit d'un os long (le tibia, le fémur), d'un os court (vertèbres) ou d'un os plat (l'os de l'omoplate, de la mâchoire). Dans un os long on distingue trois parties: la diaphyse, un cylindre de tissu osseux compact, dont la cavité centrale (la médullaire) est remplie de moelle; les métaphyses qui sont situées entre la diaphyse et les épiphyses, ces dernières correspondant aux extrémités des os. Épiphyses et métaphyses sont formées de tissu osseux spongieux dont les mailles qu'il contient renferme de la moelle. Tous les os possèdent une surface externe et une

surface interne qui sont en contact avec les tissus mous. Ces surfaces sont délimitées par des cellules ostéogènes organisées en couches et composent ainsi le périoste (surface externe) et l'endoste (surface interne) [38,39].

Architecture of bone

Trabecular bone



Cortical (compact) bone

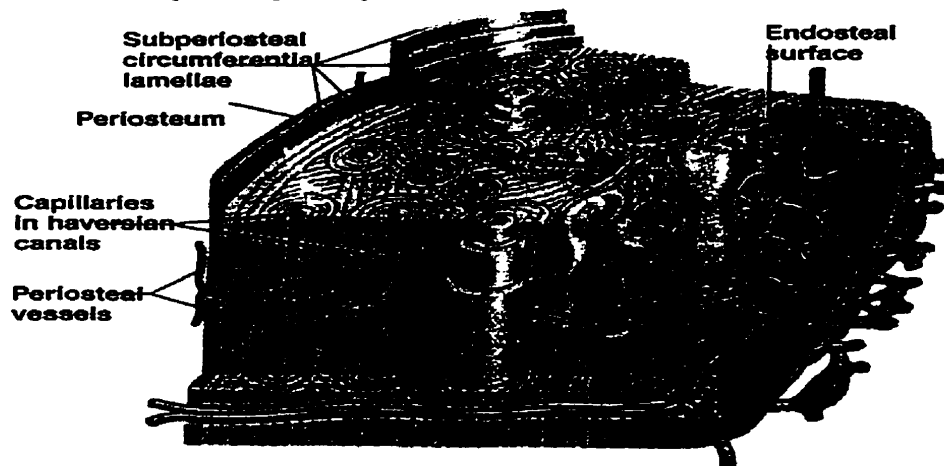


Figure 2.1 : Structure d'un os long composé des tissus osseux spongieux (trabéculaire) et compact (cortical). L'os trabéculaire est le site le plus actif du tissu osseux. Ce tissu renferme de la moelle hématopoïétique qui se cantonne dans les parties proximales de l'humérus et du fémur, par exemple. La matrice extracellulaire de l'os est composée d'une substance intercellulaire contenant des fibres de collagène de type I et une substance amorphe riche en glycoprotéines et protéoglycane. Les ostéoclastes créent un environnement acide nécessaire pour l'activation des protéases lysosomiales et la résorption osseuse. Les ostéoblastes activés sont responsables de la formation de l'os. Ils forment de lacunes ostéoïdes où les ostéocytes restent emprisonnés après minéralisation de la MEO. La vascularisation d'un os long est assurée principalement par l'artère nourricière et les artères périostiques qui nourrissent tout le tissu osseux en se faufilant à travers les canaux de Havers.

2.1.2 *La vascularisation osseuse*

Les os sont abondamment vascularisés grâce à la présence de nombreux vaisseaux sanguins, des artères, des veines et de lymphatiques qui le nourrissent, lui permettant de faire des échanges ou pour drainer ses produits (figure 2.1) [40]. Ils contiennent de la moelle hématopoïétique qui, chez l'adulte, se cantonne dans les vertèbres, les côtes, les os du crâne et du bassin, les parties proximales de l'humérus et du fémur. La vascularisation d'un os long, en particulier, est assurée principalement par l'artère nourricière et les artères périostiques [40]. L'artère nourricière perfore la corticale de l'os et atteint la cavité médullaire où elle se divise en deux branches qui fournissent des rameaux pour la médullaire et pour la partie interne de la corticale. Les artères périostiques forment sous le périoste un réseau à mailles serrées d'où naissent de nombreux rameaux irriguant la partie externe de la corticale. Les artères épiphysaires naissent des cercles artériels péri-épiphysaires. Les artéioles de l'os se divisent en capillaires auxquels font suite des capillaires veineux qui se raccordent à des veines dont la plupart sortent de l'os à sa partie proximale.

2.1.3 *Les cellules du tissu osseux*

Des récents travaux ont démontré que les ostéoclastes sont des cellules multinucléaires dérivées de la fusion de précurseurs hématopoïétiques aux stades tardifs de la voie de différenciation monocytaire, voire directement des macrophages avec lesquels ils partagent de nombreux antigènes [49]. Ils se caractérisent principalement par une activité métabolique intense car ils contiennent un grand nombre des lysosomes primaires et des mitochondries. Ils possèdent à leur surface membranaire une anhydrase carbonique de type II qui génère des protons transportés à travers le rebords ondulé (partie de la membrane en contact avec la surface osseuse) par une pompe à protons ATP-dépendante. Ces protons créent l'environnement acide nécessaire pour l'activation des protéases lysosomiales et la résorption osseuse [50].

Il existe trois types de lignées ostéoblastiques: les pré-ostéoblastes, les ostéoblastes matures et les ostéocytes [43]. Ces lignées proviennent des cellules mésenchymateuses condensantes et constituent donc une forme de tissu conjonctif. L'ostéoblaste mature origine d'un pré-ostéoblaste et exerce toutes les fonctions requises pour fabriquer l'os. Le pré-ostéoblaste se retrouve à proximité des surfaces osseuses en formation. La transition du pré-ostéoblaste en ostéoblaste se fait graduellement selon un gradient de différenciation qui atteint

son maximum lorsque la forme mature de la cellule envahit la surface osseuse résorbée ou lésée. Un ostéocyte est un ostéoblaste qui reste emprisonné dans l'os calcifié. Environ 10 à 20% des ostéoblastes deviennent des ostéocytes. Ils sont contenus dans des cavités appelées ostéoplastes, ou lacunes ostéocytaires, et leurs prolongements dans des canalicules. C'est par la voie de ce système lacuno-canaliculaire que les ostéocytes qui survivent reçoivent les nutriments nécessaires à leur activité biologique [43].

Enfin, il faut souligner que la structure interne de l'os, soit la moelle osseuse, est composé de plusieurs types de cellules. Au fait, la moelle osseuse est constituée: a) des cellules souches hématopoïétiques, capables de se différencier en ostéoclastes, en macrophages, en lymphocytes et cellules sanguines, et b) des cellules stromales qui supportent la différenciation de cellules hématopoïétiques et d'elles-mêmes en se différenciant en ostéoblastes [41-43].

2.1.4 *Le remodelage du tissu osseux*

Le remodelage osseux correspond à un cycle constant mais équilibré de résorption et de formation de l'os [38,39]. Ce cycle est initié par les ostéoclastes activés qui envahissent la surface osseuse et détruisent celle-ci à l'aide des protéases acides lysosomiales qui dissolvent les cristaux d'hydroxyapatite et dégradent la MEO créant ainsi une cavité. Cette cavité est par la suite occupée par les ostéoblastes qui vont édifier une nouvelle couche osseuse en sécrétant des grandes quantités de collagène (type I) et des minéraux. Quelques ostéoblastes restent alors attrapés dans la MEO lors de la minéralisation de celle-ci et y survivent en tant qu'ostéocytes [38,39,44].

2.1.5 *La régulation du remodelage osseux*

Les hormones et les facteurs de croissance qui contrôlent la biologie osseuse sont connus et mieux compris depuis quelque temps. Parmi ces facteurs, on retrouve les hormones calcitropes qui régulent le remodelage osseux, soit l'hormone parathyroïdienne (PTH), la vitamine D3 (1,25[OH]₂D₃ ou VD3) et la calcitonine (CT) [44,45,46]. En réponse à une diminution de la concentration de calcium sanguin, la VD3 (transformée à partir de la vitamine D par un complexe enzymatique du cytochrome p450 mitochondrial appelé 1- α -hydroxylase) stimule l'absorption du calcium dans les intestins et favorise la résorption osseuse. La PTH,

sécrétée par la glande parathyroïde, augmente aussi les niveaux en calcium sérique suite à une augmentation de l'activité de l'enzyme 1- α -hydroxylase dans les reins, par une réabsorption du calcium rénal et par une stimulation de la résorption osseuse [45]. La CT semble jouer un rôle certain dans l'inhibition de la résorption osseuse en inhibant le recrutement des OCs, mais n'a aucun effet sur la formation de l'os [46]. Les autres hormones systémiques, telles que l'hormone de croissance (GH) et l'insuline, agissent positivement sur la formation osseuse; la GH par une stimulation de la synthèse de IGF-I par les cellules osseuses, et l'insuline par une augmentation de la production en IGF-I par le foie et une stimulation de la synthèse de la matrice osseuse [47]. Les hormones systémiques affectent, soit directement ou indirectement, l'activation, la prolifération et la différenciation des OBs, des OCs et de leurs progéniteurs respectifs; la synthèse et la dégradation du collagène et de la matrice extracellulaire ; et la production et la libération de facteurs de croissance tels que les TGF β s et les IGFs [42-44].

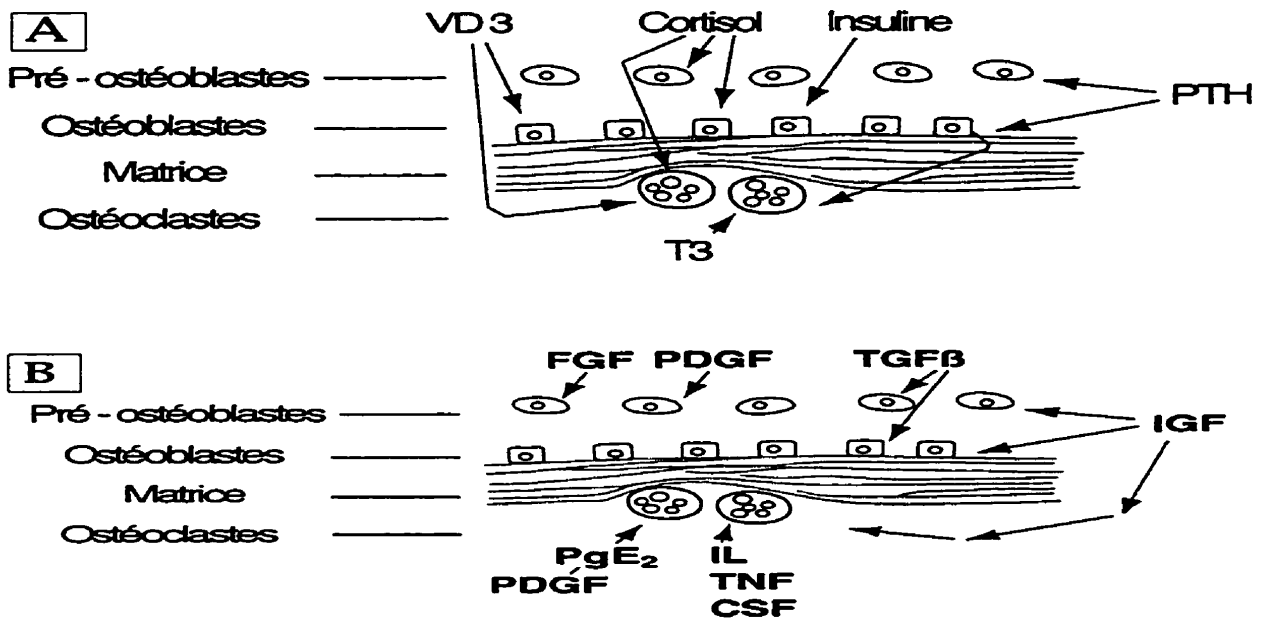


Figure 2.2 : Régulation du remodelage osseux par les hormones systémiques (A) et les facteurs de croissance et cytokines locaux (B). Les hormones polypeptidiques (PTH, CT, insuline, GH), stéroïdes (VD3, glucocorticostéroïdes, œstrogènes, androgènes, hormones thyroïdes) agissent sur l'activation, la prolifération et la différenciation des OBs et des OCs. Les régulateurs locaux comprennent les facteurs de croissance polypeptidiques classiques (IGFs, TGF β s, FGFs, PDGF), les cytokines produites par les cellules immunes ou hématopoïétiques (interleukines, les *tumor necrosis factors*, les *colony-stimulating factors*) et autres médiateurs importants tels que les prostaglandines. La dualité de fonction des nombreux régulateurs locaux et systémiques sur les OBs et les OCs suggère un couplage finement contrôlé entre formation et résorption osseuse.

Il faut noter que les hormones systémiques, surtout la PTH et la VD3, peuvent soit favoriser, soit inhiber l'activité des cellules ostéoblastiques tout dépendant du stade de différenciation des cellules répondantes [39,43,44]. Normalement, la PTH produit une résorption osseuse. Par contre, la PTH n'a pas d'effet direct sur les OCs: au niveau de l'os, leur principale cible s'avèrent être les OBs [45]. Lorsque les OBs sont stimulés avec du PTH, ils sécrètent des facteurs qui, à leur tour stimulent la prolifération et la fonction des OCs [43,45]. Ainsi au niveau de la régulation locale du remodelage osseux, les OBs constituent les pivots à travers lesquels la résorption et la formation osseuse seraient contrôlées. L'hypothèse de base suggère que les facteurs qui influencent l'activité des OBs sont déposés dans l'os par les OBs eux-mêmes [44]. Ces facteurs peuvent ainsi être séquestrés et emmagasinés dans la MEO lors du processus de minéralisation et être libérés lors de la résorption osseuse, de façon à coordonner les activités de résorption et de formation osseuse [44].

2.2 Hormones stéroïdes et physiologie osseuse

À part les hormones calciotropes, il existe aussi d'autres hormones circulantes, telles que les androgènes, les œstrogènes et les glucocorticostéroïdes, qui agissent également au niveau des ostéoblastes pour moduler la synthèse des facteurs de croissance comme les IGFs, les TGFβs et une grande variété des cytokines qui sont déposés dans la MEO et qui, à leur tour, agissent localement pour moduler l'action des hormones calciotropes.

2.2.1 Production et régulation des hormones stéroïdes

Chez l'humain, la glande surrénale, les ovaires et les testicules constituent les principales sources d'hormones stéroïdes [48,49,50]. Le cortex surrénalien produit principalement des glucocorticostéroïdes (cortisol, hydroxycortisol), des minéralocorticostéroïdes (aldostérone) et les androgènes surrénaliens (épiandrostenedione, DHEA et son sulfate conjugué DHEA-S) [50-52]. Chez l'homme, les cellules interstitielles de Leydig sont les sources majeurs d'androgènes actifs circulants (testostérone et DHT); chez la femme, les œstrogènes (œstrone et œstradiol) et les autres hormones sexuelles sont produits principalement par les ovaires au cours du cycle menstruel et par le placenta pendant la grossesse [50]. Les formes les plus actives de ces hormones sont le cortisol, le DHT et l'œstradiol.

La synthèse et la sécrétion de ces hormones stéroïdes sont sous le contrôle des hormones du système portal hypothalamo-hypophysaire [48-50]. Des faibles niveaux circulants de ces hormones provoquent la synthèse et/ou la libération de LHRH (leuteinizing hormone-releasing hormone) ou de CRH (corticotropin-releasing hormone) par l'hypothalamus dont l'action au niveau de l'hypophyse sera d'induire respectivement la production et/ou la libération d'hormones gonadotropes LH (leuteinizing hormone) et FSH (follicle-stimulating hormone), ainsi que l'hormone corticotrope ACTH (adrenal corticotropin hormone). Ainsi, la LH et la FSH vont agir au niveau des testicules ou des ovaires pour induire la synthèse et la sécrétion respective d'androgènes et d'œstrogènes. Quant à l'ACTH, elle agira au niveau du cortex surrénalien pour induire la production et la libération de glucocorticostéroïdes. Le retour à de niveaux physiologiques basaux de ces hormones produit un retro-contrôle afin d'inhiber la production d'hormones GnRH et CRH par l'hypothalamus [48-50].

À la base, les hormones stéroïdes dérivent toutes du cholestérol [51]. La conversion du cholestérol en diverses hormones stéroïdes est concertée par un batterie complexe d'enzymes, localisées dans le réticulum endoplasmique et dans les membranes mitochondriales, et incluent la famille du cytochrome p450, des sulfatases, des déhydrogénases et des réductases [51]. Parmi ces enzymes, on retrouve la famille des isoenzymes 3β -HSD (*3beta-hydroxysteroid dehydrogenase*) et 17β -HSD. Le rôle de ces isoenzymes est d'une importance majeure chez l'humain du fait que les surrénales sécrètent de grandes quantités de DHEA et du DHEA-S, lesquels sont convertis en androstenedione, par les isoenzymes 3β -HSD [51], et puis en puissants androgènes et œstrogènes, par les isoenzymes 17β -HSD [52], dans les tissus périphériques. Il faut noter que la formation et la dégradation d'hormones stéroïdes sexuelles jouent un rôle crucial dans la biologie normale et tumorale des tissus hormono-sensibles, tels que le sein et la prostate [52].

2.2.2 Mécanisme d'action moléculaire des hormones stéroïdes

L'activité biologique des hormones stéroïdes sur les différents tissus-cibles supposent la présence d'un récepteur capable de lier l'hormone avec une très haute affinité, que ce complexe puisse ensuite se lier sur des séquences spécifiques en ADN d'un gène en particulier, et enfin, d'être capable d'induire ou de réprimer la transcription du gène ciblé (figure 2.5). Les études sur les mécanismes moléculaires d'action des glucocorticoïdes [53,54], des œstrogènes [55,56], des androgènes [57,58] et des hormones stéroïdes en général [59-62] ont procuré une meilleure

compréhension de l'activité du complexe hormone-récepteur (H-R), de leur interaction avec les différents facteurs ou répresseurs de transcription, sur la nature de gènes régulés, sur la réponse moléculaire immédiate et sur la réponse biologique finale.

Les récepteurs d'hormones stéroïdes appartiennent à une superfamille de protéines réceptrices qui regroupe les récepteurs aux androgènes, aux glucocorticostéroïdes, aux œstrogènes, aux minéralocorticostéroïdes, aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D3, à la tri-iodothyroxine (T3) et à l'acide rétinoïque [59-62]. Au niveau cellulaire, les hormones stéroïdes, de par leur structure à caractère lipophile et hydrophobe [62], traversent la membrane cytoplasmique de manière passive. Au sein d'une cellule cible, les hormones stéroïdes exercent leur effet biologique via leur liaison à un récepteur, cytoplasmique ou nucléaire, qui possède une haute affinité et spécificité pour son ligand. Le récepteur GR, par exemple, lorsqu'il n'est pas lié à son hormone, forme au niveau du cytoplasme un complexe avec plusieurs protéines dont la protéine de choc thermique HSP(*Heat-Shock Protein*)-90 [54]. La liaison de l'hormone à son récepteur induit un changement de conformation qui a pour effet de dissocier le complexe hormone-récepteur des complexes de protéines de choc thermique et de permettre la translocation du complexe H-R, du cytoplasme vers le noyau (figure 2.5).

Sur le plan structurel, tous les membres de la superfamille des récepteurs d'hormones stéroïdes possèdent trois régions principales, subdivisées en six domaines [59-62]. En position N-terminale (domaine A/B), on retrouve les séquences en acides aminés responsables de la trans-activation des gènes cibles, et dont la présence est essentielle pour obtenir une activité transcriptionnelle maximale. Dans la partie centrale du récepteur (domaine C), on retrouve le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour *DNA binding domain*), impliqué aussi dans la dimérisation et la translocation nucléaire du récepteur (domaine D). Celui-ci comporte une structure en doigt de zinc permettant la reconnaissance par le complexe hormone-récepteur d'une séquence spécifique de l'ADN (HRE pour *hormone responsive element*). Quant à la région C-terminale, elle contient le domaine de liaison à l'hormone (HBD pour *hormone binding domain*) qui, en plus de lier spécifiquement l'hormone, comporte des séquences importantes pour la liaison aux protéines de choc thermique, pour la dimérisation, pour la translocation nucléaire et pour la transactivation des gènes cibles [59-62].

Le principal effet de la liaison de l'hormone au HBD consiste à induire un changement de conformation du récepteur, nécessaire aux étapes subséquentes menant à la trans-activation des gènes cibles. En l'absence d'hormone, le récepteur adopte une conformation faisant en sorte que

le HBD réprime la transcription des gènes cibles. La liaison de l'hormone au HBD, des récepteurs cytoplasmiques ou nucléaires libres, provoque la dimérisation du récepteur et induit le changement conformationnel nécessaire pour renverser cette trans-répression produite par le récepteur non lié [59-62]. Le DBD est le domaine le plus conservé parmi les membres de la superfamille des récepteurs d'hormones stéroïdes. Le DBD contient deux doigts de zinc qui résultent d'un arrangement tétraédrique entourant un atome de zinc. Le doigt de zinc localisé en N-terminal est largement responsable de la spécificité du récepteur pour les gènes cibles [60,61]. Des expériences d'échanges de domaines ont permis de démontrer que le DBD était à la fois nécessaire et suffisant pour assurer la spécificité du récepteur aux gènes cibles. Ces expériences ont été réalisées à l'aide de protéines chimériques où le DBD du ER était remplacé par le DBD du GR [60].

La modification de l'activation transcriptionnelle exercé par les hormones stéroïdes se fait via l'interaction du complexe H-R avec l'élément de réponse aux hormones (HRE) [59-62]. Les HREs sont des séquences d'ADN palindromiques spécifiquement reconnues et liées par les récepteurs des hormones stéroïdes. Dans la majorité des cas, ces éléments *cis* sont localisés dans la région 5' en amont du site d'initiation de transcription des gènes cibles. La liaison d'un dimère du complexe hormone-récepteur au HRE a pour effet de changer la structure tridimensionnelle de l'ADN, permettant ainsi, avec le concours d'autres facteurs de transcription, la transactivation des gènes cibles [61].

Les glucocorticoïdes, les œstrogènes et les androgènes stimulent ou repriment la transcription de gènes spécifiques [54,55,58]. L'activation transcriptionnelle d'un gène dépend de la présence d'éléments *cis*-actifs situés dans les parties régulatrices non-traduites du gène, et de leur liaison aux facteurs de transcription *trans*-actifs. La régulation dépend aussi de la quantité et de l'état d'activation des facteurs de trans-activation et de la présence d'autres facteurs de régulation positive ou négative de la transcription [54,59,61]. Au niveau nucléaire, on a déterminé deux mécanismes utilisés par le complexe hormone-GR pour exercer son action sur les gènes cibles [54] (figure 2.5). Premièrement, dans le modèle classique un homodimère de complexe hormone-récepteur se lie aux GRE qui sont situés dans les régions promotrices des gènes cibles. La liaison du dimère de complexes hormone-récepteur a pour effet de modifier le taux de transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et celui de gènes encodant des protéines qui affectent la physiologie de la cellule [54]. Le deuxième mécanisme n'implique pas de GRE. C'est le cas par exemple des effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires qui impliquent une diminution de la transcription des gènes de la collagénase et de l'interleukine-2.

Dans ce cas, le complexe hormone-récepteur empêche la transcription de gènes cibles en interférant avec le complexe protéique AP-1 (*activating protein-1*) [53,54]. Des travaux récents ont aussi montré que l'activité transcriptionnelle des glucocorticoïdes pourrait être modulée par les proportions relatives des isoformes α et β de son récepteur. L'homodimère α donne un effet maximal alors que l'hétérodimère $\alpha\beta$, dû à une plus faible affinité de liaison à l'ADN et/ou une diminution de la capacité de trans-activation, ne stimule pas la transcription des gènes cibles aussi efficacement que l'homodimère α [54].

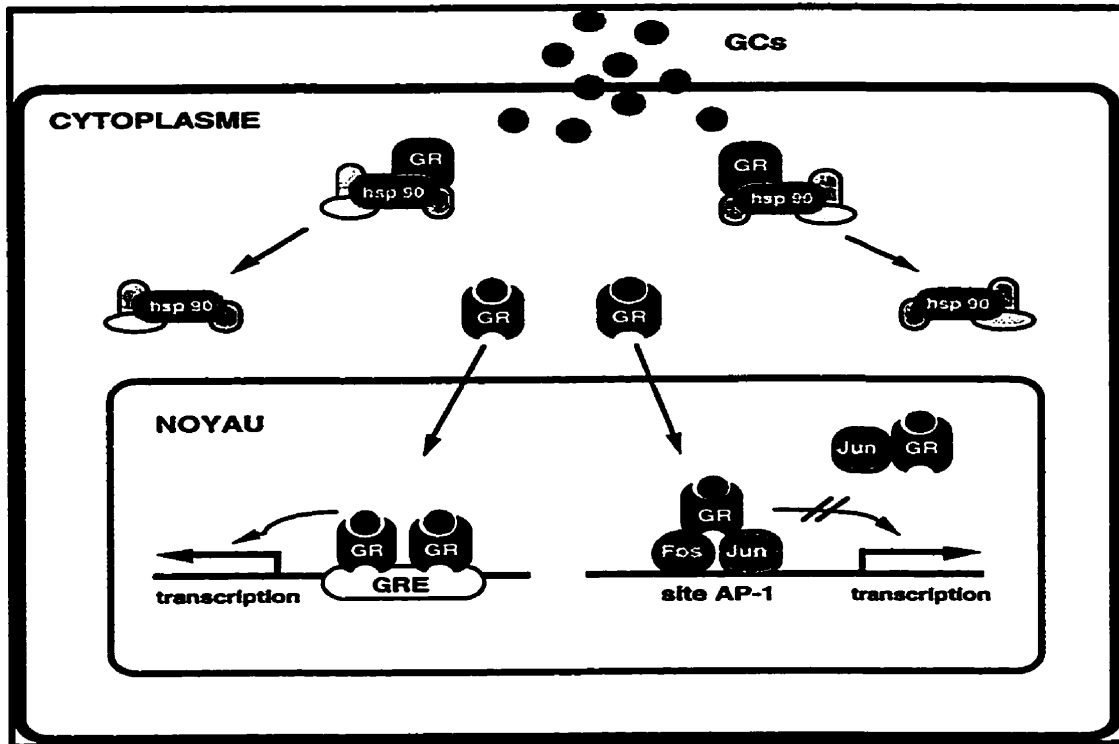


Figure 2.3 : Régulation transcriptionnelle par le récepteur des glucocorticoïdes (GR). La liaison de GCs au GR induit un changement de conformation qui a pour effet de dissocier le complexe GC-GR des complexes de protéines de choc thermique et de permettre la translocation du GR activé, du cytoplasme vers le noyau. Au niveau du noyau, le GR activé peut induire ou réprimer la transcription selon deux mécanismes: en interagissant avec la région régulatrice en ADN de gènes cibles, le GRE; ou en interagissant avec d'autres facteurs de transcription, tels que c-Jun ou AP-1.

2.2.3 Rôle des hormones stéroïdes dans l'homéostasie osseuse

2.2.3.1 Les glucocorticostéroïdes

En générale, les glucocorticostéroïdes (GCs) inhibent la synthèse de l'ADN, de l'ARN et de protéines tout en accélérant le catabolisme (dégradation) de protéines [49,50]. Ces actions au niveau du métabolisme intermédiaire se limitent : 1) au maintien de niveaux normaux de glucose plasmatique en augmentant la gluconéogenèse, 2) à l'augmentation de la production de glucose, de l'ARN et des protéines au niveau du foie, 3) à une diminution de la consommation de glucose et du métabolisme au niveau des muscles dont l'effet se traduit par une diminution de la synthèse de protéines et une augmentation de la libération des acides aminés, et 4) à une stimulation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux [49]. Les effets cataboliques des GCs se manifestent surtout au niveau de l'os, du muscle, de la peau et du tissu conjonctif. Ces mêmes effets sont responsables des effets secondaires tels que l'euphorie, l'athrophie musculaire et de la peau, la fragilité du tissu élastique (vergetures), la fragilité capillaire (ecchymoses) et l'ostéopénie [49,63]. Les GCs jouent aussi un rôle important dans l'adaptation à de nombreux types de stress, comme les traumatismes (accidentels ou chirurgicaux), les maladies infectieuses graves, les intoxications sévères et autres agressions [50]. Les GCs sont capables d'inhiber le développement d'une œdème et à faire regresser une inflammation déjà existante [50].

Il a été démontré qu'un traitement à long terme avec de doses pharmacologiques en GCs se traduit par l'état réfractaire d'une masse osseuse très diminuée et par des réductions de la minéralisation des os et du métabolisme du tissu conjonctif, un état communément appelé ostéoporose, et qui peut conduire aussi à une ostéopénie secondaire [63-65]. De nos jours, des traitements cycliques avec un biphosphonate ou l'hormonothérapie ovarienne peuvent prévenir ces effets en contre-carrant la résorption ostéoclastique [66].

Cependant, les effets de GCs sur les OBs, *in vitro*, semblent à priori contradictoires par rapport aux résultats *in vivo*. Il a été démontré que les GCs induisent, à une dose physiologique (10-50 nM), la différenciation des pré-OBs et la maturation des OBs engagés conduisant à la formation de nodules (colonies osseuses composées de plusieurs couches cellulaires semblables aux ostéocytes matriciels) [67-71]. Ces effets sont toutefois sous la dépendance d'une culture à long terme, menant à la différenciation d'un nombre suffisant de pré-OBs, et d'une exposition constante à de faibles niveaux de GCs. Les effets des GCs *in vitro* semblent dépendre, comme

ceux des hormones ostéotropes systémiques, du niveau d'hormone utilisé, du moment et du temps d'exposition et en particulier, du modèle expérimental utilisé (espèces, malignité cellulaire, source). Ainsi, dans les cultures primaires d'OBs humains, les GCs inhibent la prolifération cellulaire [70,72]. Sur des cultures provenant des os fœtaux ou néonataux de rat, les GCs à une dose physiologique, augmentent la synthèse de collagène et l'activité de la phosphatase alcaline au cours de premières 24 h, mais induisent une diminution de ces paramètres et de l'activité mitotique après 96 h [73]. Cette diminution semble être causée par une diminution de la prolifération des pré-OBs provenant du périoste [74]. Ainsi, bien que les GCs stimulent la différenciation des OBs et favorisent la formation de nodules *in vitro*, l'inhibition de la prolifération qu'ils exercent à long terme (telle qu'elle se produit *in vivo*) pourrait aussi réduire la différenciation de pré-OBs et conduire éventuellement à une diminution du nombre d'OBs et à la perte de masse osseuse observée.

Les GCs altèrent le métabolisme osseux indirectement en diminuant l'absorption intestinale de calcium et en variant les niveaux en PTH et en VD3 [63]. Les GCs agissent localement en augmentant les niveaux d'expression des récepteurs pour la PTH et la VD3 [75,76]; en diminuant les niveaux de transcription des IGFs [77] et des récepteurs pour les IGFs [78,79], ainsi que les niveaux protéiques de la protéine de liaison aux IGFs, IGFBP-2 [80]. Les GCs affectent la physiologie osseuse aussi en diminuant l'activité de TGF β (stimulation de la prolifération et de la synthèse de collagène par les OBs) dans le modèle des OBs provenant de os fœtaux de rat [81]. Avec des OBs humains normaux, dérivés de cultures primaires, Oursler [82] a démontré que les GCs provoquent une forte activation de la forme latente de TGF β 1, sans toutefois affecter les niveaux de production de la protéine ou de l'ARNm de TGF β 1. Les auteurs suggèrent que l'activation de TGF β 1 par le dexaméthasone pourrait être effectuée par des protéases lysosomiales telles que les cathepsines B et D [82]. Les GCs peuvent affecter la formation osseuse en diminuant aussi l'activité de dégradation de la MEO exercée par le système PA/plasmine [83]; dans ce phénomène, l'inhibition de l'ostéof ormation exercée par les GCs est effectuée par une augmentation du niveau d'expression de l'inhibiteur des PA, le PAI-1, sans affecter l'expression de uPA ou de tPA. Enfin, les GCs semblent affecter la physiologie osseuse en interagissant avec d'autres facteurs locaux, telles que les cytokines IL-1 α , IL-6 et le LIF (*leukemia inhibitory factor*), qui sont de puissants inhibiteurs de l'activité des OCs, de la formation osseuse et de la différenciation des pré-OBs [71,84,85].

Le GR a été détecté et étudié d'abord dans les cultures primaires et les lignées cellulaires des OBs chez le rat [73,77,86,87]. Le GR chez l'humain a été détecté plus récemment, mais

seulement dans les OBs dérivés des ostéosarcomes humains [88]. Une partie de notre étude a consisté justement à déterminer l'entière fonctionnalité du GR présent dans les OBs dérivés des ostéosarcomes humain et de rat (voir chapitres II, III et IV de la thèse). La spécificité de liaison aux GCs a été analysée par des essais de liaison au ligand (*hormone binding assays*), tandis que l'affinité de liaison avec l'ADN a été réalisée par des essais de rétention sur gel (*DNA band-shift assay*). L'activité transcriptionnelle du GR a été étudiée en évaluant les niveaux de transcription du gène rapporteur MMTV-tk-CAT (*mouse mammary tumor virus-thymidine kinase-chloremphenicol acetyl-transferase*), transfecté de façon transitoire dans les ostéoblastoïdes humain MG-63 et de rat UMR-106.

2.2.3.2 Les œstrogènes

En générale, les œstrogènes agissent comme un facteur de croissance pour les tissus qui sont impliqués directement ou indirectement dans les processus de reproduction. Ainsi, sur l'utérus, les œstrogènes stimulent la croissance de l'épithélium glandulaire de l'endomètre. Les œstrogènes stimulent également la croissance du muscle lisse de l'utérus et, peut-être indirectement, celle du système vasculaire utérin [50]. Au moment de la grossesse, les constituants glandulaires du sein sont soumis à l'influence combinée des œstrogènes et de la progestérone. Le développement du stroma et la croissance des canaux galactophores sont stimulés par les premiers alors que la croissance des glandes elles-mêmes est stimulée par la progestérone [50]. Au niveau du métabolisme hépatique, les œstrogènes produisent une augmentation de la synthèse de protéines de liaison ou de transport, incluant celles pour les œstrogènes, la testostérone et la thyroxine [49].

Les œstrogènes jouent un rôle important dans le métabolisme osseux, en maintenant une balance entre les activités ostéoblastique et ostéolytique [89]. Le récepteur des œstrogènes (ER) a été détecté dans les lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques en culture [90-93]. Tout dernièrement, Bodine et ses collègues [94] ont étudié le rôle du ER durant le développement progressif du phénotype ostéoblastique des OBs dérivés des os de calvaria chez le rat. La réponse à l'œstradiol a été évaluée à deux périodes de la maturation : au stade de formation de nodules (jour 14) et au stade tardif de minéralisation (jour 30). Ainsi, il a été déterminé que l'œstradiol supprime la production de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine, de l'ostéonectine et même l'expression de l'ARNm des ERs au jour 14, mais augmente l'expression de l'ARNm de toutes ces protéines au jour 30. Par contre, l'œstradiol stabilise les

ARNm du TGF β -1 et de la pro-collagénase de type I seulement au stade de minéralisation. Par ailleurs, de données récentes démontrent que les œstrogènes affectent le tissu osseux par des mécanismes autant directs qu'indirects qui se traduisent par des changements dans la concentration de facteurs de régulation locale et systémique [95-98]: augmentation de facteurs locaux ostéoformants tels que les IGFs et le BMP-6; diminution de l'expression de la forme membranaire du M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), un antagoniste des effets de l'œstradiol. De plus, les œstrogènes inhibent la résorption osseuse en induisant l'apoptose des OCs suite à une augmentation de la production de TGF β par les OCs [99,100,101]. Par ailleurs, ces diverses propriétés des œstrogènes peuvent expliquer les effets préventifs contre l'ostéopénie chez le rat femelle âgé et l'effet anti-ostéoporotique observés lors d'une hormonothérapie ovarienne appliquée chez les femmes post-ménopausées œstrogéno-déficientes [102,103].

2.2.3.3 Les androgènes

La fonction physiologique des androgènes concerne les caractères sexuels primaires et secondaires, le squelette, le muscle squelettique, l'équilibre hydrique et le comportement [49,50]. La différenciation et l'intégrité tant morphologique que fonctionnelle des structures sexuelles primaires chez l'homme dépendent entièrement des androgènes [49,50]. Ces structures comprennent les conduits responsables du transport des spermatozoïdes, les vésicules séminales et la prostate, les glandes bulbo-urétrales et les organes génitaux externes. Le penis et le scrotum sont également androgéno-indépendants. La carence en androgènes provoque des modifications marquées dans la texture et la répartition de la pilosité chez les deux sexes. Les androgènes ont aussi un effet stimulant sur les glandes cébacées (acnée commun) et sur le larynx, responsable du timbre de la voix. Les androgènes exercent une régulation de la croissance squelettique et une stimulation du muscle squelettique chez les individus en cours de croissance. Il est possible que le dénominateur commun aux effets des androgènes au niveau de la peau, du squelette et du muscle soit un effet général sur l'anabolisme protéique [50]. Enfin, les androgènes, conjointement avec la FSH, jouent un rôle essentiel dans le contrôle hormonal de la spermatogenèse au niveau des tubules séminifères [49,50].

De plus en plus de données cliniques et expérimentales soulignent l'importance des androgènes dans la physiologie osseuse de deux sexes. La présence de récepteurs des androgènes (AR) a déjà été démontrée dans les cellules osseuses et les chondrocytes *in vitro*

[104-107]. Tout dernièrement, le groupe du Dr Abu [108] a démontré pour la première fois la présence et la distribution des ARs, *in situ*, au niveau des os des deux sexes, et proposé l'existence d'un mécanisme d'action directe des androgènes sur les cellules de l'os et du cartilage. Les androgènes affectent une grande variété des fonctions ostéoblastiques, incluant la prolifération, la différenciation, la production de facteurs de croissance, de cytokines et de protéines de la MEO [44,107-113]. Par ailleurs, Orwell et Klein ont souligné dernièrement [114] la possible corrélation entre le déclin de testostérone chez les hommes âgés, la diminution de la force musculaire, la perte de masse osseuse et l'ostéoporose masculine.

2.3 Facteurs de croissance peptidique et physiologie osseuse

Tel que souligné plus haut, le remodelage osseux est contrôlé par un certain nombre d'hormones systémiques dont l'action dépendrait de la production de facteurs de croissance et cytokines locaux qui sont sécrétés par les cellules osseuses, emmagasinés dans la MEO et libérés lors de la résorption osseuse [115]. Parmi ces facteurs locaux, les membres de la superfamille de TGF β s et les IGFs constituent les plus importants régulateurs du remodelage osseux [115,116]. Les IGFs sont sécrétés par les OBs [115] et emmagasinés dans la MEO en liaison avec de protéines IGFBP (*IGF binding proteins*), lesquelles peuvent soit limiter, soit augmenter les effets des IGFs [117]. Les TGF β s sont produits localement par les OBs [118] et les OCs [119] et sont sécrétés et emmagasinés dans l'os sous une forme inactive en liaison avec la protéine de latence LBP (*latence binding protein*) [120]. Ces facteurs, en tant que médiateurs des hormones systémiques, agissent de façon biphasique au niveau de l'activation, la prolifération et/ou la différenciation autant des OBs que des OCs [121-125]. Ils seraient responsables du couplage entre la formation et la résorption osseuse.

2.3.1 Les IGFs (*insulin-like growth factors type I and II*)

2.3.1.1 *Production et sécrétion des IGFs*

Tel que décrit par Humbel [126], les IGFs sont des polypeptides à simple chaîne contenant trois ponts disulfures. Les séquences de formes matures du IGF-I (70 aa) et du IGF-II (67 aa) sont hautement conservées chez différentes espèces. Les IGFs possèdent des domaines pour se lier à des protéines spécifiques, soit leurs récepteurs membranaires respectifs et les IGFBPs. Les

peptides IGF-I et IGF-II affichent une homologie de séquence de 70% entre eux, et de 50% avec l'insuline [117].

Le IGF-I est avant tout sécrété par le foie, mais peut aussi être synthétisé et emmagasiné dans l'os en réponse à l'hormone de croissance [127]. Cependant, le IGF-I peut aussi être produit dans l'os, en réponse à la PTH et les hormones stéroïdes sexuelles, et dans d'autres tissus sous le contrôle d'hormones tropiques afin de promouvoir la croissance locale et/ou la différenciation: dans la glande mammaire par la GH; dans le cortex surrénalien par l'ACTH; dans les testicules par la LH et la FSH; dans l'utérus par l'œstradiol et la progestérone; et par les fibroblastes en réponse aux facteurs de croissance EGF, FGF et PDGF [48]. L'ARNm du IGF-II a été détecté dans une grande variété de cellules, incluant les cellules tumorales, mais la protéine est quelquefois indétectable [128].

Dans plusieurs tissus et fluides, les IGFs se retrouvent en complexe avec une famille de protéines de liaison spécifiques aux IGFs, nommées IGFBPs (*IGF-binding proteins*). Il existe au moins six IGFBPs impliquées dans la modulation de l'action des IGFs dans différents tissus, incluant l'os [123]. Environ 80% du IGF-I en circulation est lié au IGFBP3 et une sous-unité labile acide (ALS) [123]. Des six IGFBPs, le IGFBP4, reconnu pour inhiber l'action des IGFs, constitue le IGFBP majeur produit par les cellules osseuses humaines [129]. Par contre, le IGFBP5, un stimulateur de l'action des IGFs, affiche une très haute affinité pour l'hydroxyapatite et constitue le IGFBP majeur emmagasiné dans l'os chez l'humain [130,131]. Le IGFBP2 constitue le IGFBP majeur synthétisé par les ostéoblastoïdes fœtaux de rat, lesquels sécrètent aussi du IGFBP4 [132]. Par ailleurs, la production des IGFBPs est régulée soit au niveau de leur synthèse, en réponse à quelques facteurs de croissance, quelques hormones stéroïdes ou la GH [132], ou bien par des protéases spécifiques produites par les ostéoblastes [133] ou encore par le système PA/plasmine [134-136].

2.3.1.2 Mécanismes d'action des IGFs

La plupart des effets cellulaires des IGFs sont effectués suite à la liaison de ces peptides au récepteur pour le IGF-I (IGF-I.R). Le IGF-I.R est composé d'une sous-unité α extracellulaire de 706 a.a. et d'une sous-unité β transmembranaire de 626 a.a. [117]. Tout comme le récepteur pour l'insuline, avec qui l'homologie de séquence est de 50 à 60% et dont leurs domaines tyrosine kinase sont identiques à 84% [137], le IGF-I.R est un $\alpha_2\beta_2$ -hétérotétramère. Des essais

de liaison pour le IGF-LR ont démontré que l'affinité pour l'insuline est de 100 à 1000 fois plus faible que pour le IGF-I ($K_d = 0.2-1 \text{ nM}^{-1}$). L'activation du récepteur, par liaison avec le IGF-I, produit une phosphorylation du récepteur au niveau des résidus tyrosine et sérine spécifiques [117]. L'autophosphorylation des résidus tyrosine s'est produit par l'activité tyrosine kinase d'une de deux sous-unité β qui phosphoryle alors les résidus tyrosine de l'autre sous-unité β du tétramère $\alpha_2\beta_2$ [138]. Les travaux de Kato et ses collègues [139] ont démontré que l'activité tyrosine kinase de la sous-unité β est nécessaire pour induire la cascade de signalisation intracellulaire et la réponse biologique du IGF-I et son récepteur.

Le récepteur pour le IGF-II (IGF-II/Man-6-P) est un récepteur monomérique capable de lier les résidus mannose-6-phosphate présents sur les enzymes lysosomiales [140]. Le rôle de ces récepteurs membranaires, présents dans le réseau *trans* de l'appareil de Golgi, est de permettre la translocation des enzymes lysosomiales dans les endosomes. La constante d'affinité du récepteur IGF-II/Man-6-P pour le IGF-II varie entre 0.017 à 0.7 nM [140]. L'affinité du récepteur IGF-II/Man-6-P pour le IGF-I est plus que 500 fois plus faible que pour le IGF-II, mais ne se lie pas du tout à l'insuline. La liaison du IGF-II au récepteur IGF-II/Man-6-P est suivie par l'internalisation et la dégradation de IGF-II. Ce processus est inhibé par les enzymes lysosomiales [141]. Bien que le rôle du récepteur IGF-II/Man-6-P en tant que médiateur de la séquestration et la dégradation du IGF-II est généralement bien accepté [141], la médiation des actions biologiques du IGF-II par ce type de récepteur est beaucoup moins claire [117].

2.3.1.3 Rôle des IGFs dans la physiologie osseuse

L'effet systémique majeur du IGF-I, produit en réponse à la GH dans le foie, se manifeste par une stimulation de la croissance des os et du cartilage, résultant en une croissance linéaire du squelette [44,47,127]. À partir de résultats cliniques sur les effets à long terme du GH chez les patients GH-déficients, un modèle biphasique a été proposé [47]: la GH induirait d'abord une nette résorption osseuse jusqu'à atteindre un point de transition, suivi d'une phase de formation de l'os. Les études récentes de Guicheux et ses collègues [142] semblent confirmer ce modèle : les effets de la GH, sur l'activité ostéoclastique dans un système non fractionné de culture osseuse chez le lapin, sont médiés partiellement via un effet direct du IGF-I. Par contre, dans une autre étude, les effets à court terme avec la GH et IGF-I chez de patients GH-déficients ont démontré que l'effet ostéoformant du IGF-I n'est pas précédé d'une activité ostéoclastique

[143]. De plus, puisque les niveaux en VD3 augmentent tandis que ceux de la PTH, du calcium et du phosphore restent constant au cours du traitement, le IGF-I semble stimuler l'activité de la 1- α -hydroxylase *in vivo*.

D'autres études *in vitro* ont démontré que les IGFs stimulent la prolifération des OBs [127], des pré-OBs [123] et des OCs [125]. De plus, les IGFs sont capables d'induire la synthèse du collagène par les OBs [124] et favoriser la formation de la MEO [123]. Les travaux de Linkhart [115] ont démontré que dans les cultures des os calvaria chez la souris, la PTH, la VD3 et le TGF β sont capables d'induire autant la résorption osseuse que la libération des IGFs. Par contre, Staal [116] a démontré, d'une part, que le IGF-I augmente la production en ostéocalcine (une protéine de la MEO), et d'autre part, que le IGF-I bloque la résorption induite par la PTH et la VD3 dans de cultures provenant des os long chez la souris. De plus, il a été démontré que les facteurs de croissance FGF-2, PDGF-BB et le TGF β 1, diminuent l'expression de l'ARNm du IGF-I dans les cultures des OBs provenant de l'os calvaria foetal de rat [144]. L'ensemble de ces résultats soulignent en fait l'importance des IGFs dans la fonction cellulaire des OBs et dans le couplage entre la formation et la résorption osseuse.

2.3.2 Les TGF β s (*Transforming growth factor beta*)

2.3.2.1 *Production et sécrétion des TGF β s*

Les 5 peptides TGF β s appartiennent à une mégafamille de facteurs de croissance et de différenciation ubiquistes [145]. Les TGF β s de type 1 à 5 présentent une analogie de structure supérieure à 70% et une similitude fonctionnelle. Par contre, l'analogie de structure est inférieure à 40% avec les molécules "cousines" du reste de cette mégafamille. Ces molécules ont toutefois des fonctions biologiques distinctes, et parmi lesquelles on retrouve l'activine et l'inhibine, plusieurs facteurs morphogénétiques et certains facteurs neurotrophiques.

L'os représente la source corporelle humaine majeure en TGF β : il est présent à environ 0.3 mg/kg de tissu osseux, ce qui représente environ 1/10 de la quantité obtenue à partir de plaquettes. En contraste, on ne retrouve que 3 à 5 μ g de TGF β par kg dans les tissus mous comme le placenta ou le rein [146]. Dans le plasma humain, les TGF β s sont stockés et transportés sous forme de complexes latents avec l' α_2 -macroglobuline (petit complexe latent). Dans plusieurs tissus, y compris l'os, le TGF- β 1 nouvellement synthétisé est relâché de la

cellule sous forme d'un complexe inactif. Le TGF- β 1 dimérique est en fait lié à un ensemble de protéines dont la LAP (*latency-associated peptide*), qui est la portion N-terminale du précurseur de TGF- β 1, formant ainsi la forme latente de TGF- β 1 (*latent-TGF- β 1*) [120]. Les complexes α_2 -macroglobuline-TGF β et LAP-TGF- β peuvent être liés de façon covalente à la LTBP (*latent TGF β binding protein*), une protéine de 125 à 160 kDa qui contient des séquences répétitives semblables à l'EGF [147], formant alors les grands complexes latents [148]. Exceptés les complexes covalents α_2 -macroglobuline-TGF β , les autres formes latentes peuvent être activées par des traitements physico-chimiques divers tels que l'acidification, l'alcalinisation, le chauffage à 80°C et l'addition de détergents [149]. *In vivo*, l'activation par pH acide constitue le seul mécanisme physico-chimique observé. Dans le processus de résorption osseuse, les ostéoclastes recouvrent une poche de résorption dans laquelle le pH est extrêmement acide (pH<3). Il en résulte une déminéralisation de la MEO et une activation du TGF- β 1 latent [150]. Cependant, dans plusieurs tissus, y compris l'os, l'activation du TGF- β 1 latent par l'action de protéases (plasmine, cathepsine D) représente le mécanisme d'activation le mieux caractérisé [134,135,151-153]. Dernièrement, un deuxième mécanisme physiologique d'activation a été proposé [148,154,155]. Ce mécanisme implique la participation des thrombospondines de type 1 ou type 2 (TSP1 et TSP2), deux protéines trimériques sécrétées par les plaquettes sanguines activées par la thrombine et présentes dans la MEO. L'activation du TGF- β latent résulterait alors d'un changement conformationnel du complexe LAP-TGF- β induit par l'association de TSP1 et de la protéine LAP, et dont l'effet serait potentialisé en présence de TSP2 [155].

2.3.2.2 Mécanisme d'action des TGF β s et leurs récepteurs

Les TGF β exercent leurs nombreux effets biologiques par l'intermédiaire de récepteurs membranaires ubiquistes de forte affinité [145,146,156]. Trois types de récepteurs sont présents sur pratiquement tous les types cellulaires: un protéoglycane transmembranaire de 200-400 kDa dénommé bêtaglycane (ou RIII) constituant un récepteur de stockage et présentant le TGF β avec une affinité accrue à ses deux récepteurs de signalisation (RI et RII). Ces deux récepteurs transmembranaires sont doués d'une activité sérine/thréonine kinase intrinsèque portée par leur domaine cytoplasmique. La liaison de TGF β sur le récepteur de type II induit une hétérodimérisation RI/RII et une transphosphorylation du domaine intracytoplasmique de RI par RII qui conduit à une stimulation de son activité sérine-thréonine kinase [156,157].

2.3.2.3 Rôle des TGF β s dans la physiologie osseuse

Parmi les cinq gènes de TGF β connus à l'heure actuelle, trois seulement (TGF β 1 à 3) sont exprimés chez les mammifères [148], et le TGF β 1 est le plus étudié. Ces nombreuses actions sont abordées plus en détails aux références 145 et 146. Le TGF β 1 est impliqué, entre autres, dans le contrôle du développement, de la croissance et de la différenciation cellulaire chez l'humain et une variété d'autres espèces. Cette multifonctionnalité dépend du type de cellule et de leur état de différenciation. Parmi d'autres activités, le TGF β 1 a la capacité d'induire la formation de mésoderme au cours de l'embryogenèse, d'être chimioattractif pour les monocytes, d'inhiber les fonctions lymphocytaires (immunosuppression), d'inhiber la prolifération de divers types de cellules épithéliales et des cellules endothéliales, d'inhiber l'adipogenèse et de diminuer les fonctions stéroïdogènes de certaines cellules endocrines.

L'os est une source majeur en TGF β 1. Il est libéré et activé au niveau des sites en résorption. À partir d'expériences faites *in vivo*, on sait que le TGF β 1 a un effet stimulant sur l'ostéogénèse et la chondrogénèse. Lorsque TGF β 1 est injecté sous le périoste du fémur d'un jeune rat, il induit les cellules mésenchymateuses à se différencier en ostéoblastes et en chondrocytes; ensuite, il stimule ces mêmes cellules à proliférer et à synthétiser les protéines de la matrice extra-cellulaire et celles caractéristiques de l'os et du cartilage [158].

Les effets de TGF β 1 sur les ostéoblastes *in vitro*, à partir des études sur différents modèles cellulaires, ont donné des résultats contradictoires. Il a été démontré que l'effet de TGF β 1 sur les ostéoblastes dépendait de la dose de ce facteur de croissance, de la densité et de l'état de différenciation des cellules ostéoblastiques [159]. Trois hypothèses découlent de ces études : le TGF β 1 stimule la prolifération des ostéoblastes mais n'a pas d'effet sur la différenciation; le TGF β 1 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire, mais stimule la différenciation des ostéoblastes; le TGF β 1 inhibe à la fois la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. Plus récemment, l'utilisation de souris transgéniques, dans lesquelles la surexpression de TGF β 2 par les OBs a été ciblée, a démontré que le TGF β peut induire directement la résorption osseuse [160]. La surexpression spécifique de TGF β 2 par les OBs se traduit alors par une perte progressive de l'os, associée à une diminution de formation ostéoblastique de la MEO par les OBs et à une augmentation de la résorption osseuse. Ce qui suggère qu'une présence continue de TGF β peut produire, à long terme, un effet opposé à celui observé *in vivo* dans de conditions physiologiques normales.

Le TGF β 1 influence l'activité des OBs et des OCs en culture, avec des effets directs sur les OBs *in vitro* à une concentration de 100pg/ml [121]. Le TGF β 1 peut ainsi modifier l'expression de plusieurs gènes associés à la fonction des ostéoblastes. *In vivo* et *in vitro*, le TGF- β 1 stimule la synthèse de collagène de type I, protéine importante pour l'intégrité structurelle et la calcification de l'os. Le TGF β 1 induit aussi la synthèse d'autres macromolécules de la matrice osseuse, y compris l'ostéopontine et l'ostéonectine [120]. *In vitro*, le TGF β 1 semble stimuler les événements précoces impliqués dans la formation d'os, incluant le chimiotactisme des précurseurs des ostéoblastes et la prolifération de ceux-ci. Ces effets peuvent aussi être indirects via la production de facteurs mitogéniques par les ostéoblastes.

Par ailleurs, il a d'abord été déterminé que le TGF β 1 agirait comme un inhibiteur de la résorption osseuse en inhibant la formation et l'activation des OCs [116,121]. Par contre, les travaux de Chen et Bates [122] ont démontré que le TGF β 1 recombinant (rat/humain) altère le remodelage osseux en réduisant le contenu en calcium des os, mais suite à une incapacité à intégrer le calcium plutôt que par une augmentation de la résorption osseuse. Les auteurs ont aussi démontré que le (r/h)TGF β 1 stimule la synthèse de collagène sans affecter l'activité de la phosphatase alcaline à long terme (6 jours de traitement).

Il est à noter que les OCs sont aussi responsables de l'activation du TGF β 1 [121,150]. De plus, dans la plupart des modèles de cellules ostéoblastiques en culture, la synthèse de TGF β 1 est augmentée par la PTH et la VD3 (deux hormones ostéorésorbantes), et par les hormones sexuelles (lesquelles favorisent la formation de l'os). Ces résultats suggèrent donc, comme pour le IGF-I, un rôle pour le TGF β 1 en tant que médiateur du couplage entre la formation et la résorption osseuse.

2.3.3 IGFs et TGF β s: récepteurs et voies de signalisation

Tout comme le PDGF et le EGF, les IGFs se lient à des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique caractérisés par une activité tyrosine kinase localisée sur l'extrémité C-terminale cytoplasmique du récepteur. Les effets biologiques résultant de l'activation des récepteurs à tyrosine kinase sont généralement liés à la régulation de processus anabolique de croissance et de différenciation. Ces récepteurs se phosphorylent eux-mêmes en réponse à la liaison avec le ligand. L'autophosphorylation implique des résidus phosphotyrosines individuels sur les

récepteurs. Ces sites de liaison phosphorylés seraient hautement sélectifs pour certaines molécules cytoplasmiques de signalisation. Les nombreuses molécules de signalisation impliqués médieraient les réponses pléiotropiques des cellules en regard des facteurs de croissance.

Ainsi, les récepteurs pour les IGFs, le PDGF et le EGF empruntent une voie commune de signalisation [161]. Cette voie, *la voie de ras*, est très bien connue et implique plusieurs molécules de transduction, telles que les kinases pour la PI(phosphotidile inositol)-3, la protéine Grb(*growth factor receptor-bound protein*)-2, Ras, Raf, p92, le facteur d'échange de guanine Sos et la cascade de MAP(*mitogen-activated proteins*)-kinases [117,162-164]. Enfin, il faut souligner que les IGFs, comme la majorité de facteurs de croissance agissent au niveau de la phase G₁ du cycle cellulaire. Ces facteurs accélèrent en fait le passage de cellules activées vers la phase S, correspondant à la phase de synthèse de l'ADN. Ces facteurs sont ainsi reconnus en tant que facteurs ou hormones de progression [165]. Les facteurs présents dans le plasma ou le PDGF sont reconnus pour permettre le passage de cellules en phase G₀ (quiescence) vers la phase G₁. Ces facteurs dit de compétence rend les cellules sensibles aux facteurs de progression mais sont incapables d'initier eux-mêmes la division cellulaire [165].

La voie de signalisation des TGFβs diffère de celle des IGFs du fait que l'autophosphorylation de leurs récepteurs implique plutôt de résidus serine et thréonine individuels et de molécules de signalisation différentes telles que les protéines DPC4 [166], Smad2 et Smad3 [167], toutes les trois de la famille du gène Mad (*Mothers against dpp*) [168], la molécule farnesyltransférase-α et la protéine MAPKKK (TAK1) [169]. Les TGFβs sont reconnus pour agir en tant qu'inhibiteurs de la croissance de plusieurs types de cellules, incluant les cellules épithéliales normales et cancéreuses en culture [167,170]. L'effet inhibiteur de TGFβ1 exercé par l'activation du récepteur de type II, par exemple, se traduit par un blocage au niveau de la phase G₁ et par une augmentation transitoire de la production des molécules inhibitrices de kinases cyclines-dépendantes p21^{WAK-1/Cip1} et p27^{Kip1} [171]. Dans les cellules épithéliales normales, la phosphorylation de la protéine Smad3 est essentielle pour l'effet anti-prolifératif et l'activation de l'inhibiteur de l'activateur de la plasmine PAI-1 [167]. Atfi et ses collègues [166] ont récemment déterminé que l'induction de l'apoptose par le TGFβ implique la phosphorylation de la protéine DPC4 à travers la voie de signalisation de SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*). Par ailleurs, la découverte de l'autophosphorylation du récepteur de type II au niveau de résidus tyrosine (aux positions 259, 336 et 424), dans un système cellulaire d'insectes suggère une dualité de fonction pour ce

récepteur [172]. Ce phénomène pourrait expliquer en partie la multifonctionnalité des TGFβs. Un autre facteur à retenir impliquerait le phénomène de conversation croisée (*cross-talk*), souvent observée entre les voies de signalisation de différents facteurs de croissance.

2.3.3.1 Facteurs de croissance et phénomène de conversation croisée

L'existence d'un phénomène de dialogue ou de conversation croisée (*cross talk*) entre les récepteurs (membranaires) origine des observations qui ont montré qu'un même ligand pouvait activer différents récepteurs [173] : l'histamine, par exemple, peut activer ses récepteurs en concentration de l'ordre de 10^{-6} M et les récepteurs de l'acétylcholine en concentration de 10^{-4} M. Ce phénomène prend aujourd'hui une dimension encore plus importante dans la transrégulation en aval des récepteurs. En effet, le fonctionnement normal d'une cellule requiert une coordination fine entre les différents sentiers de transduction des signaux qui sont activés, suite à l'interaction d'un ligand avec son récepteur. Cette coordination est réalisée, entre autres, au moyen de conversation croisée inter-sentiers. Les travaux de Marx [174] ont ainsi déterminé l'existence de conversation croisée, chez certaines cellules, entre les sentiers générant de l'AMPC (second messenger généré par des récepteurs couplés au système de la *protéine Guadénylate cyclase*; tels que ceux pour le glucagon ou l'ACTH, par exemple) et le sentier *Ras*. Ces interactions impliquent, possiblement, une augmentation de l'activité de la protéine kinase A (PKA) par l'AMPC qui bloquerait la transmission du signal de *Ras* à *Raf-1*, et empêcherait par le fait même l'activation de la cascade des MAP kinases [174].

D'autre part, il a été déterminé que la voie de signalisation du récepteur pour le IGF-I entre en communication avec les voies de récepteurs pour le EGF et le PDGF par le biais de protéines Grb2 et Shc (*SH2-containing protein* ; un substrat pour la famille de kinases Src), [117]. Reinakainen et ses collègues [175] ont démontré qu'il existe une conversation croisée entre la voie de signalisation médié par les androgènes avec les sentiers de transduction des quelques facteurs de croissance et leurs récepteurs (à activité tyrosine kinase), tels que ceux du IGF-I et du EGF. De plus, la voie de signalisation du IGF-I est modulée par d'autres systèmes de signalisation incluant ceux des protéines G, de la protéine kinase C, ou de la voie de transduction JAK/Stat, lesquels sont reconnus pour entamer une conversation croisée avec le IRS(*insulin receptor substrate*)-1 [161]. Le IRS-1, autant que la protéine Shc, constituent les principales protéines tyrosine-phosphorylées qui se lient à Grb2 dans la phase initiale de la signalisation de IGF-I [176].

Il est reconnu que le TGF β interfère avec l'action de plusieurs facteurs mitogéniques incluant le IGF-I, le PDGF, le EGF et le FGF, suggérant un mécanisme possible de conversation croisée avec la voie de signalisation de leurs récepteurs respectifs [146]. Ce mécanisme pourrait impliquer une diminution des niveaux de protéines et d'activité pour les protéines de la voie de signalisation de la famille de kinase Src, telles que pp60Src et pp53/56Lyn [177]. Ces variations conduiraient à la rupture des complexes Shc-Grb2 et, par conséquent, à une régulation négative du sentier *ras*. Par ailleurs, il a été rapporté que les divers mécanismes de transduction des membres de la superfamille de TGF β s impliquent de kinases spécifiques et des inhibiteurs de protéines G. Ces études, portant sur de mesures de l'activation et de niveaux des molécules intermédiaires de signalisation suggèrent qu'au moins une voie de signalisation interagit avec la voie de protéines Ras et Raf via une protéine G intermédiaire. Il a été proposé que la protéine Raf amorcerait la cascade de kinases cytoplasmiques qui mène à la régulation de gènes sous contrôle des membres de la famille de TGF β s [178]. Plus récemment, Krymskaya et ses collègues [179], ont démontré que l'activation des récepteurs de type I et II par le TGF β 1 peut moduler l'activité de la PI-3 kinase stimulée par les facteurs de croissance, tels que le EGF, dans les cellules hASM (*human airway smooth muscle cells*).

2.4 Matrice extracellulaire osseuse et facteurs de croissance

Les fonctions majeures d'une matrice extracellulaire sont de procurer un support physique aux tissus et de maintenir la viabilité cellulaire. Les interactions cellule-matrice extracellulaire permettent, entre autres, d'influencer la migration, la morphologie, la croissance et la différenciation cellulaire. Les matrices extracellulaires sont très diverses d'un point de vue structure, mais cette variation se produit de façon tissu-spécifique. La MEO et la membrane basale, par exemple, ont un contenu en protéines matricielles différent permettant d'optimiser les fonctions individuelles de ces dernières et des cellules qu'elles supportent [180]. Il est à noter que la MEO est composée surtout de collagène de type I mais aussi de protéoglycanes, de glycoprotéines (fibronectine), de thrombospondine et des protéines essentielles pour le processus de minéralisation (ostéonectine, ostéocalcine, ostéopontine, etc.) [181]. Les interactions cellule-MEO sont effectuées par une famille de récepteurs membranaires, les intégrines, capables de lier le collagène de type I, la fibronectine et la thrombospondine. Toutes ces protéines matricielles possèdent un domaine d'attachement cellulaire contenant un tripeptide, RGD (arginine-glycine-acide aspartique), permettant de les lier aux intégrines [29,180,181].

Au niveau du tissu osseux, la MEO semble jouer un rôle important dans le stockage des facteurs de croissance impliqués dans la régulation locale du remodelage osseux. Le remodelage osseux implique que toutes les composantes de la MEO soient d'une part dégradées et d'autre part synthétisées, réorganisées et minéralisées dans la MEO. Ces composantes sont virtuellement toutes dégradées par une famille de métalloprotéases (MMPs) qui incluent la collagénase interstitielle MMP-1, les gélatinases MMP-2 et MMP-9 et la stromelysine [182]. L'activité protéolytique de ces enzymes est contrôlée à deux niveaux: a) par la présence des activateurs de leur forme pro-enzymatique, principalement par ceux du système PA/plasmine [134,135] et b) par la présence des inhibiteurs spécifiques, soient le TIMP-1 et le TIMP-2 [182]. Les collagénases, leurs activateurs et leurs inhibiteurs sont sensés être sécrétés par les ostéoblastes, selon leur niveau de différenciation [182], et régulés par un certain nombre d'hormones ostéorésorbantes, telles que la PTH et la VD3 [182-184].

Au niveau du remodelage osseux, le système PA/plasmine semble jouer un rôle central à trois niveaux: 1) par une activation de pro-collagénases [185]; 2) par une activation de la forme latente de facteurs de croissance, surtout les IGFs [136] et TGFβs [151]; et 3) par un effet mitogénique de l'uPA, ou plus précisément par le ATF de l'uPA [186]. Ainsi, à leur tour, les IGFs et les TGFβs libérés et actifs agissent comme puissants stimulateurs de formation d'une nouvelle MEO [187]. Les deux facteurs sont impliqués dans la production du collagène de type I et dans l'inhibition de la dégradation de la MEO, et contribuent ainsi à l'accumulation de la MEO. Les deux facteurs peuvent aussi augmenter la production d'autres protéines matricielles. Le IGF-I augmente la production d'ostéocalcine in vitro autant dans les cellules ostéoblastiques humaines [187] que des souris [116]. En ce qui concerne le TGFβ1, il a été démontré être capable de stimuler la production de plusieurs protéines matricielles, telles que le collagène, la fibronectine, les protéoglycanes, l'ostéonectine et l'ostéopontine [121,187]. Il existe deux autres voies par lesquelles le TGFβ1 peut favoriser la formation de la MEO en agissant sur la fonction des OBs: soit par une stimulation de la production des inhibiteurs de protéases, telles que le PAI-1; ou bien, par une inhibition de la production de protéases, telle que la PA [121,122,134,135,187]. La conversion du plasminogène en plasmine, qui semble être l'activateur physiologique majeur de collagénases latentes, est grandement facilitée par la liaison du plasminogène à certaines protéines matricielles. Une de ces protéines semble être la thrombospondine dont la production est stimulée par le TGFβ1 [188]. Ainsi la TSP peut à son tour activer la forme latente de TGFβ1 [148,154,155].

3 LES MÉTASTASES OSSEUSES

Les métastases osseuses des cancers sont très fréquentes. Bien que près de 50% de tous les cancers peuvent en produire, certains sont remarquablement ostéophiles, surtout les cancers du sein et de la prostate, puis ceux du rein, du poumon et du corps thyroïde. Les métastases osseuses peuvent produire deux types de réactions avec le tissu osseux: une réaction ostéolytique ou une réaction ostéoblastique, bien que parfois on observe une réaction mixte où le processus de réparation apparaît à côté du processus de destruction. Les métastases ostéolytiques sont les plus fréquentes, habituellement multiples et classiquement représentées par celles d'origine mammaire. Les métastases ostéoblastiques s'observent surtout dans les cancers osseux d'origine prostatique.

3.1 Les métastases ostéoblastiques: le modèle du cancer de la prostate

Des études cliniques ont démontré qu'environ 80% des patients atteints de cancer de la prostate développent des métastases osseuses qui sont accompagnées par des lésions ostéoblastiques [189]. Parmi les tumeurs solides qui produisent des métastases au niveau du squelette, les adénocarcinomes prostatiques sont les seules qui produisent des réactions ostéoblastiques. L'incidence des métastases ostéoblastiques pures est de 95% pour les métastases du cancer de la prostate tandis qu'il n'est que de 8% pour les métastases du cancer du sein. Les lésions lytiques pures dans le cancer de la prostate sont un phénomène extrêmement rare. Conséquemment, les métastases d'adénocarcinome de prostate sont uniques par leur capacité de promouvoir la formation de nouvelles masses osseuses [189-191].

Les carcinomes prostatiques métastasent avant tout à la colonne vertébrale, au bassin et dans les côtes, puis à un stade avancé, ils s'étendent au fémur et peuvent atteindre aussi la ceinture scapulaire, l'humérus, le sternum, assez souvent le crâne, et dans certains cas l'ensemble du squelette [192-194]. Les caractères particuliers des métastases osseuses du cancer de la prostate sont leur extension, leur diffusion et leur uniformité. En général, la densification osseuse observée est plus uniforme que dans les métastases ostéoblastiques des cancers du sein où l'on observe souvent une évolution de la réaction ostéoblastique conjointe avec de l'ostéoporose: des plages de décalcification voisinent alors avec des foyers condensants.

3.1.1 Génèse et progression du cancer de la prostate

3.1.1.1 *Les mutations génétiques à l'origine du cancer de la prostate*

L'étiologie du cancer de la prostate, ou encore celle de l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP), sont encore mal connues. Jusqu'à présent, aucun changement chromosomique spécifique n'a été établi avec certitude dans la génèse du cancer de la prostate; même encore, il est impossible de désigner une simple aberration chromosomique comme étant la première à se produire et à être responsable du développement d'un adénocarcinome prostatique. Cependant, comme plusieurs types de cancers, le modèle selon lequel le cancer de la prostate se développerait à travers une série d'altérations génétiques, incluant les gènes suppresseurs de tumeurs (p53, par exemple) et des oncogènes (tel que *ras*), est actuellement bien acceptée. Ainsi, l'accumulation de ces changements contribuerait à la progression des tumeurs qui deviendraient éventuellement malignes, en grossissant leur taille et en acquérant la capacité d'envahir et de métastasier [195].

Il a été établi que certaines régions des chromosomes (principalement les bras 8p, 10q et 16q) sont perdues au cours de la progression du cancer de la prostate. Toutefois, les mécanismes moléculaires de ces altérations dans la progression de la maladie sont encore mal compris. Des données cytogénétiques récentes suggèrent que l'hétérogénéité génétique, tout comme l'hétérogénéité phénotypique et biologique, constituent le caractère commun de la tumeur primaire du cancer de la prostate [196]. Ces résultats ont été obtenus par une fine technique de microdissection et amplification de l'ADN par PCR. Ainsi, Mme Macintosh et ses collègues ont déterminé que 100% des biopsies analysées portaient une perte d'hétérozygoté au chromosome 8p. De plus les auteurs suggèrent que la perte des allèles alternatifs de la région télomérique 8p22-pter, observées sur différents foyers tumoraux, se produit suite à deux mutations indépendantes (ou plus) durant le développement tumoral. Ainsi, les lésions génétiques au niveau du locus 8p22 se produirait très tôt dans la progression et, suivant une dissémination latérale du cancer, ces altérations seraient présentes dans les sous-clones disséminés. Plus tard, des mutations additionnelles, incluant la perte de séquences télomériques 8p22-pter ainsi que sur d'autres chromosomes, donnerait lieu à de sous-clones hétérogènes à l'intérieur de la tumeur primaire.

3.1.1.2 *Rôle des androgènes et des interactions épithélium/stroma dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate*

La prostate est une glande qui, chez l'adulte mâle, requiert le support constant d'un niveau adéquat d'androgènes en circulation pour sa croissance et le maintien de son intégrité structurale et fonctionnelle: l'élimination ou la privation de ce support en androgènes résulte en un processus actif impliquant une cascade d'étapes biochimiques qui conduisent à la mort cellulaire programmée (apoptose) de cellules épithéliales glandulaires [201,202]. Le rôle exact des androgènes dans l'étiologie du cancer de la prostate est encore inconnu. Les androgènes pourraient jouer un rôle, soit dans *l'initiation*, en supposant que l'activité du AR aurait un potentiel oncogénique, soit dans *la promotion* ou *la progression*, en stimulant la croissance et l'activité cellulaire de clones initiés. Cependant, quoique les androgènes sont *in vivo* les plus puissants facteurs mitogéniques pour la prostate, ils n'ont pas d'effet sur les cellules épithéliales en culture, dont la prolifération est directement stimulée par des facteurs de croissance solubles présents dans le sang et le tissu prostatique [203].

La prostate est composée d'une variété de cellules spécialisées qui peuvent être classées simplement en cellules épithéliales et stromales [197,198]. L'épithélium prostatique normal est composé de deux populations cellulaires majeures: les cellules basales et les cellules luminales (ou glandulaires). Les cellules neuroendocrines constituent une composante mineure du tissu épithéliale prostatique [198]. Ces cellules sont relativement plus abondantes dans les adénocarcinomes que dans le tissu normal ou hyperplasique [204]. Les cellules stromales prostatiques constituent un groupe de cellules mésenchymateuses possédant la capacité de changer leur phénotype en réponse aux changements du micro-environnement [19,199]. À la base, on distingue deux types majeurs de cellules stromales : le premier type, majoritaire, correspond à des cellules positives pour l'actine du muscle lisse et négatives pour la vimentine, appelées myofibroblastes, et le deuxième type à des cellules actine-négatives et vimentine-positives, correspondant à des fibroblastes.

Les cellules "souches", ou cellules avec capacité de se régénérer, sont supposées exister originellement dans la population des cellules basales. Les cellules basales comportent davantage de récepteurs pour le EGF (epidermal growth factor) que les cellules luminales. Les ligands pour ce récepteur, soit le EGF et le TGF α , sont reconnus pour être des puissants mitogènes pour les cellules épithéliales prostatiques *in vitro*, et sont présents dans le tissu prostatique; ces facteurs étant synthétisés possiblement d'abord par les cellules stromales

[197,198]. Par contre, le récepteur des androgènes (AR) est exprimé seulement par les cellules épithéliales luminales qui possèdent un faible pouvoir de régénérescence. Ainsi, puisque les cellules luminales disparaissent suite à la privation en androgènes [202], il est possible que les androgènes agissent comme facteur de survie plutôt que comme agent de prolifération dans les cellules épithéliales luminales. Par ailleurs, bien que les cellules neuroendocrines elles-mêmes semblent être non-prolifératives, on a constaté que les cellules épithéliales prolifératives (cellules basales) sont localisées de façon préférentielle tout près des cellules neuroendocrines [205]. Ces données suggèrent que les facteurs de croissance sécrétés par les cellules neuroendocrines réguleraient de façon paracrine la prolifération des cellules épithéliales.

Les interactions paracrines épithélium-stroma jouent un rôle majeur au cours de la morphogénèse de la prostate lors du développement embryonnaire, pendant le développement de la prostate et au cours de la croissance et la régression de la prostate médiées par les androgènes [199,201,202]. Ainsi, dans le cas de la prostate chez l'adulte, il a été déterminé que les récepteurs des androgènes sont autant présents dans les deux types de cellules, mais que seules les cellules stromales produisent la 5 α -réductase, une enzyme centrale de la stéroïdogénèse masculine qui transforme la testostérone en DHT à partir des précurseurs surrénaliens, tels que le DHEA et le DHEA-S [51,52]. De plus, les facteurs de croissance, tels que les IGFs et les FGFs, sont reconnus pour auto-stimuler la prolifération des cellules stromales et cellules épithéliales dont les deux types de cellules possèdent leurs récepteurs [199]. Les cellules stromales sont d'ailleurs la source majeure en IGF-I dans le tissu prostatique, mais aussi, dans une faible proportion, en IGF-II. Elles semblent être aussi la source de grandes quantités des facteurs apparentés EGFs/TGF α et des facteurs TGF β s, et dont les récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales [198]. D'autres travaux ont permis d'identifier quelques facteurs paracriniens, tels que le KGF et le NGF (pour Keratinocyte et Nerve Growth Factors), et qui pourraient constituer les premiers facteurs à suggérer l'existence de la régulation de l'épithélium par le stroma prostatique suite à une stimulation par les androgènes [199]. Ainsi, on a découvert que les cellules stromales produisent du KGF mais ne possèdent pas les récepteurs correspondants tandis que les cellules épithéliales sont sensibles au KGF car elles expriment les récepteurs spécifiques pour le KGF. De façon similaire, les NGFs sont sécrétés seulement par le stroma prostatique mais leurs récepteurs ne sont exprimés que par les cellules épithéliales. Cependant, jusqu'à présent, il a été impossible de déterminer si le NGF est régulé par les androgènes [199]. Très récemment, il a été démontré que le FGF-7, dont le récepteur est aussi exprimé dans le tissu prostatique, active la transcription de plusieurs gènes normalement sous contrôle dépendant des androgènes [206].

Il est important de souligner ici que les récents travaux de Mme Macintosh ont démontré que 33% de biopsies analysées, avec de lésions sur le chromosome 8p, comportaient aussi une perte d'hétérozygoté du tissu stromal adjacent. Ces données, conjuguées à l'intime relation établie entre les composantes épithéliale et fibromusculaire du tissu prostatique et les interactions paracrines de stimulation et d'inhibition de la croissance via les facteurs de croissance produits, suggèrent que toute altération du tissu stromal pourrait influencer la croissance de clones tumoraux initiés. Ces résultats convergent vers l'idée que les modes d'action paracrine des plus importants facteurs mitogéniques dans les tissus prostatiques normaux et hyperplasiques ainsi que dans les tumeurs primaires du cancer de la prostate, sont apparemment altérés et tendent à acquérir un mode de stimulation autocrine dans les tumeurs androgéno-indépendants [197]. Ainsi, les carcinomes prostatiques (donc d'origine épithéliale!) à un stade avancé sont capables par eux-mêmes de produire et d'être auto-stimulés par un grand nombre des facteurs mitogéniques (figure 3.2.1).

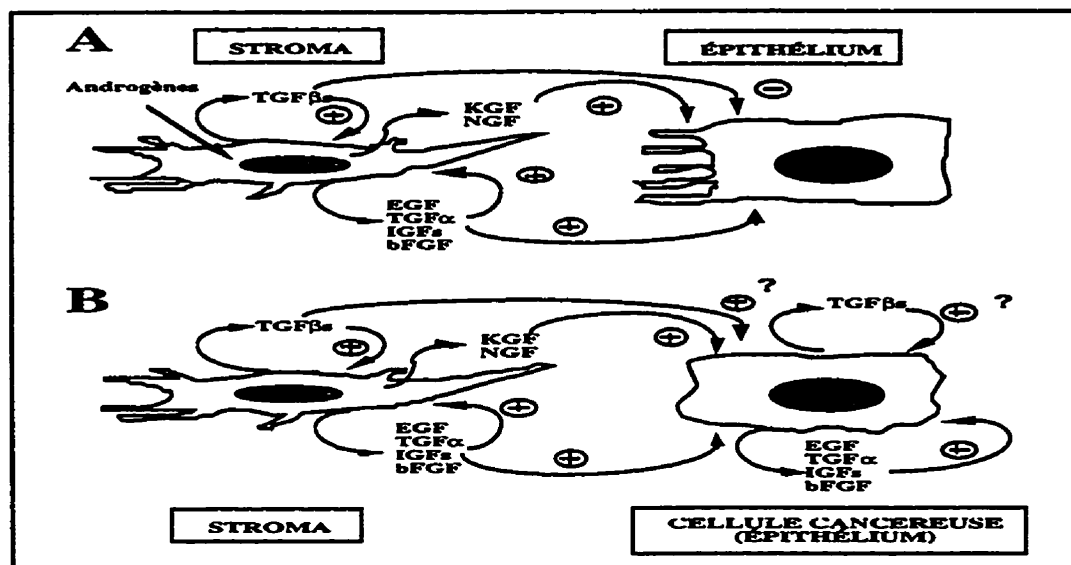


Figure 3.1 : Modèle hypothétique sur les interactions paracrines entre le stroma et les cellules épithéliales prostatiques. A) régulation par les facteurs de croissance dans la prostate normale, hyperplasique et pendant les stades précoces du cancer, et B) au cours des stades avancés du cancer de la prostate.

Les TGF β s, par contre, agissent avec une certaine dualité dans la régulation de la biologie prostatique: ils stimulent la prolifération de la majorité des cellules stromales mais inhibent la

croissance des cellules épithéliales en culture et agissent comme médiateurs dans l'apoptose induite par la privation des androgènes [197]. De plus, les carcinomes prostatiques à un stade avancé, dit hormono-indépendant, deviennent progressivement insensibles à l'effet inhibiteur des TGFβs, et semblent être stimulés par ces facteurs *in vivo* [207].

3.1.2 Modes de propagation des métastases osseuses du cancer prostatique

Depuis plusieurs années, on est arrivé à proposer trois théories qui tentent de retracer les voies empruntées par les cellules métastatiques pour atteindre les vertèbres [190]. La première propose que les cellules tumorales atteignent la colonne vertébrale après passage à travers les poumons via le système de la veine cave. La deuxième suppose que les cellules tumorales soient transférées vers les vertèbres à travers les canaux lymphatiques périneuraux, et la troisième suggère que le transport direct des cellules tumorales vers la colonne se fasse via des anastomoses hautement développées entre le plexus de la veine pelvienne et le système de la veine vertébrale. Cependant, la principale voie de dissémination du cancer de la prostate vers la colonne vertébrale, surtout les parties périphériques et centrales du corps vertébral, semble se faire via le système de la veine vertébrale [193,194]. Il est à noter que la nature d'origine sanguine des métastases osseuses est actuellement basée sur le fait que ni les canaux lymphatiques périneuraux ni les canaux lymphatiques de la moelle osseuse semblent être impliqués dans la dissémination des embolies tumorales vers les os [190]. Cependant, tel que mentionné plus loin, cet argument reste encore hypothétique car les cellules métastatiques peuvent se déplacer librement entre le système vasculaire et le système lymphatique qui sont interconnectés puisque le lymph se verse dans la circulation sanguine au niveau des veines près du cœur [33].

3.1.3 Développement des métastases du cancer de la prostate et réaction ostéoblastique

L'hypothèse de " *la sémence et le sol* " proposée par Paget semble s'appliquer conformément au développement des métastases ostéophiles, comme celles du cancer de la prostate et du sein, du fait que le tissu osseux constitue un microenvironnement favorable pour l'établissement et la prolifération de foyers métastatiques à cause de la présence de facteurs chimiotactiques [208,209] et de facteurs favorisant la promotion de l'adhérence à la MEO [210,211], la

migration et l'invasion en direction de l'os en formation [212], l'accélération de la prolifération des cellules métastatiques [208,213-218] ainsi que de l'angiogénèse tumorale [219-221] au site des métastases ostéoblastiques.

Ainsi, les cellules en circulation pourraient migrer à travers les vaisseaux sanguins en réponse à des stimuli chimiotactiques, tels que le IGF-I, le IGF-II, provenant de la MEO et libérés lors de la résorption osseuse locale [208], et au niveau du site de la métastase osseuse par les EGF [209]. La localisation au niveau du tissu osseux serait augmentée par l'adhésion des cellules métastatiques du cancer de la prostate à la MEO [210]. La stimulation de cette adhésion cellulaire, soit par les TGF β s sécrétés par les cellules métastatiques ou bien par l'effet synergique de l'expression de TGF β s et du collagène de type I par les cellules osseuses, serait effectuée par l'interaction entre la MEO et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, un récepteur d'adhérence au collagène de type I exprimé à la surface des cellules métastatiques [211]. Les facteurs déposés dans l'os semblent être aussi de puissants facteurs capables d'induire la migration des cellules tumorales en direction de surfaces osseuses en remodelage [87]. Cette invasion serait facilitée par une activité protéolytique effectuée en partie suite à une production des metalloprotéases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9) par les cellules métastatiques, et cela de façon plus efficace en présence de facteurs provenant du milieu conditionné (MC) des ostéoblastes en phase de formation du nodule osseux et de pré-minéralisation [212]. Dans les surfaces osseuses en remodelage, les facteurs libérés peuvent alors faciliter la croissance de cellules tumorales ostéophiles [208,213,214].

Cependant, les OBs ne sont pas la seule source en facteurs mitogéniques pour les cellules métastatiques du cancer de la prostate. Ainsi, Bruce Zetter et ses collègues ont proposé que les cellules métastatiques du cancer de la prostate voyagent à travers la colonne dorsale via les vaisseaux sanguins paravertébraux, puis traversent l'endothélium sinusoidal et atteignent la moelle osseuse où elles seraient stimulées par la transferrine et autres facteurs de croissance non identifiés [215-217]. Ceci pourrait expliquer pourquoi les carcinomes prostatiques atteignent préférentiellement la moelle osseuse, particulièrement les os de la colonne vertébrale, où l'on observe une croissance beaucoup plus rapide que le carcinome prostatique *in situ* [217]. Par ailleurs, Lang [218] a déterminé que quelques facteurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse stimulent trois différents types de cellules du cancer de la prostate: les cellules androgéno-indépendantes PC-3 et DU-145 ont été stimulées *in vitro* par de concentrations de rGM-CSF (recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) et de rEPO (recombinant erythropoietin) à l'intérieur du rang de concentrations sécrétées par les cellules

osseuse *in vivo*; tandis que les cellules androgéno-positives LNCaP ne sont stimulées que par le rGM-CSF mais à de doses beaucoup plus élevées [218]; par contre, les facteurs rG-CSF (recombinant granulocyte colony-stimulating factor) et rIL-3 (recombinant interleukin-3) n'ont pas d'effet significatif sur la croissance des trois lignées cellulaires. Par ailleurs, Gleave et ses collègues [219] ont clairement démontré, autant *in vivo* que *in vitro*, l'existence d'une voie paracrine bidirectionnelle entre les cellules du cancer de la prostate et le stroma osseux. Ainsi tout comme lors de son développement au niveau de la tumeur prostatique primaire (section 3.2.3), les interactions épithélium-stroma semblent jouer un rôle important dans la progression de métastases en produisant un microenvironnement favorable pour la tumorigénèse à cause d'une stimulation réciproque de l'adhérence et de la prolifération, et dans une certaine mesure de l'angiogénèse tumorale via la production de FGF-2 et VEGF [220,221].

Mais, comment le développement de métastases du cancer de la prostate aboutit-il à l'observation clinique d'une réaction ostéoblastique? Comment ces cellules cancéreuses réussissent-elles à débalancer l'équilibre en favorisant la formation d'une nouvelle masse osseuse, dit en cicatrisation (woven bone)? À partir de données concernant la biologie de cellules métastatiques du cancer de la prostate et la régulation du remodelage osseux, les hypothèses de travail d'un grand nombre de chercheurs, incluant notre groupe, ont été basées sur la recherche de facteurs dérivés des cellules métastatiques ostéophiles et qui agiraient sur l'activité des OBs afin de produire une réaction osseuse lytique ou blastique.

Les travaux réalisés à partir des années 1980, d'abord par Jacobs et ensuite par le Dr Koutsilieris, ont démontré que les tissus prostatiques et les lignées du cancer de la prostate sécrètent des agents mitogéniques qui stimulent sélectivement les ostéoblastes et les fibroblastes de rat [222-224]. Perkel et ses collègues [225] ont démontré que le milieu conditionné par les cellules du cancer de la prostate PC-3 (PC-3 CM) contient plusieurs facteurs de croissance connus, tels que les IGFs, les TGFβs et les FGFs, tout comme un agent mitogénique inconnu et différent des autres facteurs solubles testés; les effets de tous ces facteurs étaient toutefois hautement spécifiques pour les ostéoblastes et les fibroblastes humains [225]. Au début des années 1990, le Dr Rabbani avait démontré que les cellules PC-3 sécrètent un fragment aminoterminal de l'uPA, nommé GFD pour *Growth Factor Domain*, qui stimule la prolifération des cellules ostéoblastoïdes humaines SaOS-2 et des ostéoblastes primaires de rat (modèle des ostéoblastes fœtaux de rat) [226]. Plus tard, les travaux de Killian et ses collègues [227] ont mis en évidence l'effet mitogénique du PSA (prostatic-specific antigen) sur les ostéoblastes (humains et de rat) et les fibroblastes (de souris); l'effet de stimulation exercé sur ces cellules

serait effectué *in vitro* en partie via l'activation de la forme latente de TGF β 2 (présent dans le PC-3 CM) et aussi, en partie, par la capacité du PSA à stimuler le détachement des OBs via une modulation protéolytique de récepteurs d'adhésion cellulaire effectuée probablement par le système uPA/plasmine [227].

Par ailleurs, le modèle cellulaire *in vitro* développé à partir des OBs fœtaux de rat (extrait de l'os calvaria) a permis d'étudier la séquence temporelle complète des événements conduisant à la différenciation des OBs *in vivo* : prolifération et établissement/maturation/minéralisation de la MEO [228]. Ce modèle expérimental avait été utilisé par le groupe du Dr Goltzman [226], permettant de proposer que le GFD de l'uPA, nommé ATF pour *Amino-Terminal Factor*, serait directement responsable du développement des métastases ostéoblastiques du cancer de la prostate [226,229]. Dans ce sens, tous les autres facteurs dérivés de tumeurs prostatiques et mitogéniques pour les OBs seraient aussi impliqués. Cependant, tel que suggéré plus haut, un effet de prolifération n'est pas suffisant pour induire les OBs à se différencier et compléter les dernières phases de l'activité ostéoblastique, soit la maturation, l'organisation et la minéralisation de la MEO. Par ailleurs, le groupe des Drs Santibanez et Martinez a déterminé que les OBs fœtaux de rat sont, comme prévu, stimulés par les facteurs solubles présents dans le PC-3 CM [226,227]; toutefois, ces facteurs inhibent en même temps l'activité de la phosphatase alcaline (un marqueur de différenciation précoce) et le processus de minéralisation par les OBs, mesuré selon l'accumulation de calcium (un marqueur de différenciation tardif) [230]. De plus, le PC-3 CM inhibe la synthèse de collagène (type I) et stimule la production des collagénases interstitielles spécifiques aux OBs [231]. Ces résultats indiquent que les facteurs sécrétés par les cellules du cancer de la prostate, autres que le ATF, stimulent *in vitro* la prolifération des ostéoblastes tout en bloquant leur processus de différenciation [230,231].

Les travaux du Dr Kimura, au Japon, pourraient aider à nuancer ces résultats expérimentaux [232]. En utilisant la lignée ostéoblastique humaine Tak-10, le Dr Kimura a d'abord démontré que le PC-3 CM, à une concentration de l'ordre de 25%, et sous conditions mitogéniques restreintes, est capable d'induire une stimulation de l'activité de calcification des cellules Tak-10; cet effet est encore plus évident en ajoutant de l' α -glycérophosphate, le substrat spécifique de la phosphatase acide prostatique (PAP), présente dans le PC-3 CM [232]. Ces résultats illustrent en fait la difficulté de bien établir la fonction de régulateurs de la biologie osseuse étudiés *in vitro*, où leur action dépend de la variabilité des modèles cellulaires, de la densité des cellules en culture, de la durée du traitement, des conditions de culture, des niveaux de base de paramètres qui sont mesurés et surtout, du stade de différenciation des cellules à

l'étude [43,44]. Plus récemment, le groupe du Dr Festuccia [233] a étudié l'activité biologique de divers CM (surnageants) préparés à partir de tissus extraits de patients atteints de BPH et de cancer de la prostate aux stades B (tumeur confinée dans la capsule prostatique), aux stades C (invasion tumorale locale) et aux stades D (tumeur invasive avec des métastases distantes), sur des ostéoblastes normaux (lapin et rat) et une lignée d'ostéoblaste humain transformée (MG-63). Ils ont établi que ces différents CM stimulent la prolifération de toutes ces lignées ostéoblastiques ainsi que l'activité de la PAP, un marqueur de différenciation des OBs [230,231]; de plus, ils ont démontré que l'effet de ces CM était en corrélation avec la présence de uPA dont la concentration augmente selon le stade de la maladie. Cependant, ils suggèrent que d'autres facteurs présents dans les CM seraient aussi responsables de la prolifération et la différenciation des OBs [233].

3.1.4 *Rôle de la MEO et des protéases dans le développement des métastases du cancer de la prostate et la réaction ostéoblastique*

Tel que souligné plus haut, les TGF β s et les IGFs constituent les plus importants régulateurs du remodelage osseux parmi plusieurs facteurs locaux. Les IGFs sont sécrétés par les OBs et emmagasinés dans la MEO en liaison avec les IGFBPs, lesquelles peuvent soit limiter, soit augmenter les effets des IGFs. Les TGF β s sont produits localement par les OBs et les OCs et sont sécrétés et emmagasinés dans l'os sous une forme inactive en liaison avec la protéine de latence LTBP. Rappelons aussi qu'au niveau du remodelage osseux, le système PA/plasmine semble jouer un rôle central soit par une activation de pro-collagénases, soit par une activation de la forme latente de facteurs de croissance, surtout les TGF β et les IGFs, ou encore, par un effet mitogénique de l'uPA, ou plus précisément par le ATF de l'uPA.

Dans ce contexte, nous avons démontré qu'une surproduction de l'uPA par les tumeurs prostatiques et les cellules métastatiques du cancer de la prostate serait à l'origine de la dérégulation du mécanisme de remodelage osseux et conduire à la réaction ostéoblastique souvent observée en clinique et expérimentalement [233,234] (figure 3.3). Il est bien établi maintenant que l'uPA, hautement sécrété par les cellules métastatiques du cancer de la prostate et du sein, est associé au comportement biologique plus agressif dans les processus d'invasion tumorale et de dissémination métastatique [234]. Au niveau du site de la métastase, la localisation anatomique des cellules du cancer de la prostate, tout près des ostéoblastes, permettrait alors à l'uPA sécrété, de conduire à une dérégulation dans la formation de la MEO

via une hydrolyse des protéines de liaison aux IGF [136] et par une activation de la forme latente de TGF β [151]. La grande biodisponibilité de ces facteurs ostéoblastiques actifs permettrait alors d'accélérer la croissance des cellules cancéreuses de la prostate. Subséquemment, ces facteurs agiraient en tant que modulateurs de la réaction ostéoblastique de façon continue, soit en agissant directement sur les OBs et les OCs, ou comme le TGF β qui à son tour pourrait activer les IGFs [134,136] et diminuer l'activité du système PA/plasmine en induisant la production de PAI-1 [151]. La kallibréine glandulaire humaine hK2, sécrétée par les carcinomes prostatiques pourrait aussi favoriser l'invasion, la dissémination métastatique, et subséquemment, la réaction ostéoblastique. Très récemment, il a été démontré que la hK2 est capable de déclencher une cascade protéolytique conduisant successivement à l'activation de l'urokinase simple chaîne et du plasminogène [235]. De plus, la hK2 s'est avérée 100 fois plus efficace que la hK3 (ou PSA) à hydrolyser les IGFBP-2 et -3, qui sont sécrétés par les carcinomes prostatiques afin de moduler l'activité des IGFs produits et sécrétés par ces dernières.

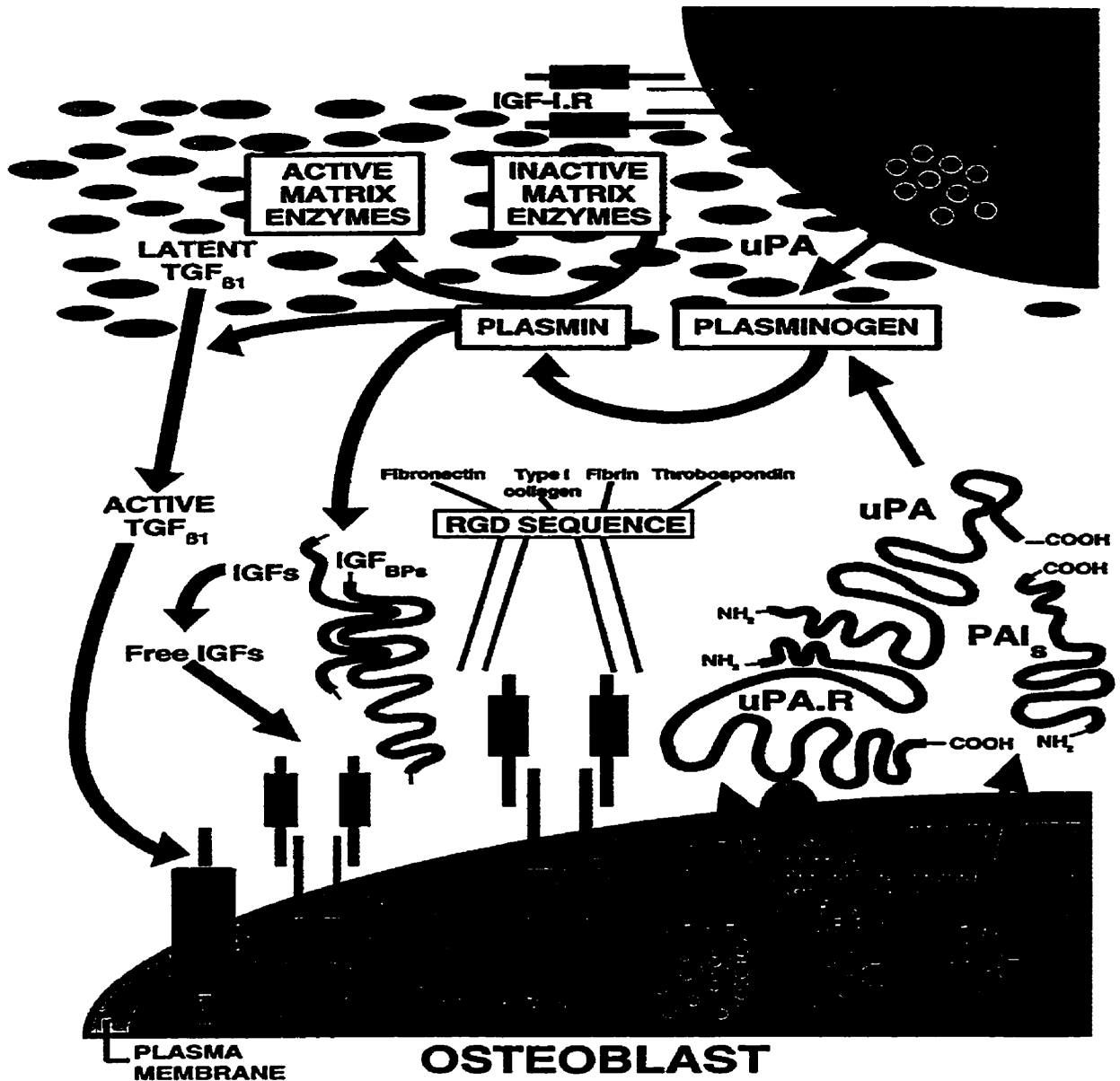


Figure 3.2 : Interactions paracrines entre les ostéoblastes et les cellules métastatiques du cancer de la prostate au niveau des métastases osseuses. La surproduction de la protéase uPA par les cellules métastatiques du cancer de la prostate transforme le plasminogène en plasmine, qui à son tour active les collagénases matricielles et les formes inactives ou latentes des IGFs et des TGF β s. La dégradation de la matrice extracellulaire libère un grand nombre de facteurs qui y sont séquestrés. La grande biodisponibilité de ces facteurs, une fois activés, contribue, d'une part, à la prolifération de clones tumoraux et, d'autre part, à la stimulation des ostéoblastes. Le cercle vicieux engendré par ces interactions positives conduit à la formation de nouvelles masses osseuses, correspondant à la réaction ostéoblastique observée en clinique. Le tissu osseux constitue alors un écran de protection à travers lequel la cellule métastatique du cancer de la prostate survie et prolifère.

3.2 Les métastases ostéolytiques : le modèle du cancer du sein

Les métastases osseuses du cancer du sein sont principalement de type ostéolytique, quelquefois mixte mais très rarement ostéoblastique [191,236]. Les lésions lytiques pures déterminées par radiographie ont parfois démontré une composante blastique suite à une évaluation histologique ou par scanographie. La lésion lytique est représentée par une surface de décalcification et une perte de l'os cortical, mais peut à l'occasion afficher une ostéopénie diffuse. L'os trabéculaire, le site le plus actif lors du remodelage osseux, constitue la cible préférentielle de cellules métastatiques du cancer du sein [237]. Les métastases du cancer du sein se développent le plus souvent au niveau du squelette axial, surtout au bassin, à la colonne vertébrale et aux côtes. De plus, bien que le crâne et les régions proximales du fémur et de l'humérus soient parfois atteintes, les sites osseux les plus distants sont rarement métastasiés [237].

3.2.1 *Le cancer du sein: origines, développement et progression*

Le cancer du sein est une maladie hétérogène. Cette grande diversité est exemplifiée par les nombreuses classifications histologiques [238] et l'expression d'une grande variété des marqueurs caractéristiques incluant les récepteurs d'hormones stéroïdes, des oncogènes, de facteurs de croissance et de récepteurs de facteurs de croissance [239]. De plus, les clones cellulaires isolés à partir des tumeurs mammaires affichent une certaine hétérogénéité au niveau du caryotype [240], de la sécrétion d'enzymes protéolytiques [241], des récepteurs stéroïdiens [242,243], de la sensibilité à la thérapie et au niveau du potentiel invasif et métastatique [244].

Le cancer du sein existe sous deux formes : 90% de cas sont sporadiques, sans cause décelable, 10% environ sont familiaux. Des analyses cytogénétiques et moléculaires de carcinomes sporadiques primaires ont démontré que la perte d'hétérozygoté (LOH, pour *loss of heterozygosity*) affecte un minimum de 12 bras de chromosomes différents. Certaines de ces altérations mettent en cause de suppresseurs de tumeurs. Très récemment, Callahan a déterminé que la région 17q21 comporte deux gènes cibles pour la LOH, soit les gènes désignés NOTCH4/INT3 et INT6 [245]. L'interruption du gène NOTCH4/INT3 semble jouer un rôle néfaste dans le développement normal de la glande mammaire et favoriser la tumorigenèse. Le rôle du gène INT6 n'est pas encore bien établi mais sa séquence correspondrait à un gène enregistré dans GenBank et qui a été hautement conservé au cours de l'évolution. D'autres études démontrent que 41% de cancers invasifs du sein comportent une LOH dans la région

10q23 tout près de la région D10S215 [246]. Un possible suppresseur de tumeurs a été identifié entre la région D10S215 et la région télomérique adjacente D10S541. Certaines tumeurs du cancer du sein, de la prostate et de glioblastomes comportent de mutations dans cette région. La maladie de Cowden, qui comporte de mutations dans la même région (le gène PTEN/MMAC1), est un facteur de prédisposition au cancer du sein et de la glande thyroïde [246]. Dans les cas de cancers héréditaires, les gènes associés à un haut risque de développer le cancer du sein incluent BRCA1, BRCA2, p53 et le gène de la maladie de Cowden PTEN/MMAC1 [247]. Aujourd'hui, on estime qu'une femme présentant une histoire familiale de cancer du sein et de l'ovaire et une mutation dans l'un ou l'autre des gènes BRCA a 50% de risques de développer un cancer du sein seul, et 16% de risques de développer un cancer de l'ovaire [248]. Le risque associé à une mutation dans BRCA1 est plus important (50%) que celui associé à une mutation dans BRCA2 (35%); par contre, une mutation de BRCA1 induirait un cancer du sein et/ou un cancer de l'ovaire, tandis qu'une mutation dans BRCA2 serait plutôt responsable d'un cancer du sein seul.

Comme pour le cancer de la prostate, la progression dans chacune des étapes du processus invasif et métastatique de tumeurs mammaires semble se faire à partir de changements génétiques cumulatifs qui conduisent ainsi à la grande hétérogénéité que caractérise les tumeurs du cancer du sein [249]. Le phénotype " avancé " des cellules du cancer du sein se caractérise par une perte de la dépendance aux hormones, par une acquisition de la résistance aux thérapies systémiques et une augmentation du potentiel métastatique. Les facteurs responsables de cette progression phénotypique sont variés et complexes. À l'origine, deux catégories de gènes sont impliqués : les protooncogènes et les suppresseurs de tumeurs. Le génome de certaines tumeurs mammaires présente une fréquence très élevée de mutations spontanées. La mutation de gènes impliqués dans les processus normaux de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire contribue à l'initiation et/ou la progression de tumeurs. Les gènes BRCA, par exemple sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, via p53 et p21 [250], et probablement dans la réparation de l'ADN [251]. Il a été démontré que les mutations sur le gène p53 sont plus fréquentes lorsque des tumeurs du cancer du sein portent de mutations dans le gène BRCA2 [240]. De plus, lorsque les tumeurs portent des mutations dans les deux gènes, on retrouve un plus grand nombre d'anomalies chromosomiques multiples. Ces résultats suggèrent, d'une part, que les mutations du gène p53 constituent une étape nécessaire dans la cancérogenèse véhiculée par les gènes BRCA, et d'autre part, que l'instabilité génétique engendrée par ces gènes mutés contribuerait à la progression de la maladie.

Toutefois ces nombreuses mutations n'expliquent pas à elles seules la grande hétérogénéité des tumeurs mammaires. Des perturbations spécifiques de régulation génétique aux niveaux transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel pourraient altérer aussi de façon significative le phénotype. De plus, il est connu que les interactions entre la tumeur et les cellules hôtes du système immunitaire, du stroma et de l'endothélium, entre autres, vont imposer de pression de sélection sur la sous-population émergente, ce qui va résulter à une éventuelle dominance de cellules les mieux adaptées aux changements de l'environnement. Par ailleurs, tel que proposé par Cunha [200] et Ronnov-Jessen [252], les interactions épithélium-stroma semblent être de facteurs déterminants dans la croissance et le développement de l'épithélium mammaire et de la transformation de ces cellules épithéliales vers un stade de malignité. Ainsi, plusieurs facteurs de croissance sont supposés être impliqués dans la régulation des interactions paracrines entre les cellules tumorales et le stroma, et éventuellement dans la progression tumorale [200,252].

Il est bien établi maintenant que la croissance de carcinomes mammaires est régulée par les récepteurs de facteurs de croissance, tels que le EGF.R et le récepteur de l'oncogène Her-2/neu [253]. L'invasion et le processus métastatique impliquent l'activation d'enzymes capables de dégrader les barrières naturelles qui limitent la propagation de cellules métastatiques. Des résultats *in vitro* ont démontré que le EGF et l'amphiréguline (un autre membre de la famille EGF) peuvent moduler l'invasion de cellules métastatiques du cancer du sein par une augmentation de l'expression de la MMP(matrix metalloproteinases)-9 [254]. Deux travaux récents ont démontré que le factor TGF β 1 peut promouvoir l'invasion et l'activité métastatique du cancer du sein soit par une augmentation de l'activité protéolytique de l'urokinase, tel que démontré dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231/ER- [255], ou bien par une augmentation de la production de l'uPA par les macrophages associés aux tissus mammaires de patientes atteintes du cancer du sein [256].

L'invasion locale est favorisée aussi par les interactions avec le stroma qui sont effectuées en partie via les molécules d'adhésion cellulaire, les intégrines [17,29]. Par ailleurs, les intégrines jouent un rôle essentiel autant pour l'invasion locale que pour l'angiogénèse tumorale, la dissémination hématogène et le développement des métastases ostéolytiques du cancer du sein [257,258]. Il est bien connu que plusieurs cellules du cancer du sein expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui se lie à l'ostéopontine, une protéine matricielle du tissu osseux. Cependant, il a été démontré que les cellules métastatiques MDA-MB-231 qui expriment de hauts niveaux d'expression de ce récepteur se sont avérées moins capables de produire des métastases

osseuses, dans un modèle de métastase osseuse chez la souris, que la population de cellules exprimant de faibles niveaux en $\alpha_v\beta_3$ [259].

3.2.2 *Modes de propagation des métastases du cancer du sein*

Les tumeurs mammaires peuvent s'étaler par extension locale, par envahissement lymphatique et par voie sanguine [238]. L'extension locale se fait le long des canaux galactophores vers le mamelon ou dans le reste du parenchyme; vers la surface cutanée, ou en profondeur vers la paroi musculaire, puis le long des espaces musculoaponévrotiques. Dans plus de 60% des cancers mammaires, il se produit un envahissement lymphatique [238]. Tout dépendant de la localisation de la tumeur, l'extension peut atteindre soit les ganglions axillaires ou bien les ganglions mammaires internes. Par voie sanguine, le cancer mammaire peut métastasier à distance, surtout au niveau des os, du poumon et du foie.

L'extension au système lymphatique, qui conduit par la suite au système osseux, peut faire appel à deux mécanismes séparés, associés ou prédominants selon le cas [260]: le système fasciculé d'Hanley et le système tronculaire (troncs lymphatiques principaux) de Carnett et Howell. Le système fasciculé d'Hanley fait intervenir le système lymphatique des aponévroses qui enveloppent et cloisonnent les muscles et les tendons musculaires, à partir d'où les cellules cancéreuses mammaires atteignent les insertions au squelette. D'après les observations de Carnett et Howell [260], il existe des chapelets ganglionnaires, latéro-vertébraux, le long de la colonne vertébrale, à partir d'où le corps vertébral serait envahi en sa partie antéro-vertébrale; puis, en descendant le long des ganglions latéro-vertébraux, la progression cancéreuse atteindrait les ganglions pré-vertébraux lombaires, puis enfin, les troncs lymphatiques accompagnant les vaisseaux iliaques et fémoraux pour se rendre aux territoires inguinaux et au triangle de Scapa, ensemençant en route les vaisseaux nourriciers intra-osseux allant à l'os iliaque et au fémur. Plus récemment, Yoneda [261] a démontré que la dissémination des cellules du cancer du sein dans l'os est dépendante de la microvasculature artérielle intra-osseuse, suggérant que les facteurs hémodynamiques sont aussi un facteur critique agissant sur la modulation de la colonisation de métastases mammaires au niveau du tissu osseux.

3.2.3 *Développement des métastases osseuses du cancer du sein et réaction ostéolytique*

Il a été établi que le cancer du sein métastase au niveau des os plus fréquemment qu'à d'autres organes et que plus de 80% de patientes à un stade avancé de la maladie développent de métastases osseuses accompagnées par une destruction de l'os [191,236,262]. Le siège principale de ces métastases est la moelle osseuse de l'os trabéculaire [258,261]. La propension des métastases mammaires à siéger dans la moelle osseuse semble être due à de simples raisons d'anatomie et d'apport sanguin [261], à la présence de sinusoides vasculaires composés par des cellules endothéliales sans membrane basale [263] et à une spécificité d'adhérence aux cellules endothéliales de la moelle osseuse [37]. Par ailleurs, Brooks [264] a démontré, *in vitro*, que les cellules épithéliales mammaires dérivées de tumeurs malignes adhèrent de préférence aux cellules stromales de la moelle osseuse qu'aux cellules du stroma mammaire.

Ainsi, comme les cellules métastatiques du cancer de la prostate, les cellules métastatiques mammaires ont des propriétés intrinsèques qui vont permettre ou faciliter l'invasion locale, la dissémination à distance et le développement des métastases, surtout osseuses [258,265]; ces propriétés impliquent que les cellules du cancer du sein soient capables de: 1) produire de protéases nécessaires pour le détachement du site primaire, pour l'invasion locale, pour rentrer et sortir des vaisseaux de transport, et enfin, pour dégrader la MEO; 2) arrêter d'exprimer, à leur surface, les molécules d'adhésion cellulaire afin de se détacher du site primaire et de les réexprimer pour s'arrêter au site à métastasier; 3) posséder une activité de migration à travers la circulation; et 4) pouvoir s'échapper à la surveillance du système immunitaire et survivre. Ainsi, les cellules cancéreuses en circulation seront transportées vers les régions vasculaires de la moelle osseuse en traversant l'endothélium sinusoidal. Une fois dans la moelle osseuse trabéculaire, ces micro-foyers peuvent alors être attirés vers les surfaces osseuses par l'action des agents chimiotactique libérés de la MEO au cours de la résorption ostéoclastique normale [208,209,258].

Il est important de noter que l'os constitue un environnement fertile pour le développement de foyers métastatiques. En effet, la MEO emprisonne un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines, principalement de facteurs IGFs et TGFβs, mais aussi du PDGF, des FGFs, des BMPs (*bone morphogenic proteins*) et de l'activine [258]. Rappelons que la structure interne de l'os, soit la moelle osseuse, est composé de plusieurs types de cellules qui sécrètent aussi une grande variété de cytokines et de facteurs de croissance. Tout comme les

cellules immunes, les cellules stromales de la moelle osseuse sont une source importante en cytokines, notamment en G-CSF, en GM-CSF, en IL-1 β , en IL-6, IL-8, en LIF et TNF α [266]. Dans ce contexte, les cellules du cancer du sein vont d'abord être exposées à la stimulation de cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les cellules stromales et les cellules immunes de la moelle osseuse, et éventuellement, par les facteurs produits par les cellules osseuses et par les facteurs libérés de la MEO durant le remodelage osseux normal et pathologique.

L'ostéolyse pathologique observée chez les patientes atteintes des métastases osseuses du cancer du sein semble être effectuée soit directement par les cellules tumorales elles-mêmes [262], soit par les macrophages activés par la tumeur [267,268], ou bien par les OCs activés par des facteurs sécrétés par la tumeur [269], ou encore, par les OCs activés par des facteurs sécrétés par les ostéoblastes, suite à une stimulation de certains facteurs solubles d'origine tumorale [270]. Le mécanisme impliquant directement les OCs semble être le plus concordant avec les données cliniques et par conséquent, le plus largement étudié [209,259,265,269-273]. Ces auteurs proposent que la destruction de l'os se fait directement par les OCs lorsqu'ils sont activés, surtout par des agents sécrétés par les cellules tumorales.

Les travaux du Dr Orr, à Hamilton, ont été effectués en produisant de métastases ostéolytiques chez la souris, en leur injectant les cellules monocytoïdes Walker 256 [209,214]. Ses résultats ont démontré que le développement des métastases ostéolytiques, *in vivo*, est influencé par le taux de remodelage osseux et que l'activité de résorption osseuse est associée avec une promotion sélective de la croissance des cellules tumorales [209]. Les résultats, *in vitro*, ont établi que les facteurs ostéorésorbants, tels que les TGF β s, présents dans le CM des os foetaux (de rat) en résorption, stimulent la migration dirigée des cellules cancéreuses. De plus, les cellules tumorales seraient elles-mêmes responsables de la génération de médiateurs solubles de résorption en augmentant la production de ces médiateurs par les cellules du tissu osseux en résorption [209,214]. Ces mêmes conclusions ont été obtenues par le Dr Yoneda [258], en produisant des métastases ostéolytiques chez la souris "nude" avec une lignée humaine du cancer du sein, les cellules MDA-MB-231. Ces expériences ont consisté à inhiber l'ostéolyse effectuée par les OCs en traitant les souris avec du risédronate, un biphosphonate de la famille du paminodrate reconnu pour son efficacité en clinique [269]. Les résultats ont démontré que la diminution du taux de destruction de l'os par les OCs, limite significativement le développement, la progression et le regroupement des cellules métastatiques du cancer du sein dans l'os. En d'autres mots, Orr et Yoneda ont démontré que le processus de destruction de l'os est lui-même responsable du développement de métastases ostéolytiques, et peut en même

temps, augmenter la production, par les cellules métastatiques, des médiateurs qui détruisent l'os.

Par ailleurs, des expériences similaires ont été effectuées par Morinaga et ses collègues [270], en utilisant les lignées mammaires H-31 et MDA-MB-231 et une lignée dérivée d'un mélanome humain, les cellules A375M. Les travaux réalisés, *in vitro*, suggèrent que la production en IL-11 par les ostéoblastes serait indirectement responsable de l'activité ostéoclastique induite par la présence des métastases produites par les cellules MDA-MB-231 et A375M *in vivo* [270]. Les auteurs ont identifié le TGF β comme médiateur potentiel de la stimulation de la production en IL-11 par les OBs. Il s'agirait en fait du TGF β produit par les cellules osseuses, sous forme latente, mais activé par les cellules tumorales. Le mécanisme d'activation du TGF β , dans ces conditions, est encore inconnu car l'activité des protéases uPA, tPA et des cathepsines n'ont pas été détectées dans le milieu expérimental.

Des études *in vitro* ont déterminé que les cellules cancéreuses, particulièrement celles du cancer du sein, peuvent stimuler les OCs en produisant une grande variété de facteurs ostéoclastiques [209,214,266,271,274]. Ces facteurs incluent les prostaglandines, la procathepsine D, les TGFs, le PTHrP (un peptide dérivé du PTH avec les mêmes fonctions; *PTH-related peptide*), et de cytokines telles que le TNF, le IL-6 et le IL-1, produits par les cellules tumorales, les ostéoblastes ou par les cellules stromales ou immunes. Les cellules métastatiques du cancer du sein peuvent donc avoir la capacité soit d'induire la différenciation ostéoclastique à partir de souches hématopoïétiques, soit d'activer les OCs matures déjà présents dans les surfaces en remodelage, ou bien les deux, à travers le relâchement de facteurs solubles ou encore, par contact cellule-cellule [258].

Les études du Dre Guise [272,273], avec le modèle expérimental déjà utilisé par Yoneda [259] et Mundy [265], jumelées aux observations cliniques de Powell [275] et Bundred [276] suggèrent fortement que le PTHrP constitue l'un des médiateurs les plus importants de la résorption ostéoclastique observée dans les métastases du cancer mammaire. En effet, Powell avait observé que la production en PTHrP par les métastases osseuses du cancer du sein est plus élevée que dans les tumeurs primaires, tandis que les observations cliniques de Bundred suggèrent une association entre l'expression en PTHrP par les tumeurs primaires du cancer du sein et le développement de métastases osseuses. À partir de ces observations, les travaux de Mme Guise ont souligné l'impact du blocage des effets du PTHrP sur le développement des métastases ostéolytiques [272]. Les résultats obtenus ont démontré que les cellules MDA-MB-

231 produisent de métastases ostéolytiques évidentes au niveau du fémur distal, du tibia proximal et du fibula chez la souris. L'utilisation d'un anticorps spécifique contre le PTHrP a permis d'inhiber significativement l'ostéolyse locale, induite par les cellules métastatiques MDA-MB-231, ainsi que le taux de progression de ces tumeurs dans l'os.

Une étude plus récente du Dre Guise a porté sur les effets du dexaméthasone (un glucocorticoïde synthétique) sur la production de PTHrP ainsi que sur le développement et la progression des métastases osseuses produites par les cellules MDA-MB -231 chez la souris [273]. Il a été déterminé que le dexaméthasone diminue significativement l'expression de l'ARNm du PTHrP et la production de la protéine. L'analyse des images radiographiques assistée par ordinateur a démontré que le dexaméthasone produit une diminution du nombre et de la taille de métastases osseuses et de la production en PTHrP au niveau des fémurs avec des lésions ostéolytiques chez le rat. L'ensemble de ces observations suggère que le tissu osseux ne constitue pas seulement un endroit fertile pour le développement de foyers tumoraux mammaires, mais augmente, en réponse à la présence de ces foyers métastatiques, l'activité ostéoclastique en induisant lui-même la production en PTHrP. Par ailleurs, il a été établi que le TGF β peut altérer le comportement de plusieurs cellules tumorales, particulièrement les carcinomes mammaires, en augmentant la production en PTHrP [277,278] et en IL-11 par les OBs [270]. Ainsi, Yin et ses collègues [279] ont procédé à la transfection des cellules MDA-MB-231 avec le gène dominant négatif du récepteur du TGF β (sans domaine cytoplasmique) afin de rendre ces cellules insensibles à l'effet des TGF β s. Yin a ainsi démontré que la production en PTHrP n'est pas augmentée dans le micro-environnement osseux envahi par les métastases originant de cellules MDA-MB-231, et qu'en même temps, le nombre de lésions ostéolytiques diminue de façon significative.

Quoique le PTHrP et le TGF β semblent jouer un rôle prépondérant dans la pathologie osseuse, en regard de métastases ostéolytiques, il faut souligner qu'il existe d'autres médiateurs potentiels tout aussi importants [209,214,266,270,271,274]. Ces médiateurs, produits par les cellules tumorales, les ostéoblastes, les cellules stromales ou les cellules immunes hôtes, incluent le TGF α , le IL-1 α , le TNF, et en particulier le IL-6 dont l'activité augmente de façon très significative l'activité ostéoclastique induite par le PTHrP, autant *in vivo* que *in vitro* [169]. Il faut tenir compte aussi que les facteurs de croissance dérivés des OBs, tels que les IGFs et les TGF β s sont en très grande concentration et à proximité des cellules tumorales dans l'os en résorption. Par ailleurs, rappelons que le TGF β augmente l'expression de PTHrP par les cellules du cancer du sein et l'interleukine IL-11 par les OBs. De plus les IGFs stimulent la prolifération

de cellules métastatiques du cancer mammaire [280]. Ainsi, une fois que les cellules métastatiques du cancer du sein stimulent la résorption osseuse ostéoclastique, les OCs peuvent initier un cercle vicieux dans lequel les facteurs de croissance, libérés à partir de la MEO, vont augmenter la croissance de cellules tumorales et la production de PTHrP. Ceci conduira fatalement à une résorption osseuse locale plus agressive et à produire un environnement beaucoup plus favorable pour la croissance tumorale, et subséquemment à une plus grande destruction du tissu osseux.

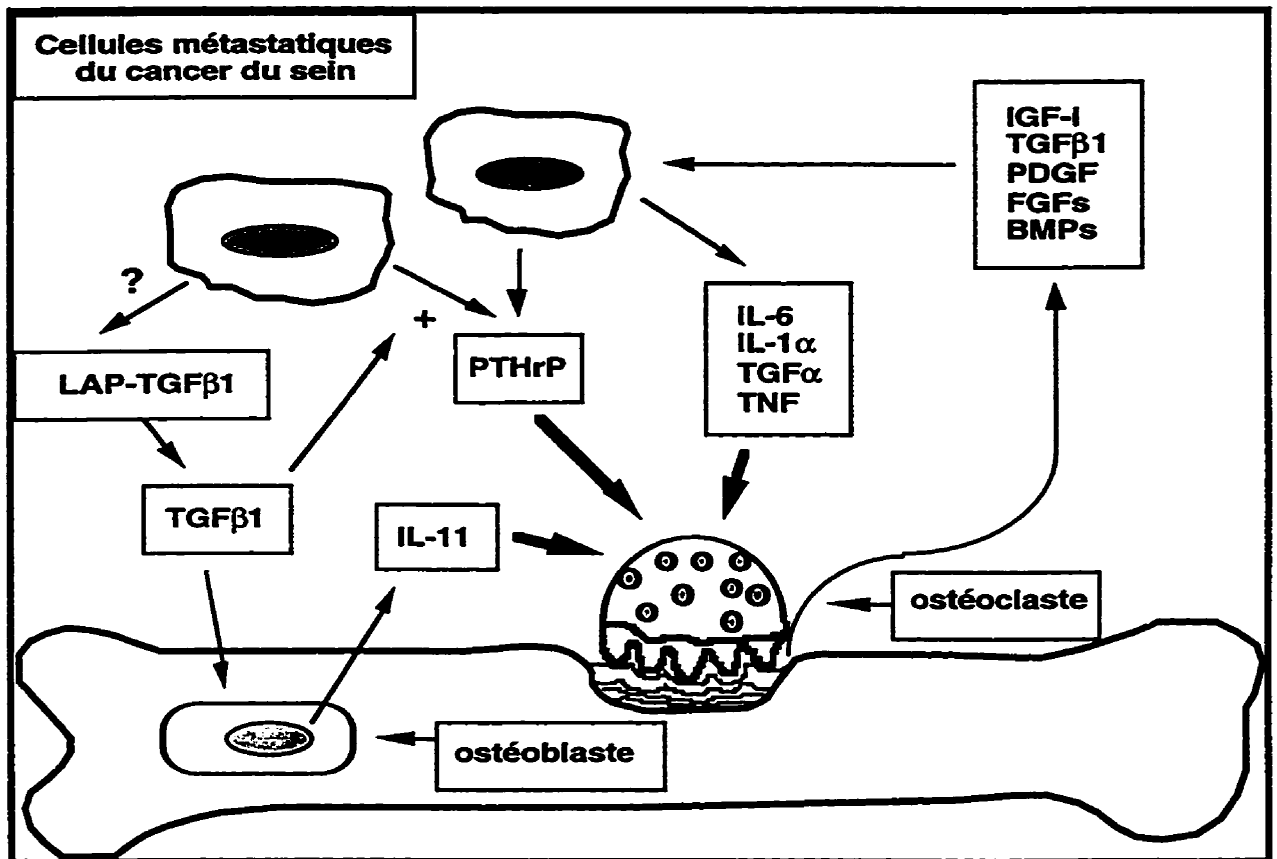


Figure 3.3 : Développement des métastases du cancer du sein dans l'os et réaction ostéolytique. Les cellules métastatiques du cancer du sein métastasent de préférence au niveau de l'os trabéculaire, le site le plus actif du tissu osseux. Les cellules tumorales sont représentées à l'extérieur et les ostéoclastes à la surface pour mieux illustrer les interactions entre les différentes cellules et les nombreux facteurs impliqués. Les cellules du cancer du sein sécrètent de facteurs solubles, tels que le PTHrP et des cytokines, qui stimulent l'activité de résorption par les OCs. Les cytokines et facteurs de croissance libérés lors de la résorption osseuse stimulent la prolifération et la survie de cellules métastatiques du cancer du sein. Parmi ces facteurs, le TGFβ stimule la production en PTHrP par les cellules métastatiques du cancer du sein ou la production de IL-11 par les OBS, qui a leur tour vont amplifier l'activité de résorption ostéoclastique.

3.3 Thérapies anti-cancéreuses du cancer avancé et résistance aux thérapies systémiques : le modèle du cancer de la prostate

3.3.1 Le traitement hormonal

L'extrême sensibilité de la privation d'androgènes sur la croissance des cellules du cancer de la prostate est une notion largement acceptée qui remonte au début des années 1940 [281]. Depuis, le traitement standard a consisté à bloquer la production des androgènes testiculaires. Ainsi, les stratégies de privation d'androgènes par chirurgie (orchectomie) ou par œstrogénothérapie sont restées longtemps les thérapies standard de première ligne. Cependant, ces stratégies se sont avérées peu efficaces pour le traitement du cancer avancé de la prostate, car aucun effet bénéfique significatif au niveau de la prolongation de la vie des patients n'a été constaté. L'un des tournants majeurs permettant de modifier et d'améliorer l'approche thérapeutique a été la découverte, par le groupe du Dr Labrie [282], que les surrénales sont responsables d'environ 40 à 50% des androgènes totaux circulants chez les patients ayant subi une monothérapie. L'inefficacité de la monothérapie serait donc due au fait que les cellules prostatiques sont capables de produire leurs propres androgènes à partir du précurseur DHEA ou son sulfate conjugué, le DHEA-S, fournis par les surrénales [JS et FL 97]. Ainsi, depuis les années 1980, les diverses stratégies thérapeutiques incluent le blocage total de la production et/ou l'activité des androgènes testiculaires et surrénales. Le blocage total des androgènes est cliniquement établi par combinaison de la castration (chirurgicale ou chimique avec des agonistes de la LHRH au lieu des œstrogènes) soit avec des anti-androgènes stéroïdes, tels que le cyprotérone acétate [283] ou avec des anti-androgènes non-stéroïdes, tels que le flutamide [284] et le nilutamide [285].

Parmi les nouvelles thérapies proposées ou actuellement à l'essai [286-290], l'utilisation du bicalutamide (casodex) constituerait l'un des agents les plus prometteurs du cancer avancé de la prostate. Selon les très récentes observations de Kolvenbag [291], les essais aux phases II et III permettent actuellement de constater que le casodex est tout aussi efficace que le flutamide, en prolongeant significativement la médiane de survie de patients à un stade métastatique de la maladie. Les effets bénéfiques du casodex sont aussi observés en combinaison avec des agonistes du LHRH ou en monothérapie. De toute évidence, il faut attendre encore quelques années pour vérifier les bienfaits de ces nouvelles thérapies.

3.3.2 La résistance au traitement hormonal

Malgré tous les efforts pour détecter et traiter le cancer de la prostate à un stade précoce et curable, cette maladie demeure de nos jours le type de cancer le plus fréquent et la deuxième cause de mortalité par cancer chez les hommes en Amérique du Nord, avec un taux de mortalité encore très élevé [1,2]. Initialement, il a été estimé qu'environ 70 à 80% des patients avec un cancer avancé de la prostate répondent favorablement à la monothérapie, comparativement à 80 à 95% avec la thérapie combinée [292]. Cependant, après une moyenne de 18 mois de réponse positive au traitement hormonal, la plupart des patients à un stade avancé vont éventuellement progresser vers un stade résistant à l'hormonothérapie et pour lequel il n'existe pas de thérapie systémique efficace [286,287].

3.3.2.1 Le récepteur des androgènes: mutations et amplifications

Depuis de nombreuses années, les études sur la résistance à l'hormonothérapie a été accentuée autour de la présence d'altérations génétiques du récepteur des androgènes (AR). Par ailleurs, le concept le plus généralement accepté suppose que l'initiation et la croissance progressive de tumeurs prostatiques sont causées par une cascade d'altérations génétiques, et modulées par des événements épigénétiques [section 3.1.1]. Plusieurs mutations du gène du AR ont été trouvées dans les tissus cancéreux prostatiques humains [293-295]. La plupart de ces mutations sont localisées dans le domaine de liaison à l'hormone du AR (DBD). Ces gènes mutés produisent une protéine réceptrice altérée avec une activité transcriptionnelle significativement plus élevée lorsque liée avec les œstrogènes, la progestérone, les androgènes surrénaliens ou même, paradoxalement, avec des anti-androgènes. Hakimi [295] a détecté une mutation somatique faisant diminuer la longueur d'un polymorphisme de séquence répétée du AR ($CAG_{24} \rightarrow CAG_{18}$). La longueur de la chaîne en glutamine dans la protéine AR résultante est inversement proportionnelle à l'activité transcriptionnelle du AR portant ces variations. Une diminution du nombre de CAG répétés dans le gène AR a récemment était corrélée avec l'augmentation du risque de développer des cancers prostatiques vers des stades histologiquement très avancées (*high-grade*) [296].

Bien que certaines mutations se produisent dans le gène du AR, la fréquence de mutations sont très faibles à un stade précoce, et même aux stades locaux avancés et hormono-réfractaires récurrents [297,298]. Il est à noter que les mutations AR₇₃₀ (Val → Met) du DBD et les

mutations CAG₂₄ →₁₈ ont été trouvées plus fréquemment dans les tumeurs à un “ grade élevé ” mais très rarement dans les tumeurs au stade précoce [295]. Ces données suggèrent, d’une part, qu’une proportion de tumeurs sont cliniquement hormono-réfractaires sans porter aucune mutation dans le gène AR, et d’autre part, que de mécanismes additionnels pourraient contribuer à résister à la thérapie et à la “ récurrence ” tumorale observée. Ces mécanismes impliqueraient une amplification du gène AR, la présence de puissants co-activateurs du AR et l’activation des voies de signalisation intracellulaire empruntées par les androgènes [299,300].

L’amplification de la région chromosomale Xq11-12 correspondant à la localisation du gène AR est une altération génétique très fréquente dans les cancers locaux hormono-réfractaires [301]. Le gène AR amplifié est structuralement normal et possède une spécificité normale de liaison aux androgènes. De plus, l’amplification du gène AR conduit à une augmentation de l’expression de l’ARNm du gène AR et à de très hauts niveaux d’expression de la protéine [299,301]. Environ 28% de tumeurs “ récurrents ” locales étudiées par Koivisto et ses collègues possédaient de niveaux d’amplification du AR de 3 à 28 fois plus élevés, mais aucune amplification n’a été observée dans les tumeurs primaires [302]. Ces données suggèrent fortement un rôle pour l’amplification du gène AR dans le développement de la progression tumorale, plutôt que dans *l’initiation*, et éventuellement dans l’inefficacité de traitement de privation aux androgènes.

3.3.2.2 Mécanismes alternatifs de résistance à l’hormonothérapie

En absence de mutations ou d’amplification du AR, il est possible d’envisager que la présence des “ enhanceurs ” et de co-activateurs de l’activité transcriptionnelle du AR pourrait contribuer à maintenir la promotion de la croissance androgéno-dépendante dans un environnement déficient en androgènes [299]. Cette hypothèse est basée, entre autre, sur les travaux de Yeh et Chang [303], qui ont cloné et caractérisé un co-activateur spécifique du AR, le ARA-70, capable d’augmenter de 10 fois l’activité du AR. De plus, il a été déterminé que le AR peut réguler directement certains gènes qui ne possèdent pas d’éléments *cis* AREs [304]. Par ailleurs, il faut souligner que l’activation transcriptionnelle du AR implique la formation d’un complexe multi-protéique, qui inclut les proto-oncogènes Jun et Fos et la protéine RelA capables d’induire ou de réprimer la transactivation induite par le AR [305-307].

Un autre mécanisme alternatif permettant l'émergence de tumeurs "récurrentes" hormono-réfractaires impliquerait l'augmentation de la conversion des précurseurs des androgènes surrenaliens en DHT (par les cellules cancéreuses elles-mêmes) [51,52,282,308]. Ce mécanisme serait responsable de la diminution en DHT de seulement 60% dans les tissus prostatiques cancéreux après castration, qui élimine environ 95% du DHT circulant dans le sang. Ce concept a largement été accepté par le Dr Labrie et ses collègues [282,292,308], qui proposent, depuis cette découverte, le blocage total des androgènes par une thérapie combinée visant à bloquer la production des androgènes testiculaires et surrenaliens ou l'inactivation du AR avec des anti-androgènes. Une récente meta-analyse de tous les essais cliniques publiés a permis de comparer l'efficacité du blocage total des androgènes versus la monothérapie avec seulement les agonistes du LHRH ou l'orchiectomie. Cette méta-analyse a démontré que le blocage totale des androgènes, avec seulement des anti-androgènes non-stéroïdes, permet significativement de prolonger et d'améliorer la vie des patients et de ralentir la progression de la maladie [309].

Les fortes pressions de sélection imposées par la privation des androgènes pourraient aussi amener à l'activation de voies de signalisation alternatives pour la promotion de la survie et de la croissance cellulaires [299]. Parmi les gènes régulés par le AR, certains sont impliqués directement dans la régulation de la croissance cellulaire: les cyclines A, D et E [310] et les kinases dépendantes de cyclines [311] qui régulent la progression du cycle cellulaire; les gènes de réponse précoce Jun et Fos [305,306]; les gènes de signaux de transduction intracellulaire tel que Ha-ras et p21 [312,313]; et un grand nombre de facteurs de croissance peptidiques, tels que le KGF [197-199] le TGF β [314], les EGFs [315] et les FGFs [206]. L'existence d'un phénomène de conversation croisée pour la voie de signalisation du AR a été mis en évidence à partir de données récentes. Reinakainen et ses collègues [175] ont démontré qu'il existe une conversation croisée entre la voie de signalisation médié par les androgènes avec les sentiers de transduction des quelques facteurs de croissance et leurs récepteurs (à activité tyrosine kinase), tels que ceux du IGF-I et du EGF. D'autres études ont démontré que le FGF-7 active la transcription de plusieurs gènes normalement sous contrôle dépendant des androgènes [197,316]. De plus, la voie de signalisation du AR est aussi activée par la protéine Kinase A [317], ainsi que par le IGF-I, le KGF et le EGF en absence des androgènes [318]. Il est donc possible d'envisager que, de la grande variété de molécules effectrices de transcription (*downstream*) responsables du maintien de la croissance cellulaire androgéno-dépendante, une partie pourrait être auto-activées ou activées par d'autres voies que celles impliquant les androgènes [299,300].

Un autre mécanisme alternatif pourrait aussi impliquer la présence de cellules neuroendocrines dans les carcinomes prostatiques avancés. Selon Chen et ses collègues [319], de 46 à 54% de cas étudiés (28 patients ayant subi une prostatectomie radicale après une monothérapie avec des analogues du LHRH) possèdent des cellules neuroendocrines en différenciation, présentes dans la tumeur de façon irrégulière. Les indices de différenciation de cellules neuroendocrines ont été évaluées par immunoréaction des anticorps spécifiques contre la chromogranine A et l'énolase spécifique aux neurones. Une corrélation évidente entre le " *grade* " des tumeurs et la présence de cellules neuroendocrines différenciées a été établie, et suggère que la présence grandissante de ces cellules dans les carcinomes prostatiques à plus hauts grades pourraient expliquer l'insensibilité de ces cancers à l'hormonothérapie. Des facteurs paracrines, telles que la bombésine et la *gastrin-related peptide*, peuvent ainsi favoriser la prolifération et la survie de cellules cancéreuses hormono-refractaires [205,288].

3.3.2.3 *Bcl-2 et la résistance à l'hormonothérapie*

L'expression des gènes anti-apoptotiques constituerait un autre facteur pouvant expliquer la présence de tumeurs résistantes à l'hormonothérapie. Ce phénomène pourrait permettre aux cellules du cancer de la prostate de se protéger contre l'apoptose induite en absence des androgènes. Parmi les molécules potentielles, la protéine anti-apoptotique bcl-2 constitue la cible la plus étudiée. La protéine bcl-2 est un de plus importants régulateurs de l'apoptose avant l'induction de la cascade irréversible déclenchée par les caspases [13-15].

Les récents travaux de Koivisto et ses collègues [320] ont démontré que dans les tumeurs androgéno-dépendantes, le taux de prolifération est 2 fois plus élevé tandis que le taux d'apoptose est 2 fois moins élevé que dans les tumeurs primaires. L'augmentation de la prolifération observée peut être expliquée soit par une instabilité génétique de cellules tumorales, soit par une amplification de gènes (incluant celle du AR), soit par de mutations du gène du AR (surtout au HBD) ou par la capacité de certains clones à activer les voies de stimulation de la croissance sous contrôle des androgènes, tels que le EGF, le TGF α , le EGF.R, le IGF-I et le IGF.R, et même par la bombésine et son analogue *gastrin-related peptide*, deux peptides sécrétés par les cellules neuroendocrines[288]. Le mécanisme le plus possible pouvant prévenir les carcinomes prostatiques à subir l'apoptose seraient l'expression de bcl-2. Dans certains rapports, il a été démontré que 72 à 100% de carcinomes prostatique hormono-réfractaires surexpriment la protéine bcl-2 [321,322]. Sur 77 nouveaux cas diagnostiqués et traités par le Dr

Apakama et son équipe [323], 37 (48%) ont montré une surexpression de bcl-2 et 23 (29%) ont montré une accumulation nucléaire de p53 au moment du diagnostic. Après traitement de certains patients (privation des androgènes), 17 patients suivis ont montré une surexpression de bcl-2 et une accumulation nucléaire de p53; 16 patients seulement avait été traités et parmi lesquels 13 (81%) étaient diagnostiqués hormono-refractaires.

Par contre, une autre étude, sur des spécimens provenant de patients avec de tumeurs localisées ou métastatiques, a démontré que le taux d'apoptose est plus faible dans les tumeurs localisées par rapport aux tissus normaux, mais plus élevé dans les tumeurs métastatiques par rapport au tumeurs localisées [324]. Toutefois, les taux de prolifération de tumeurs localisées et métastatiques sont respectivement 5 et 25 fois plus élevés que dans les tissus normaux. La surexpression de la protéine bcl-2 et le peptide TGF β n'a été observée que dans les tumeurs localisées (Gleason score moyen de 5.7, avec un domaine de 2 à 9), mais aucunement dans les tumeurs métastatiques (au niveau de ganglions pelviens seulement).

Les récents travaux de Bonkhoff et ses collègues [325], ont porté sur l'expression de bcl-2 et la présence nucléaire du AR dans les précurseurs cellulaires du cancer de la prostate, soit sur les tissus prostatiques bénins et sur les néoplasies intraépithéliales prostatiques HGPIN (*high-grade prostatic intraepitheliale neoplasia*). Il a été démontré que 22% de lésions HGPIN surexpriment bcl-2 par les cellules glandulaires luminales, tandis que les cellules restantes, les cellules basales, expriment un phénotype normal en bcl-2. Par ailleurs, dans la zone périphérique et de transition de la glande prostatique, 77% de cellules épithéliales cyclantes (positives à l'antigène de prolifération MIB-1), majoritairement basales, expriment fortement le bcl-2; dans la zone centrale de la glande, une augmentation substantielle en bcl-2 a été détectée dans les cellules sécrétrices luminales. Dans les deux types de compartiment, les cellules basales et luminales montrent une réduction très importante du AR nucléaire. Bien qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression de bcl-2 et l'activité de prolifération, des niveaux remarquablement faibles en AR nucléaire ont été détectés dans les cellules luminales de lésions HGPIN. Ces résultats suggèrent, d'une part, que la présence de bcl-2 peut prévenir de l'apoptose le compartiment de prolifération ; d'autre part, la surexpression de bcl-2 dans une portion de lésions HGPIN est associée avec une diminution du niveau du AR et pourrait ainsi conférer une résistance à l'induction de l'apoptose lors de la privation en androgènes.

3.3.3 Le traitement chimiothérapeutique

Selon le rapport du “ *National Prostate Cancer Database Report* ”, en 1994, environ 36% des hommes souffraient déjà du cancer de la prostate à un stage avancé de la maladie au moment du diagnostic [326]. Les interventions thérapeutiques telles que la prostatectomie radicale ou la radiothérapie ont montré des effets bénéfiques, et ont même guéri de la maladie mais, seulement dans les cas de tumeurs localisées. Par contre, les cas de cancer de la prostate avec des métastases osseuses ou dans d'autres tissus représentent encore de nos jours un problème thérapeutique majeur. Les stratégies thérapeutiques alternatives pour ce cas de cancers prostatiques dits “ *hormono-réfractaires* ” sont très limitées. La chimiothérapie cytotoxique (ou pharmacologique) constitue actuellement une alternative de choix pour un grand spectre de cancers métastatiques prostatiques. Hélas! Les substances chimiothérapeutiques mènent à une rémission temporaire de 10 à 20% de patients tout au plus.

L'utilisation de la radiothérapie au stromtium-89 [327,328,329,330] et au samarium-155 [331], ainsi que les traitements à base de biphosphonates [332,333] sont aussi utilisés pour traiter les métastases osseuses. Dans la plupart de cas, ces stratégies ne visent qu'à réduire la douleur osseuse de patients ou à éviter de complications causées par des fractures pathologiques ou par la compression de la colonne vertébrale. Ces symptômes constituent les deux causes majeures de “ morbidité ” chez les patients non-traités.

3.3.4 La chimiorésistance tumorale

La doxorubicine (ou adriamycine), la daunaurubicine et autres anthracyclines constituent l'un des principaux groupes d'agents cytotoxiques utilisés aujourd'hui dans la chimiothérapie du cancer avancé [334]. Cependant, il est très fréquent que leur efficacité soit provisoire et que la maladie réapparaisse après des périodes plus ou moins longues. Les mécanismes d'action de drogues anti-cancéreuses est d'une grande complexité. Outre des lésions directes causées au niveau de l'ADN, de nombreux agents génotoxiques agissent par interaction avec les facteurs de transcription, par inhibition directe, antagonisme, ou en altérant les interactions protéine-protéine nécessaires à de nombreuses fonctions de régulation de gènes [335].

Les raisons des échecs à la chimiothérapie anti-cancéreuses sont multiples et complexes et peuvent être liées, soit à l'hôte soit à la tumeur et à son microenvironnement. Une tumeur peut

être intrinsèquement résistante aux médicaments, ou peut développer, au cours du traitement, différents mécanismes de résistance (résistance acquise). Schématiquement, cinq grands mécanismes peuvent être individualisés : (1) l'altération du transport transmembranaire des agents anticancéreux (phénotype MDR pour *multidrug resistance*), conféré par la glycoprotéine membranaire P170; (2) l'altération quantitative et/ou qualitative des protéines cibles (dihydrofolate reductase vs méthotrexate; topoisomérase II vs anthracyclines); (3) l'altération quantitative et/ou qualitative d'enzymes impliqués dans le métabolisme des agents anticancéreux (P450 réductase vs doxorubicine); (4) l'altération quantitative et/ou des protéines de détoxification cellulaire (Glutathione, Glutathione-S-transférase, métallothionéine); et (5) l'activation des systèmes de réparation de l'ADN [336]. Les mécanismes de l'altération de la réparation par excision de nucléotides dans les cellules tumorales résistantes aux anti-cancéreux (chloro-nitrosourées) et les connexions entre la réparation, la transcription et le cycle cellulaire ont récemment été abordés par les Drs Alaoui-Jamali et Mitra [337].

3.3.4.1 *Rôle de la glycoprotéine-P dans la résistance à la chimiothérapie*

Le mécanisme de résistance à la chimiothérapie par les cellules tumorales du cancer avancé de la prostate demeure encore de nos jours l'implication de la glycoprotéine membranaire P170. Cette protéine est capable de refouler certains médicaments, en particulier les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine), du compartiment intracellulaire, vers le compartiment extracellulaire [338]. Deux récentes études portant sur le rôle de la glycoprotéine-P ont été effectuées sur différentes lignées du cancer de la prostate chez le rat. Les effets cytotoxiques de quatre drogues reconnues pour être des substrats de la glycoprotéine-P (vinblastine, taxol, doxorubicine et étoposide) et deux agents non-transportés par cette pompe à efflux (méthotrexate et cis-platine) ont été étudiés sur une lignée androgéno-sensible et quatre lignées androgéno-insensibles dérivées du carcinome prostatique Dunning chez le rat [339]. Les résultats ont démontré, d'une part, que toutes les lignées androgéno-indépendantes sont résistantes aux substrats de la glycoprotéine-P, et d'autre part, que cette résistance est due à l'expression du gène *mdr1b* de rat, qui n'a pas été détecté dans la lignée G androgéno-sensible. Les études de trois anthracyclines (doxorubicine, épidualuribicine et idarubicine) sur ces mêmes lignées et une lignée (KB-V1) exprimant de hautes quantités du produit du gène humain MDR-1 (la glycoprotéine-P), ont démontré que l'action individuelle des trois drogues est beaucoup plus efficace dans la lignée G androgéno-sensible que dans les lignées androgéno-insensibles [340]. L'idarubicine semble être beaucoup plus efficace que la doxorubicine et l'épirubicine, étant capable de renverser la résistance conférée par la surexpression de la glycoprotéine-P dans

la lignée KB-V1. Dans cette lignée, l'idarubicine s'est avérée être 58 et 25 fois plus efficace que la doxorubicine et l'épirubicine.

Le développement de lignées de rat résistantes à la doxorubicine (obtenues en augmentant les niveaux de doxorubicine dans le milieu de culture) a aussi permis d'étudier le phénomène de surexpression de la glycoprotéine-P et son implication dans la résistance chimiothérapeutique [341]. Quatre lignées au phénotype "MDR" ont été obtenues (AT3B-1, AT3B-2, MLLB-1 et MLLB-2); les quatre lignées étant plus résistantes à la vinblastine que les cellules témoins parentales. En bloquant la glycoprotéine-P, les auteurs ont démontré que seulement les lignées AT3-MDR possèdent un pompe à efflux, contrairement aux lignées MLLB-MDR. Ces données suggèrent l'existence de mécanismes de résistance alternatives autres que la surexpression de la glycoprotéine-P.

Les études sur le phénotype MDR dans les lignées humaines de cancer de la prostate ont déjà été abordées. Ces travaux, menés par Theyer et ses collègues [342], ont démontré l'expression du gène MDR-1 codant pour la glycoprotéine-P dans les lignées androgéno-indépendantes PC-3 et DU-145 mais aucune détection de celle-ci dans la lignée LNCaP (ayant un AR muté mais fonctionnel) n'a été rapportée. Ainsi les lignées PC-3 et DU-145 sont beaucoup plus résistantes à l'effet de doxorubicine que LNCaP. La réponse à la doxorubicine a aussi été évaluée en présence de bloqueurs de la glycoprotéine-P, tels que la verapamil, les cyclosporines A et 2 et le tamoxifène. Cependant, les faibles taux de blocage à la résistance obtenus avec ces "chimiosensibilisateurs" suggèrent que le phénotype MDR ne sera pas un facteur dominant dans la chimiorésistance du cancer de la prostate. Selon les auteurs, ces résultats pourraient être expliqués par la prédominance d'autres mécanismes de résistance aux drogues, tels que la surexpression de la topoisomérase II, l'augmentation de système de détoxification véhiculé par la glutathione ou autres.

3.3.4.2 Rôle des *bcl-2* et *p53* dans la résistance à la chimiothérapie

Un autre mécanisme impliquerait la modulation des activités du suppresseur de tumeurs p53 par *bcl-2*. On sait par exemple que la fonction, parmi d'autres, de p53 est d'induire un arrêt en phase G1 en réponse à des agents qui endommagent l'ADN [9,10]. L'induction de l'apoptose par p53 est censé éliminer les cellules ayant subi de dommages importants au niveau de l'ADN. De

plus, il a été déterminé que la protéine p53 fonctionnelle diminue l'expression de bcl-2 et augmente l'expression du facteur pro-apoptotique Bax [9].

Des données cliniques ont démontré par exemple que très peu de tumeurs localisées expriment une protéine p53 anormale [343]. Sur 100 spécimens analysés par PCR-SSCP (PCR single strand conformation polymorphism) et provenant d'adénocarcinomes prostatiques cliniquement localisés, seulement 5 portaient de mutations (1 sur l'exon 5, 3 sur l'exon 6 et 1 sur l'exon 7). Aucun spécimen provenant de patients avec du BPH ne portait de mutations. Les 5 spécimens portant de mutations provenaient en fait de carcinomes localisés invasifs. Ces données suggèrent que les mutations de p53 sont des événements tardifs dans la progression du carcinome prostatique. Les travaux de Heinderberg et ses collègues [344] ont démontré que la p53 augmente significativement de 22% à partir de tumeurs primaires non-traitées, à 50% dans les tumeurs métastatiques non-traitées et à 94% dans les tumeurs androgéno-indépendantes. Dans 82% de cas étudiés, le gène p53 comportait des altérations génétiques, surtout des mutations ponctuelles et d'insertions. De plus, les auteurs ont établi une corrélation entre l'expression de la protéine et l'accumulation de mutations dans les exons 5 à 8.

Deux groupes différents ont trouvé une très haute fréquence de p53 mutés dans les métastases osseuses du cancer de la prostate [345,346]. Plus récemment, McDonnell et ses collègues [347] ont découvert que 65 % des métastases osseuses androgéno-indépendantes du cancer de la prostate présentent une surexpression de bcl-2 et/ou une accumulation de p53. L'analyse clinique a établi que la médiane de survie des patients est similaire dans chaque catégorie génotypique. Ceci implique que les mutations de p53 et la surexpression sont deux processus différents dans le cancer avancé de la prostate. Les auteurs suggèrent que ces altérations moléculaires, quoique communes, ne sont pas un facteur important pour la progression fatale du cancer de la prostate.

Tel que souligné plus haut, les tumeurs prostatiques hormono-réfractaires peuvent montrer une surexpression de bcl-2 et dans certains cas une corrélation avec l'accumulation de p53 au niveau du noyau [221-223]. Par ailleurs, il a été démontré que les androgènes peuvent augmenter l'expression de bcl-2 dans les cellules du cancer de la prostate hormono-sensibles LNCaP [348]. De plus, en surexprimant bcl-2 par les cellules LNCaP, on a observé une haute résistance à l'induction de l'apoptose suite à une élimination des androgènes ou encore par la privation au sérum ou l'ajout d'esters de phorbol [349]. Les cellules LNCaP surexprimant bcl-2 forment plus rapidement de plus grosses tumeurs lorsqu'inoculées sous la peau des souris *nude*

mâles et sont les seules cellules (comparées avec les cellules non transfectées ou transfectées avec le vecteur contrôle) à produire des tumeurs xéno greffées dans les souris *nude* mâles castrées [349]. Par contre, la diminution de l'expression de bcl-2 avec des oligos antisens spécifiques abolit la résistance à l'apoptose des cellules LNCaP, induite soit par l'étoposide ou bien par la privation en androgènes. Plus récemment, Beham et ses collègues [350] ont démontré que la surexpression de bcl-2 par les cellules LNCaP (transfection stable de bcl-2) protège ces cellules contre l'apoptose induite par des agents génotoxiques. Le mécanisme de protection implique une inhibition de l'importation de la protéine p53 (non mutée) vers le noyau. Étant donné l'absence d'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules témoins (p53 positives) ou surexprimant bcl-2 mais, qui subissent l'apoptose, les auteurs suggèrent que l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose modulés par p53 sont deux phénomènes dissociables.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'implication de bcl-2 dans la résistance à l'induction de l'apoptose pourrait expliquer l'émergence de clones résistants à l'hormonothérapie et les subséquents clones hautement résistants à la chimiothérapie.

3.3.4.3 *Rôle des IGFs dans la résistance à la chimiothérapie*

L'hypothèse que les facteurs "de survie" présents dans le tissu osseux peuvent protéger les cellules métastatiques du cancer de la prostate (et du sein) contre l'apoptose induite par les agents anticancéreux est appuyée par des données très récentes. Des études *in vitro*, ont démontré que les nombreux facteurs de croissance et cytokines, ainsi que des facteurs de croissance non identifiés ou encore des composantes de la matrice extracellulaire peuvent être impliqués dans la promotion de la survie des ostéoblastes [351]. Les facteurs IGF-I, IGF-II, l'insuline et les bFGFs se sont avérés capables de protéger les ostéoblastes contre l'apoptose induite par l'absence de sérum. De plus, le PDGF et les bFGFs sont capables de potentialiser les effets des IGFs et de l'insuline. Parmi plusieurs antagonistes utilisés, seulement un anticorps contre le IGF-IR (alpha IR-3) et le TNF-alpha ont été capables d'inhiber la survie cellulaire exercée par ces facteurs, seuls ou combinés.

Le récepteur des IGF de type I (IGF1R) activés par les ligands IGF-I, IGF-II et l'insuline est d'ailleurs reconnu par ses capacités à inhiber l'apoptose dans plusieurs cellules cancéreuses. Dans les cellules du cancer du colon MCLM chez la souris, le IGF-I inhibe l'apoptose contre les agents cytotoxiques actinomycine D, lovastatine et doxorubicine [352]. L'acquisition de cette

résistance multiple aux drogues est effectuée par plusieurs mécanismes, incluant la promotion par IGF-I, de l'expression du gène *mdr-1*, de l'oncogène *c-H-ras* ou de l'enzyme MnSOD (manganese superoxide dismutase). Dans les cellules du cancer du sein HBL100, les effets cytotoxiques du 5-fluorouracil, le methotrexate, le tamoxifène et le camptothécine sont bloqués en présence de IGF-I [353]. Les hauts niveaux de survie observés sont imputés à une inhibition contre l'apoptose et non à une augmentation de la prolifération. Les effets anti-apoptotiques des IGFs ont même été observés dans plusieurs systèmes tridimensionnels composés soit de laminine, de collagène de type IV ou dans du Matrigel.

Les effets apoptotiques des glucocorticoïdes dans les lignées de myelomes sont bloqués en présence de IGF-I et IGF-II et même avec de l'insuline mais, à des très fortes concentrations [354]. Les IGFs protègent ces multiples lignées (établies ou primaires) contre l'apoptose induite par la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse de protéines) mais sont inefficaces contre la privation du sérum, les inhibiteurs de topoisomérases II ou des anticorps contre la protéine Fas. La protection des IGFs contre les effets apoptotiques du dexaméthasone n'est pas liée à une modification de l'expression de *bcl-2*, *Bax* ou *bcl-x* dans ces lignées.

Dans les cellules de la lignée différenciée PC-12, Parrizas et Leroith ont démontré que la protection de l'apoptose (contre une privation en sérum) effectuée par IGF-I est associée avec une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm et de la production protéique de *Bcl-xL* [355]. Le IGF-I est aussi capable de prévenir l'apoptose par l'activation d'au moins deux voies de signalisation différentes: la voie du PI3'(phosphatidylinositol 3')-kinase et la voie de MAP (mitogen-activated protein)-kinase [356].

3.3.4.4 *Rôle des TGFβs dans la résistance à la chimiothérapie*

Il est bien établi que le TGFβ est un régulateur physiologique direct de l'apoptose dans les cellules prostatiques épithéliales [357]. Le TGFβ est reconnu pour inhiber la prolifération des cellules prostatiques épithéliales normales et cancéreuses en culture. Dans les lignées du cancer de la prostate PC-3, le TGFβ induit l'apoptose via IGFBP-3 selon un mécanisme indépendant de la voie de p53 ou de la voie de survie médiée par le complexe IGF/IGF1R [358]. Les auteurs suggèrent que des protéines réceptrices membranaires (non identifiés) pourraient médier le signal apoptotique engendré par le IGFBP-3. Paradoxalement, Barrack a démontré que la

surexpression de TGF β *in vivo* par les cellules du cancer de la prostate chez le rat (MatLyLu) peut favoriser la tumorigénicité lorsqu'inoculées sous la peau des souris [170,207].

Les récents travaux de Teicher et ses collègues ont démontré que trois lignées humaines du cancer de la prostate (PC-3, DU-145 et LNCaP) sont sensibles, en culture, aux effets cytotoxiques du melphalan, du cyclophosphamide ou de l'adriamycine [359]. Cependant, les tumeurs produites par ces cellules implantées dans les souris nude ou SCID sont hautement insensibles aux effets des mêmes drogues. Une augmentation graduelle des niveaux de TGF β dans le sang a été détectée après l'administration individuelle de chaque drogue. Les tumeurs les plus résistantes aux trois drogues, soient celles produites par les cellules DU-145 sont en corrélation avec les niveaux de TGF β dans le sang de souris portant ce type de tumeurs. En fait, la proportion sensibilité/résistance des trois tumeurs *in vivo* correspond avec les niveaux sanguins en TGF β chez les souris portant ces tumeurs.

Ces résultats, pris ensemble, supportent l'hypothèse que des facteurs de croissance ou de survie, tels que les IGFs et les TGF β s peuvent protéger les tumeurs métastatiques du cancer de la prostate contre les effets cytotoxiques des drogues anticancéreuses. Rappelons que le tissu osseux est une riche source en IGFs et TGF β et que les tumeurs prostatiques produisent de grandes quantités en TGF β . Les diverses lignées du cancer de la prostate produisent aussi des IGFs et du TGF β ainsi qu'une multitude de facteurs de croissance, tels que du TGF-alpha, du EGF (et son récepteur), du FGF, du NGF et des endothélines [360].

4 HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET MODÈLES DE TRAVAIL

4.1 Problématique et sujet d'étude

L'induction de l'apoptose est au cœur de toutes les thérapies visant à traiter les cancers de la prostate à tous les stades de la maladie, sauf dans certains cas à un stade primaire et localisé. Toutefois, les anti-androgènes, la privation des androgènes, tout comme les agents chimiothérapeutiques sont incapables d'induire efficacement l'apoptose de toutes les cellules composant les tumeurs à un stade très avancé de la maladie. Cliniquement, il a été établi que l'efficacité de stratégies anticancéreuses contre le cancer de la prostate et du sein diminue selon le nombre de métastases, surtout de métastases osseuses. À même titre que le cancer métastatique du sein, dont les similarités et les divergences ont été abordées précédemment, le cancer très avancé de la prostate représente un défi de taille pour le corps médical et la recherche fondamentale.

Nos études se situent donc comme une suite logique à la compréhension de mécanismes qui régissent la réaction ostéoblastique, le pronostic extrêmement peu favorable de la présence de métastases osseuses, la résistance à l'hormonothérapie et à l'émergence de clones hautement résistants à la chimiothérapie. Étant donné que la présence de foyers métastatiques du cancer de la prostate dans l'os produit une réaction osseuse qui semble plaire à l'hôte et à l'invité, nous décrivons cette alliance comme une histoire d'amour qui va mal finir. En effet, tel que discuté plus haut, l'ostéoblaste est stimulé par les facteurs produits soit par les cellules du cancer de la prostate ou bien par les facteurs libérés par l'activité protéolytique engendré par les protéases tumorales. L'ostéoblaste activé initie alors le processus de production de facteurs de croissance nécessaires à sa différenciation et aboutissant à la minéralisation, probablement partielle dans un premier temps, de la matrice extracellulaire. Un cercle vicieux s'établit alors entre les facteurs produits par la cellule métastatique et le tissu osseux.

4.2 Hypothèses de travail et objectifs

Cliniquement, les tumeurs osseuses du cancer de la prostate sont presque toujours accompagnées d'une réaction ostéoblastique. La douleur, les fractures pathologiques et la

compression de la moelle osseuse sont les principaux problèmes de patients atteints. Aucune thérapie actuelle ne peut prolonger la vie de ces patients de façon significative. Il a été établi que les tumeurs du cancer de la prostate expriment le AR à tous les stades de la maladie [300]. Cependant, les cancers très avancés de la prostate, surtout avec de métastases osseuses, comportent de clones cancéreux refractaires à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie. La compréhension de mécanismes qui permettent à la cellule cancéreuse d'échapper à la mort normalement induite par le retrait des androgènes ou par des agents pharmacologiques ne sont pas encore bien élucidés.

Contrairement aux tumeurs localisées, presque toutes les métastases situées au niveau des os (du cancer du sein ou de la prostate) progressent vers un stade hormono-refractaire. Au niveau de métastases osseuses, les nombreux facteurs de croissance présents sont-ils responsables de cet échec? De plus en plus de données expérimentales soulignent que la présence de facteurs de survie seraient responsables d'une résistance à la thérapie anti-cancéreuse, du moins en bonne partie (section 3.3.4).

Dans le but de déterminer si les ostéoblastes et les facteurs de croissance produits par les ostéoblastes peuvent protéger les cellules du cancer de la prostate, nous avons étudié les effets de l'adriamycine (ou doxorubicine) sur les cellules du cancer de la prostate, d'abord, en présence et en absence du milieu conditionné par les ostéoblastoïdes MG-63 (CM MG-63) et des facteurs de croissance IGF-I et TGF β 1, en monocouches; et deuxièmement, dans un système tridimensionnel en gel de collagène de type I, en présence et absence des cellules MG-63.

L'absence de réponse aux androgènes caractérisant les métastases osseuses du cancer de la prostate, nous a amené à étudier le rôle du récepteur de glucocorticoïdes (GR) dans la biologie des cellules PC-3. Ces études se situent dans la recherche de "conditions" ou d'agents qui peuvent permettre de modifier l'expression de facteurs qui altèrent la réponse à la chimiothérapie et à l'hormonothérapie. Elles seront abordées au chapitre II.

Dans le même ordre d'idées, sachant que les glucocorticoïdes ont un impact sur la biologie de l'ostéoblaste et sur la formation de l'os, une étude sur les effets de l'activation du GR a été entreprise sur la lignée MG-63. Tout comme pour la lignée PC-3, l'état fonctionnel du GR a d'abord été vérifié et les médiateurs possibles de son activité ont été déterminés. Le

chapitre III portera donc sur le rôle du GR dans la biologie de cellules MG-63. Ces travaux ont été effectués dans notre équipe, en collaboration avec M. Jocelyn Boulanger.

Le modèle de la lignée de rat PA-III a été considéré dans nos études en sachant qu'en les injectant dans les os chez le rat, on observe une réaction majoritairement ostéoblastique (voir modèles expérimentaux, section 4.3). Le Dr Koutsilieris avait auparavant déterminé que les cellules PA-III sécrètent de l'uPA en quantités suffisantes pour la purifier sous une forme active et procéder à des essais biologiques en culture cellulaire. Pour les études portant sur la réaction ostéoblastique, les cellules PA-III ont été couplées avec les cellules UMR-106, dérivées d'un ostéosarcome de rat et caractérisées comme étant un ostéoblastoïde moins différencié. Ce couplage permet de simuler un système de culture cellulaire homologue *in vitro*, afin d'étudier les interactions cellule-cellule qui conduisent à la réaction ostéoblastique observée *in vivo*. La présence et l'état fonctionnel du GR ont aussi été étudiés. Le but de ces expériences consistait à évaluer comment l'activation du GR pourraient perturber les interactions " positives " entre les cellules du cancer de la prostate et les ostéoblastes.

4.3 La cellule métastatique du cancer de la prostate et modèles d'études *in vitro* et *in vivo*

Il existe trois lignées du cancer de la prostate dont l'origine épithéliale, la sécrétion et la réponse aux facteurs de croissance ont été bien caractérisés, soit les lignées DU-145, PC-3 et LNCaP [361]. Elles originent respectivement de lésions métastatiques du système nerveux central [362], d'une vertèbre lombaire [363] et d'un ganglion lymphatique [364]. La lignée LNCaP est la seule à exprimer le récepteur des androgènes (AR) et à répondre aux androgènes, qui induisent l'expression de la phosphatase acide prostatique (PAP) et de l'antigène prostatique spécifique (PSA) [365,366]. Toutefois, le AR exprimé comporte une mutation au niveau du domaine de liaison à l'hormone qui se lie aussi à l'œstradiol et à la progestérone, lesquelles stimulent aussi la croissance des cellules LNCaP [367]. L'expression des facteurs de croissance et de leurs récepteurs sont résumés au tableau IV.1. Ces trois lignées ont grandement contribué à notre compréhension du cancer de la prostate au cours de quinze dernières années. Elles ont servi et serviront encore comme modèles très appropriés pour étudier les mécanismes de progression et invasion tumorales, le processus métastatique, et comme pour notre intérêt, dans la réaction ostéoblastique pathologique et la résistance aux thérapies systémiques.

TABLEAU IV.1. Expression de facteurs de croissance et de leurs récepteurs dans les lignées carcinomateuses de la prostate.			
	DU-145	PC-3	LNCaP
Sécrétion des facteurs de croissance			
EGF	++	+	++
TGF α	+++	+	++
FGF-2	++	+	-
IGF-I	++	+++	++
TGF β	++	++	-
Expression des récepteurs			
EGF/TGF α -R	+++	+	++
FGF-R	+++	+++	+
IGF-I-R	+++	++	+
TGF β -R	++	++	-

Les niveaux sont évalués sur une échelle comparative: +, niveaux mesurables faibles; +++, niveaux mesurables élevés; -, non détecté. Tiré de la référence 362.

La cellule PC-3, est androgéno-indépendante, p53 négative, établie à partir d'une métastase osseuse, et exprime une grande variété de facteurs tels que le TGF β et le IGF-I et la protéase uPA [361]. Expérimentalement, une grande variété d'agents cytotoxiques sont capables d'induire l'apoptose de cellules PC-3 [342,359,368]. Parmi ces agents, on retrouve le melphalan, le cyclophosphamide, la vincristine (inhibition de la tubuline), le cis-platine (agent alkilant), et les inhibiteurs de topoisomérases, soient l'adriamycine, la camptothécine et le tenoposide. Tout comme dans les études cliniques, les cellules métastatiques du cancer de la prostate en culture possèdent donc toute la machinerie nécessaire à l'induction de leur apoptose. Ceci étant dit, il est alors possible de postuler que les résistances cliniques à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie soient associées à un mécanisme permettant d'échapper à l'apoptose.

La lignée cellulaire humaine MG-63 représente un ostéoblastoïde très bien caractérisé et couramment utilisée pour l'étude de la physiologie osseuse. La lignée MG-63, dérivée d'un ostéosarcome humain, exprime les récepteurs pour les oestrogènes pour la PTH et pour la VD3, la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine. De plus, les cellules MG-63 augmentent leur phénotype ostéoblastique en culture dans un gel de collagène de type I, en produisant entre autre du collagène de type I plutôt que du type IV et en initiant la production en IGFs [369]. Les cellules MG-63 constituent actuellement un modèle de choix pour étudier la biologie des ostéoblastes, notamment sur la réponse aux hormones, aux facteurs de croissance, aux cytokines et aux agents anticancéreux [370-373]

Il n'existe pas de modèle animal pour le cancer de la prostate produisant spontanément des métastases osseuses. Ainsi plusieurs modèles *in vivo* pour l'étude des métastases osseuses du cancer de la prostate ont été développés chez le rat ou la souris. Les premiers modèles d'intérêt ont été l'œuvre de deux groupes de recherche, soit celui du Dr Pollard aux Etats-Unis [374,375] et celui des Drs Geldof et Rao aux Pays-Bas [376]. Dans le modèle du Dr Pollard, quatre lignées tumorigènes ont été isolées des tumeurs spontanément développées chez le rat Lubond-Wistar (L-B). Parmi ces quatre lignées, transplantables seulement chez le même rat, celles désignées par PA-III a été la seule à afficher la capacité de produire, lorsque déposées au niveau du calvaria ou du scapula chez le rat L-B mâle, de tumeurs locales sur les os et une réaction ostéoblastique au site osseux de transplantation. De plus, d'un point de vue histologique, la réaction osseuse examinée était similaire à celle des métastases ostéoblastiques observées chez les patients aux stades avancés du cancer de la prostate. De façon analogue, le modèle Geldof-Rao a permis de produire des métastases squelettiques en utilisant une variante des tumeurs développées d'abord chez le rat Copenhagen, et désignée par R3327-MatLyLu [377]. Cette lignée, injectée dans la veine de la queue des rats Copenhagen mâles, produit des tumeurs au niveau des vertèbres lombaires, quatre jours après l'injection [376]. Ces métastases osseuses ont été accompagnées d'une nette activité ostéoclastique concomitante avec une activité ostéoblastique au niveau de la colonne vertébrale. D'autres modèles ont été développés plus récemment, chez la souris et le rat [378,379]. Dans le modèle développé par Thalmann et ses collègues [379], les cellules LNCaP ont été inoculées sous la peau de souris *nude* mâles castrées. Les tumeurs développées métastasent de façon spontanée au niveau du squelette, avec une nette réaction ostéoblastique, dans 15 à 50% des souris.

Pour les études que notre groupe de travail a mené, nous avons couplé les cellules PA-III avec les cellules osteoblastoïdes UMR-106, dérivées d'un ostéosarcome de rat, pour simuler un système de culture cellulaire homologue *in vitro* afin d'étudier les interactions cellule-cellule qui conduisent à la réaction ostéoblastique observée *in vivo*. La lignée UMR-106 est au même titre que la lignée MG-63, un ostéoblastoïde très bien caractérisé, et constitue un modèle valable pour l'étude de la biologie osseuse. Cette lignée a récemment été utilisée, entre autres, pour des études visant à déterminer les voies de signalisation empruntées par l'interleukine-1 β et les facteurs de croissance IGF-I, FGF-2 et PDGF-BB [370,380], les effets de l'insuline sur le transport et le métabolisme de la vitamine C [381] et sur la régulation des facteurs de croissance et d'hormones calciotropes dans l'activité de l'enzyme 24-hydroxylase (première étape d'oxydation conduisant à la formation de VD3) [382].

CHAPITRE I

**LES FACTEURS DE SURVIE DÉRIVÉS DES OSTÉOBLASTES PROTÈGENT LES
CELLULES PC-3 DU CANCER DE LA PROSTATE CONTRE L'APOPTOSE
INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE**

RÉSUMÉ

OBJECTIFS : La croissance tumorale des métastases ostéoblastiques, réfractaires au traitement anti-hormonal et résistantes à la chimiothérapie, compromet les chances de survie chez les patients atteints du cancer avancé de la prostate. Ainsi, nous avons analysé la capacité des ostéoblastoïdes MG-63, dérivés d'un ostéosarcome humain, et le milieu conditionné par celles-ci (MC MG-63) à protéger les cellules humaines PC-3, dérivées du cancer de la prostate, contre l'apoptose induite par l'adriamycine (ADR) *in vitro*.

MÉTHODES : Les effets cytotoxiques de l'ADR sur les cellules PC-3 et MG-63 ont été évalués par les essais d'exclusion au bleu de trypan, par cytométrie en flux, par analyse de l'ADN génomique fragmenté sur gel d'agarose et par l'essai de TUNEL (TdT-mediated nick end labeling) et par immunocytochimie. Ces essais ont été effectués en culture classique (monocouches) et dans un système tridimensionnel en gel de collagène de type I.

RÉSULTATS : L'adriamycine (100nM) arrête les cellules PC-3 et MG-63 au niveau de la phase G2/M du cycle cellulaire mais induit l'apoptose seulement dans les cellules PC-3. Le MC MG-63 (50 µg/mL) et les facteurs de croissance IGF-I (50 ng/mL) et TGFβ1 (25 ng/mL) neutralisent partiellement la cytotoxicité exercée par l'adriamycine dans les cellules PC-3. De plus, les cellules MG-63 protègent les cellules PC-3 de l'apoptose induite par l'adriamycine dans le système tridimensionnel en gel de collagène de type I, tel que déterminé par les essais de TUNEL.

CONCLUSION : Ces données suggèrent donc que les facteurs de croissance dérivés des ostéoblastes peuvent optimiser la survie des cellules métastatiques du cancer de la prostate et permettre le développement *in vitro* de la croissance tumorale résistante à la chimiothérapie.

**OSTEOBLAST-DERIVED SURVIVAL FACTORS PROTECT PC-3 HUMAN
PROSTATE CANCER CELLS FROM
ADRIAMYCIN-APOPTOSIS.***

**Carlos Reyes-Moreno (1), Antigone Sourla (1), Isabelle Choki (1), Charles Doillon (2), and
Michael Koutsilieris (1,3)**

(1) Molecular Endocrinology Laboratory, Research Center, Pavillon C.H.U.L, and (2) Biomaterials Institute, Research Center, Pavillon H.S.F.A, Laval University, 2705 Boul. Laurier, Ste. Foy, Quebec, G1V 4G2, Canada, and (3) Department of Physiology, Medical School of Athens, National and Kapodistrian University, 75 Micras Asias, Goudi, Athens 115 27, Greece.

Short title: Chemotherapy Resistant Growth in Osteoblastic Metastases.

Key Words: Prostate cancer, bone metastasis, apoptosis, drug resistance.

* A part of this manuscript has been scheduled for presentation at the 79th Annual Meeting of the Endocrine Society (US), Minneapolis, MI, June 11-14, 1997, and at the International Conference on "Invasion and Metastasis", Kapandriti, Greece, October 4-10, 1997.

Article accepté pour publication au journal Urology, 1998.

ABSTRACT

OBJECTIVES: Hormone-independent and cytotoxic drug-resistant tumor growth in osteoblastic metastases defines poor survival in patients with advanced prostate cancer. Therefore, we analyzed the ability of human osteoblast-like cells (MG-63 cells) and MG-63 conditioned media (MG-63 CM) to protect PC-3 human prostate cancer cells from adriamycin apoptosis, *in vitro*.

METHODES: Adriamycin cytotoxicity was assessed in MG-63 osteoblast-like and PC-3 prostate cancer monolayer and three-dimensional collagen coculture system using DNA content and trypan blue exclusion assays, analysis of indices of cell cycle by flow cytometry, determination of DNA fragmentation on simple agarose gel and TdT-mediated nick end labelling (TUNEL) assay, and immunocytochemistry.

RESULTS: Adriamycin (100 nM) arrested both the PC-3 and MG-63 cells at the G2/M phase in the cell cycle but induced apoptosis only in PC-3 cells, as assessed by flow cytometry, trypan blue exclusion assays, and agarose gel. Optimal doses of MG-63 CM (50 µg/ml), insulin-like growth factor I (50 ng/ml), and transforming growth factor beta 1 (25 ng/ml), as determined by DNA content assay, partially neutralized the adriamycin cytotoxicity of PC-3 cells detected by flow cytometry and trypan blue exclusion. In addition, MG-63 cells rescued PC-3 cells from adriamycin apoptosis in the three-dimensional type I collagen gel system, as assessed by TUNEL assay.

CONCLUSION: These data suggested that osteoblast-derived growth factors can optimize survival of metastatic prostate cancer cells and develop cytotoxic drug-resistant tumor growth, *in vitro*.

INTRODUCTION

Prostate cancer is the most commonly diagnosed malignant tumor and the second leading cause of tumor-related death of men in western world (1). Unfortunately, forty per cent of newly diagnosed patients with prostate cancer have already metastases in bones (2). The biology of metastatic prostate cancer is unique in that, unlike almost all other solid tumors metastasizing in skeleton, it seems that growth factor-producing metastatic prostate cancer cells directly stimulate osteoblasts to form woven bone rather than to produce osteolysis (3-10). Among the local modulators involved in osteoblastic reaction, overexpression of urokinase type plasminogen activator (uPA) is thought to deregulate bone matrix deposition via hydrolysis of insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and activation of latent-transforming growth factor beta 1 (latent-TGF β 1) (6,7). This results in the increased bioavailability of IGFs and TGF β 1 in bone matrix which are the main effectors of the production of woven bone, locally (4-7).

The most effective treatment for metastatic (stage D2) prostate cancer is the androgen-deprivation strategy by either orchiectomy or administration of luteinizing-hormone releasing-hormone agonists (LHRH-As). The effect of these androgen depletion strategies is "marginally" improved by the addition of antiandrogens which are acting on androgen receptor (AR) and block the action of dihydrotestosterone (DHT) formed by the prostate cells using circulating precursors sex steroids of adrenal origin (11). It is noteworthy that although an initial response to androgen-depletion therapy is documented in almost all the newly diagnosed stage D2 prostate cancer patients, tumors progress to androgen-insensitive stage D3 and only 10-20% of stage D2 patients are alive 5 years following diagnosis (12). Salvage therapy with cytotoxic chemotherapy has not been effective in patients with hormone refractory prostate cancer (4,5,12,13).

Because at the cellular level any type of cancer therapy induces programmed cell death "apoptosis" (12-15), it is conceivable that androgen-independent and cytotoxic drug-resistant tumor growth is probably associated with "rescue" from apoptosis (5,16-19). Knowing that metastatic foci in bones are directly associated both with the prostate cancer progression to hormone refractory stage D3 and the cytotoxic drug-resistant tumor growth (20,21), we have assessed the ability of MG-63 osteoblast-like human osteosarcoma cells and MG-63 conditioned media (MG-63 CM) to protect PC-3 human prostate cancer cells from adriamycin-cytotoxicity, *in vitro*.

We documented that MG-63 osteoblast-like cells, MG-63 CM and osteoblast-related growth factors, such as IGF I and TGF β 1 protected PC-3 prostate cancer cells from adriamycin-cytotoxicity. This protection resulted in a cytotoxic drug-resistant growth of PC-3 cells, *in vitro*. Therefore, we concluded that MG-63 osteoblast-like osteosarcoma-derived growth factors can optimize the survival of PC-3 prostate cancer cells. Therefore, it is conceivable that an altered tumor biology in osteoblastic metastases should not be necessarily linked with the presence of genetically altered metastatic prostate cancer tumor clones.

Materials and Methods

Cell lines and cell culture assays. MG-63 osteoblast-derived human osteosarcoma cells and PC-3 human prostate cancer cells were obtained from the American Type Cell Culture (ATCC, Bethesda, MD). MG-63 and PC-3 cells were grown in 75-cm² culture flasks using Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (DMEM/F-12, GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) containing 5% calf serum (CS). The cells were plated at a cell density of 1.5×10^4 cells in 24-well plates and grown with DMEM/F-12 medium containing various concentrations (0.5 up to 5%) of CS depending on the experiment.

The PC-3 cell line has been established from an osteoblastic metastasis of a patient with hormone refractory prostate cancer (22). The PC-3 cells are p53-negative and androgen-insensitive cells (AR) (23) proven to be a reliable *in vitro* model for studying cell-cell interactions related with prostate cancer biology in bone metastases (2,14,18,19,22,23). MG-63 human osteosarcoma cells are well-characterized osteoblast-like osteosarcoma cells which express alkaline phosphatase, osteocalcin, parathyroid hormone receptor (PTH.R), increase cAMP production in response to PTH, express vitamin D3 receptor, estrogen receptor (ER), increase osteocalcin expression in response to estrogen, and enhance expression of type I collagen when cultured on collagen gels (19,24, and references therein). In addition, both the MG-63 and PC-3 cell lines were successfully used in the development of a novel three-dimensional type I collagen gel system which enabled us for the first time to produce the morphological evidence of the osteoblastic reaction, *in vitro* (25,26).

Cytotoxicity assays. The number of alive (A) and dead (D) cells was assessed by trypan blue exclusion assay in cell cultures exposed to 100 nM and 5 μ M adriamycin (Sigma) for 6 hr, 24 hr and 48 hr. The MG-63 and PC-3 cells were plated at 15,000 cells/well and cultured with DMEM/F-12 containing 5% CS for 24 hr. Then cells were washed with serum-free medium and cultured with DMEM/F-12 containing either 0.5% or 5% CS plus 100 nM or 5 μ M of adriamycin depending on the experiments. The ratio of alive (A) versus dead (D) cells was computed (A/D) and compared with that of cell cultures growing without adriamycin under identical experimental conditions (controls).

Detection of apoptosis in simple agarose gel. Apoptosis was assessed by the DNA fragmentation (DNA ladders of multiples of 180 base pairs) detected on simple agarose gel

electrophoresis of total cellular DNA (27). In brief, DNA was extracted from cells which were detached by trypsin, pooled and lysed in 5 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100 for 2 hr on ice. The lysate was centrifuged at 27,000x g for 20 min. The supernatant was incubated with 200 µg/ml proteinase K for 1 hr at 50°C and extracted with phenol/chloroform; then DNA was precipitated overnight at -20°C in 2 volumes of ethanol and 0.13 M NaCl with 20 µg glycogen. After treatment with 1 mg/ml boiled bovine pancreatic RNase A for 1 hr at 50°C, the DNA was loaded (15 µg) onto a 2% horizontal agarose gel containing 0.3 µg/ml ethidium bromide and run in 1xTBE (Tris/Borate/EDTA) buffer at 4.0 V/cm. Gels were photographed under UV light with Polaroid 57 type film (27).

Phase distribution in the cell cycle and detection of apoptosis by flow cytometry. The indices of cell cycle and apoptosis were assessed by flow cytometry analyzing DNA content in propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 stained cells with a counter EPICS 753 pulse cytometer (Coulter counter, Hialeah, FL). This technique permits the calculation of the apoptotic cells excluding necrotic cells, as reported previously (28). In brief, adriamycin treated and control PC-3 cells were collected (3.0-7.5x100,000 cells) and incubated with 50 µl PI (20 µg/ml) for 30 min on ice. Then cells were fixed with 950 µl of ethanol (25% in PBS) adding 25 µl of Hoechst 33342 (112 µg/ml) and analyzed on EPICS 753 pulse cytometer. The MG-63 and PC-3 cells were exposed to 100 nM and 5 µM of adriamycin for 6, 24, and 48 hr cultured with DMEM/F-12 medium supplemented by 0.5% or 5% CS, depending on the experiment. We analyzed apoptosis (hypodiploid cells; <G1) after having excluded necrotic cells and computed the % of apoptotic cells and phase distribution of MG-63 and PC-3 cells into the cell cycle (28). Results were expressed as % of cells in G1/G0, S, G2/M, and as % of cells in apoptosis (<G1).

The effects of IGF I, TGFβ1, MG-63 CM on the growth of PC-3 cells and their protection against adriamycin-cytotoxicity. We analyze the ability of recombinant human IGF-I and TGFβ1 (R&D Systems) to alter the growth of PC-3 cells and to protect PC-3 cells from adriamycin-cytotoxicity, as assessed by the number of alive (A) and dead (D) cells and A/D ratio in monolayer cultures. Similarly, MG-63 conditioned media (CM) prepared using confluent MG-63 cell cultures which were grown in 225-cm² culture flasks using DMEM/F-12 without CS. CMs were collected every 48 hr, pooled together and centrifuged at 3,000 rpm for 3 min. The supernatant was then filtered over protein filters with cut-off molecular weight (MW) of 15,000 daltons (Amicon Inc., MA, USA). Proteins in CM were quantified using Bradford assay (BioRad) and stored at -20°C (1 mg of protein/ml). Increasing dose of CM containing from 1 ng/ml up to 100 µg/ml (final protein concentration in culture-well) were tested in PC-3 cells

assessing cell growth and cytotoxicity; and then 50 µg/ml (final concentration) of MG-63 CM was analyzed for its putative protective action against adriamycin-cytotoxicity in PC-3 cells.

Three-dimensional type I collagen gel system (3-D system). Collagen was prepared in our laboratory using native type I collagen extracted from rat tail tendons (25). We used this type I collagen in an aqueous solution containing 0.002 M acetic acid in a final concentration of 1.5 mg/ml. Three-dimensional gels of native collagen type I were prepared in 24-well plates by rapidly mixing MG-63, PC-3 cells, or both cell types with type I collagen in a final concentration of 10^6 cells/ml of collagen gel (in a final volume of 1 ml per well). The collagen gels were let for 30 min at 37°C and then incubated in a humidified CO₂ incubator using 1 ml of DMEM/F-12 containing 5% CS (25,26). In addition, we prepared collagen gels containing mixed cell populations of 0.5×10^6 of MG-63 and 0.5×10^6 of PC-3 cells (final concentration 10^6 cells/ml of gel). Both the MG-63 and PC-3 cells were homogeneously dispersed into the type I collagen gel (25,26). After 24 hr, we changed culture media and added 100 nM of adriamycin for 48 hr. Control collagen gels were cultured without adriamycin under identical experimental conditions. Control collagen gels were cultured without adriamycin [controls; containing only MG-63 cells, only PC-3 cells, and mixed PC-3 and MG-63 cells].

Detection of apoptosis in 3-D system. After 48 hr exposure to 100 nM of adriamycin collagen gels underwent fixation with phosphate buffered formalin 10% for 4 hr and then were routinely processed and embedded in paraffin blocs. Serial sections were of 5 µm were cut and stained with the classic trichrome-Masson techniques as described previously (25,26) or processed for TdT-mediated nick end labeling method for detection of apoptosis (TUNEL assay). The sections consecutive to those stained with the TUNEL assay (ONCOR, Inc., USA; TdT-mediated nick end labeling)] were stained with standard hematoxylin/eosin to evaluate histological features of apoptosis, including cell shrinkage, chromatin condensation, and apoptotic body formation.

Statistical analysis. Difference in group means were assessed for statistical significance using one-tailed multiple comparison procedure of Dunnett only when treatments were compared with control values. When single comparisons were made, Student's *t* test was used.

RESULTS

1. Adriamycin cytotoxicity in PC-3 monolayer cultures. Forty eight hours exposure to 100 nM and 5 μ M of adriamycin remarkably decreased the number of PC-3 cells in monolayer cultures as compared with that of control PC-3 cells. This was suggestive of a potent cytostatic and/or cytotoxic action (Fig. 1). Because, suprapharmacological dose of adriamycin decreased the number of PC-3 well below the plating number (15,000 cells), we concluded that 5 μ M of adriamycin produced a clear cytotoxic effect in PC-3 cells (Fig. 1). It is noteworthy that increasing concentration of CS (0.5% up to 5.0%) in the culture media marginally modified the effects of 100 nM of adriamycin but not those of 5 μ M of adriamycin. In addition, 2.5% and 5.0% CS remarkably increased the expected number of PC-3 cells in cultures containing 0.5% CS. Apparently, 2.5% and 5% CS provided maximum stimulation for the growth of PC-3 cells, *in vitro* (Fig. 1). Consequently, all future experiments were uniformly performed in DMEM/F-12 media containing 5.0% CS.

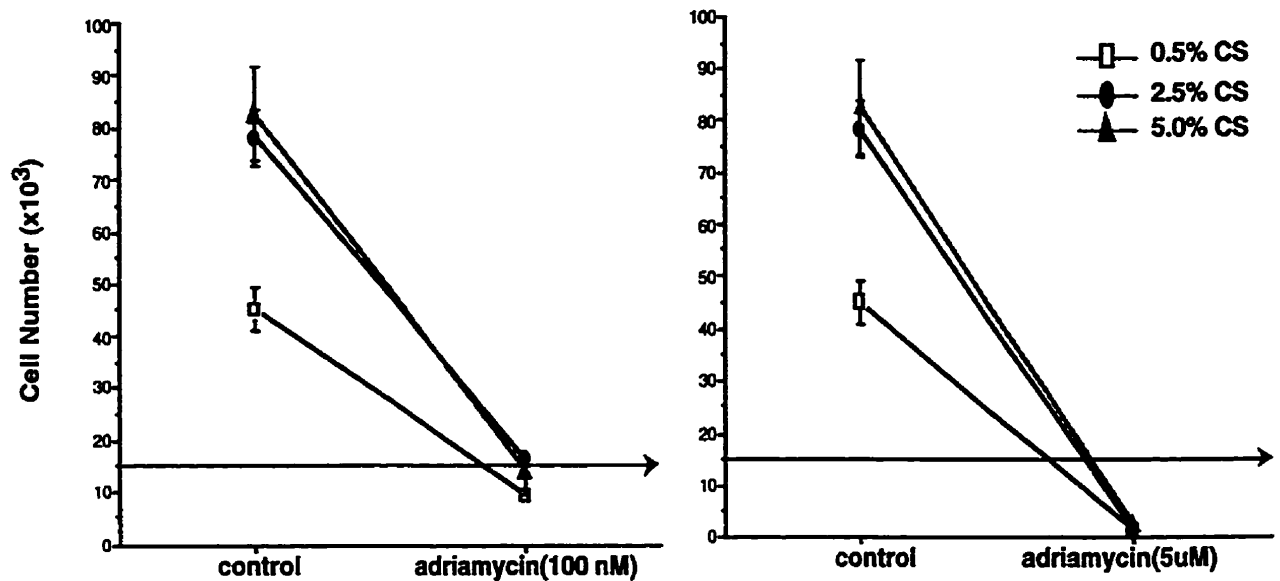


Figure 1: The effects of adriamycin (100 nM; left panel and 5 μ M; right panel) on the number of PC-3 cells. The PC-3 cells were cultured using DMEM/F-12 media supplemented with 0.5% (□), 2.5% (●) and 5% (▲) calf serum (CS) and exposed to adriamycin for 48 hr, as described in the Methods section. Control (adriamycin-free) cultures supplemented with 2.5% and 5% CS contained higher number of PC-3 cells as compared with that of 0.5% CS. Adriamycin-exposure significantly decreased the number of PC-3 cells. The exposure to 5 μ M of adriamycin decreased the number of PC-3 cells well-below the number of PC-3 cells initially plated per well (15,000 cells per well). The adriamycin-cytotoxicity of PC-3 cells was not significantly different among PC-3 cell cultures supplemented with 0.5%, 2.5% and 5% CS.

The expected number (control) of dead PC-3 cells was significantly increased after 48 hr exposure to pharmacological and suprapharmacological doses of adriamycin, as assessed by trypan blue exclusion [(control) = $2,530 \pm 240$; (Adriamycin 100 nM for 48 hr) = $9,300 \pm 660$; (Adriamycin 5 μM for 48 hr) = $12,640 \pm 320$; Number of dead cells ($X \pm \text{SE}$)].

Because the comparative analysis of adriamycin-cytotoxicity must consider also the number of alive cells in each cell culture (cytostasis probably decreases cytotoxicity), we computed and analyzed the ratio of alive (A) vs dead (D) cells in PC-3 cultures incubated with and without adriamycin for 48 hr (Fig. 2). Adriamycin decreased A/D ratio from 33 in controls (adriamycin-free) down to 1.5 (Adriamycin-100 nM) and down to 0.17 (adriamycin-5 μM).

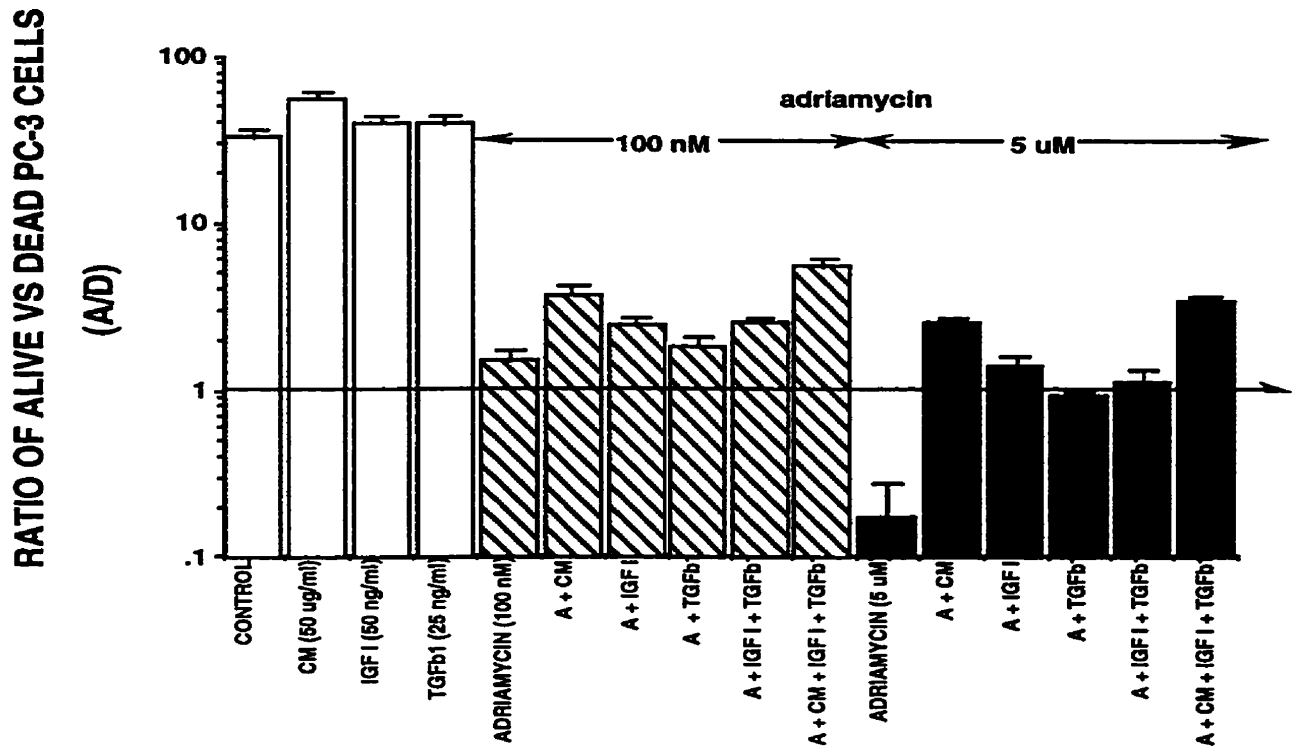


Figure 2: The effects of 50 $\mu\text{g/ml}$ of MG-63 cell conditioned media (CM), 50 ng/ml of insulin-like growth factor I (IGF I), 25 ng/ml of transforming growth factor beta 1 (TGF β 1), and adriamycin (100 nM \square ; and 5 μM \blacksquare) on the alive (A) versus (vs) dead (D) ratio (A/D ratio; expressed in a log. scale). The PC-3 cells were cultured using DMEM/F-12 media supplemented with 5% calf serum (CS) for 48 hr (details in the Methods section). Adriamycin decreased the A/D ratio from 33 down to 1.3 (100 nM) and 0.17 (5 μM). The MG-63 CM, IGF I and TGF β 1 partially neutralized the adriamycin-cytotoxicity, as documented by the increasing A/D ratio of adriamycin-treated PC-3 cells. The combination treatment with MG-63 CM + IGF I + TGF β 1 was the most effective of increasing A/D ratio of the adriamycin-treated PC-3 cells.

To confirm the cytostatic and cytotoxic effect of adriamycin, we analyzed controls vs adriamycin-treated PC-3 cells by flow cytometry using the double staining method (PI and Hoechst 33342), as was described in the Methods section [% of PC-3 cells in G1/G0; %S; %G2/M phase of the cell cycle and % of <G1= DNA fragmentation (28)]. The phase distribution of the PC-3 cells in the cell cycle did not differ significantly among controls cultured with either 0.5% and 5.0% CS after 6, 24 and 48 hr [G1/G0 (58%±3%), S (32%±2.5%) and G2/M (10%±1.5%)]. In addition, a few apoptotic PC-3 cells [<G1 = 0.5-1%] were detected by flow cytometry in control cultures under these experimental conditions (Table I).

TABLE I: Apoptosis (<G1; % of Total Cell Number) and Phase Distribution (%) of PC-3 Cells into the Cell Cycle (X±SD) in Adriamycin-Free cultures

	0.5% CS				5% CS			
	<G1	: G1/G0	S	G2/M	<G1	: G1/G0	S	G2/M
6 hr	1.0±0.5	: 57.0±0.5	34.0±1.0	9.0±0.5	1.0±0.5	: 56.0±1.0	34.0±1.0	10.0±1.0
24 hr	0.5±0.1	: 56.0±1.0	32.0±0.1	12.0±1.0	1.0±0.5	: 55.0±2.0	35.0±0.5	10.0±1.5
48 hr	1.0±0.5	: 62.0±1.0	29.0±1.0	9.0±1.0	1.0±0.2	: 60.0±2.0	32.0±1.0	8.0±2.0

The PC-3 cells were cultured in DMEM/F-12 supplemented with 5.0% CS.

TABLE II: Apoptosis (<G1; % of Total Cell Number) and Phase Distribution (%) of PC-3 Cells into the Cell Cycle (X±SD) in Adriamycin-treated cultures

	Adriamycin (100 nM)				Adriamycin (5 µM)			
	<G1	: G1/G0	S	G2/M	<G1	: G1/G0	S	G2/M
6 hr	1.0±0.5	: 50.0±0.5	37.0±1.0	13.0±0.5	1.0±0.5	: 50.0±1.0	40.0±2.0	10.0±0.5
24 hr	2.0±0.5	: 3.0±0.5	17.0±0.1	80.0±1.0	22.0±3.0	: 46.0±2.0	44.0±0.5	10.0±0.5
48 hr	36.0±2.0	: 2.0±0.1	8.0±1.0	90.0±4.0	70.0±5.0	: 54.0±2.0	38.0±4.0	8.0±3.0

The PC-3 cells were cultured in DMEM/F-12 supplemented with 5.0% CS.

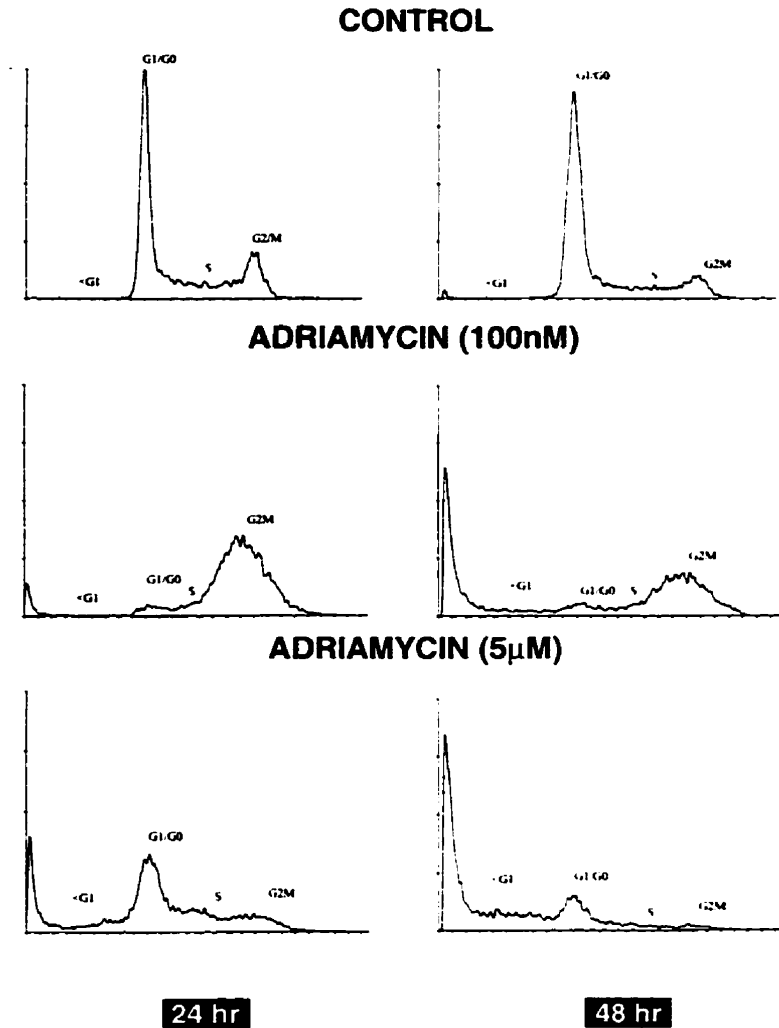


Figure 3: An example of the changes in distribution of PC-3 in the cell cycle produced by adriamycin as documented by flow cytometry (details in the Methods section); adriamycin-free cultures (upper panel) vs 100 nM adriamycin (middle panel) and 5 μ M adriamycin (lower panel). The 24 and 48 hr exposure to 100 nM of adriamycin practically blocked PC-3 cells at G2/M phase in the cell cycle and produced apoptosis. Both of the effects were more evident after 48 hr exposure. Five (5) μ M adriamycin induced apoptosis of PC-3 cells without arresting the surviving PC-3 cells at G2/M phase in the cell cycle.

However, exposure to adriamycin produced a time-dependent (6, 24 and 48 hr) and dose-dependent (100 nM and 5 μ M) increase in the number of PC-3 cells detected at apoptosis by flow cytometry (Table II, and Fig. 3). Indeed, PC-3 cells exposed to 100 nM of adriamycin for 6 hr shown little changes related to the phase distribution of the PC-3 cells in the cell cycle and no evidence of apoptosis, as compared with that of controls (Table I and II). Twenty four hours exposure to 100 nM of adriamycin produced an arrest of PC-3 cells [80%] at the G2/M phase in the cell cycle (% of those cells in the cell cycle) without to induce apoptosis (Table II and Fig. 3). The 48 hrs exposure of PC-3 cells to 100 nM of adriamycin produced an arrest of the PC-3 cells at G2/M phase [90%] in the cell cycle and clear evidence of apoptosis [$<G1=36%$ of the total PC-3 cells]. The phases G1/G0 [2%] and S [8%] in the cell cycle were practically deserted of PC-3 cells after 48 hr treatment with 100 nM of adriamycin (Table I and Fig. 3). Most of the PC-3 cells exposed to 5 μ M of adriamycin for 48 hr underwent apoptosis [at 24 hr= 22% and at 48 hr= 70%]; the remaining few PC-3 cells in the cell cycle were mainly distributed at the G1/G0 [46-54%] and S [38-44%] phase; the G2/M phase contained few PC-3 cells [8-10%] (Table II and Fig. 3).

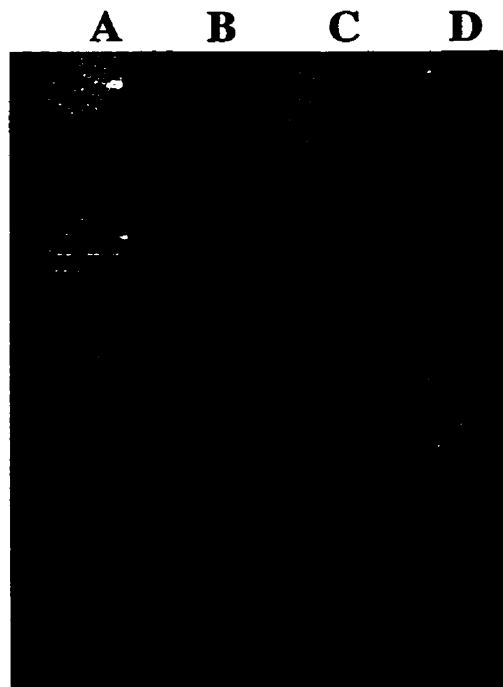


Figure 4: Adriamycin-apoptosis as assessed on simple agarose gel. The PC-3 cells were maintained in DMEM/F-12 media supplemented with 5% CS in adriamycin-free cultures (lane B) or exposed to 100 nM (lane C) and 5 μ M (lane D) of adriamycin for 48 hr; DNA was extracted and analyzed as described in the Methods section of this manuscript. Ladders of 100bp were used as DNA makers (lane A). The presence of ~180 bp DNA ladders (DNA fragmentation) marks the apoptotic death, *in vitro*.

The adriamycin-apoptosis of PC-3 cells was confirmed also by the analysis of DNA fragmentation on simple agarose gel detecting the classical DNA ladders which accompany programmed cell death “ apoptosis ”, in vivo (Fig. 4).

The effects of MG-63 CM, IGF I, TGFβ1 on the growth of PC-3 cells and adriamycin-cytotoxicity. Increasing doses of MG-63 CM stimulated the growth of PC-3 cells in a dose-dependent manner. Fifty μg/ml (final protein concentration) produced maximum stimulation in the growth of PC-3 cells (30% above controls). In addition, optimal doses of IGF-I (50 ng/ml) increased (35% above controls) and of TGFβ1 (25 ng/ml) decreased (25% below controls) the DNA content of PC-3 cells (data not shown). These data were in concert with previous studies assessing the role of osteoblast-related growth factors and osteoblast-CM in PC-3 cells (18,19). The optimal doses of MG-63 CM (50μg/ml), IGF I (50ng/ml) and TGFβ1 (25 ng/ml) partially reversed the adriamycin-cytotoxicity (100 nM and 5 μM) of PC-3 cells after 48 hr exposure (Fig. 2). The combination of MG-63 CM with IGF I and TGFβ1 was maximally effective of protecting PC-3 cells, thereby suggesting that MG-63 CM, IGF I, and TGFβ1 act possibly via distinct molecular pathways to protect PC-3 cells from adriamycin-cytotoxicity. In addition, the optimal doses of MG-63 CM, IGF I, and TGFβ1 decreased by 24.0±4% the distribution of PC-3 cells at <G1 phase and all together by 35±5% (X±SE; p<0.01) the adriamycin (100nM)-apoptosis of PC-3 cells as detected by flow cytometry.

3. osteoblast-mediated protection of PC-3 cells from adriamycin-apoptosis in 3-D system. MG-63 cells exposed to 100 nM of adriamycin for 48 hr were also arrested at G2/M phase in the cell cycle [**G1/G0 phase**; controls = 66.0 ± 5.0 and adriamycin-treated = 31.0 ± 2.0; **S phase**; controls = 27.0 ± 3.0 and adriamycin-treated = 26.5 ± 1.0; **G2/M phase**; controls = 7.0 ± 2.0 and adriamycin-treated = 42.5 ± 2.0; % of MG-63 cells; X±SE; p<0.001]. MG-63 cells were apparently resistant to adriamycin (100 nM)-apoptosis in monolayer cultures, as assessed by flow cytometry [**<G1**; controls = 1.0 ± 1.0 and adriamycin-treated = 2.0 ± 1.5; X±SE]. Furthermore, MG-63 cells were found to be also resistant to adriamycin (100 nM)-apoptosis in 3-D system as assessed by the TUNEL assay (Fig. 5, lower panel; A).

Three dimensional type I collagen system well-maintained the growth of MG-63 and PC-3 cells as described previously (25,26). In contrast, exposure to 100 nM of adriamycin for 48 hr resulted in a decreased number of PC-3 cells and some contained clear morphological evidence

of apoptosis (Fig. 5; Upper panel; A vs B). In addition, exogenous IGF I (50 ng/ml) partially neutralized the adriamycin-cytotoxicity of PC-3 cells in this 3-D system (Fig. 5; Upper panel; B vs C). It is noteworthy that despite the exposure to 100 nM of adriamycin for 48 hr the number of PC-3 cells grown in the 3-D systems which contained MG-63 cells was increased by 40-50% as compared with that of PC-3 cells grown in 3-D system containing no MG-63 cells (Fig. 5; Upper panel; B vs D). These data suggested that the early establishment of local cell-cell interactions between the MG-63 and PC-3 cells in the 3-D system has rescued PC-3 cells from adriamycin-cytostasis/apoptosis and promoted an adriamycin-resistant growth of the PC-3 cells.

In addition, homogeneous dispersion of the MG-63 and PC-3 cells in the 3-D system completely rescued PC-3 cells from the adriamycin-apoptosis as detected by TUNEL assay (Fig. 5; Lower panel). Therefore, the MG-63 cells (a) were resistant to adriamycin (100 nM)-apoptosis, and (b) rescued the PC-3 cells from adriamycin-apoptosis. Conceivably, MG-63 osteoblast-like osteosarcoma cells secrete "survival factors" that can optimize the survival of PC-3 cells, *in vitro*.

Figure 5 (next page):

Upper panel: An example of the morphological analysis of PC-3 cells grown in the collagen gel system using the classic trichrome-Masson technique (type I collagen gel system/3-D system; for details see the Methods section). The panel A presents the number of PC-3 cells grown in adriamycin-free 3-D systems containing no MG-63 cells. Exposure to 100 nM of adriamycin for 48 hr resulted in a decreased number of PC-3 cells and morphological evidence of advanced-stage apoptosis (panel B; arrows indicate PC-3 cells undergoing fragmentation). In the panel C, 50 ng/ml of exogenous IGF I partly neutralized the adriamycin-cytotoxicity of PC-3 cells (panel C vs panel B). Despite adriamycin therapy, coculture of MG-63/PC-3 cells in 3-D system rescued PC-3 cells from adriamycin-cytotoxicity and resulted in an increased number of PC-3 cells grown in this system (panel D; short arrow shows the PC-3 cells and long arrows shows the MG-63 cells; number of PC-3 cells was compared with that of panel B and A). It is noteworthy that equal number of cells/ml of collagen gel was grown in all 3-D systems, suggesting accelerated PC-3 cell growth in 3-D systems that contained mixture of MG-63 and PC-3 cells (magnification x400).

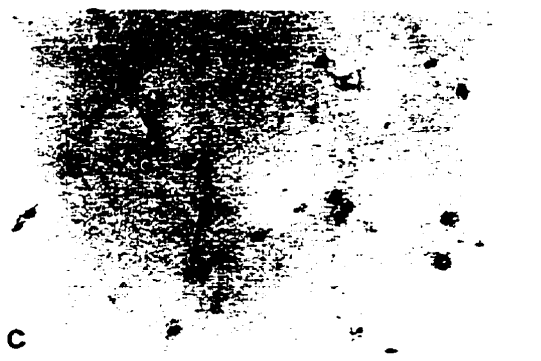
Lower panel: An example of the adriamycin-apoptosis in PC-3 and MG-63 cells grown in type I collagen gel system as documented by TUNEL assay (for details see the Methods section). MG-63 cells exposed to 100 nM of adriamycin for 48 hr did not present evidence of adriamycin-apoptosis (panel A). Under identical experimental conditions 30% to 50% of the PC-3 cells underwent adriamycin-apoptosis (panel B). Coculture of MG-63 and PC-3 cells rescued PC-3 cells from adriamycin-apoptosis (panel C). Panel D is the negative control of TUNEL assay (magnification x500).



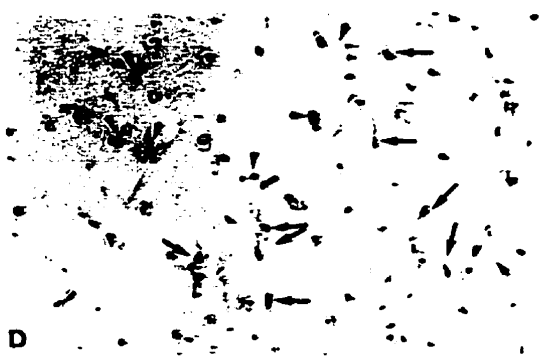
A



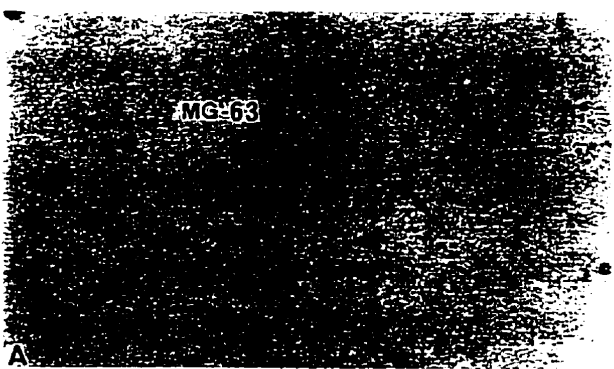
B



C



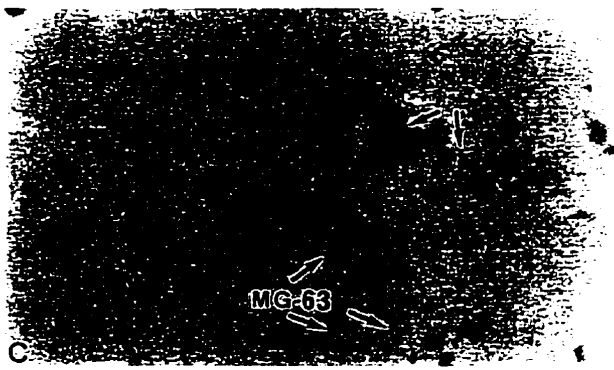
D



A



B



C



D

COMMENTS

Although hormone depletion therapy produces a remarkable and long-standing remission of the primary tumor and soft tissue metastases such as lung metastases (20,21,29,30) it cannot control prostate cancer biology in bone metastases (2,4,5,20,21). The presence of bone lesions and more accurately the number of metastatic foci in skeleton (>3 foci) is strongly associated with (a) early disease progression to stage D3 while stage D2 patients, and (b) the development of cytotoxic drug-resistant tumor growth (4,5,16,17,20,21). Furthermore, the number of bone lesions is the most important prognostic factor that defines poor survival in advanced prostate cancer (4,20,21).

The exact mechanism implicated in disease progression to stage D3 and development of cytotoxic drug-resistant tumor growth is poorly understood. Recently, structural and/or functional alterations in androgen receptor (AR) were documented to occur in prostate cancer biopsies (31,32). Functional analysis of mutated ARs revealed the presence of AR with broaden ligand-specificity, thereby suggesting that disease progression is possibly mediated by the activation of mutated AR by other steroid hormones even antiandrogens (33). These data has offered an explanation to the so called antiandrogen/flutamide withdrawal syndrome observed in stage D3 prostate cancer patients (33,34).

Eventhough mutated AR is obviously participating in the hormone refractory-tumor growth (16,17) this cannot be a sufficient explanation for the development of cytotoxic drug-resistant tumor growth (2,5). Conceivably, other molecular events participate also in the progression to stage D3 prostate cancer (4,5). In this context, the Baltimore group made important advances and described genetic alterations in prostate cancer. These molecular events include the allelic loss of chromosomes 5q, 8p, 10q, 11p, 13q, 16q, 17p, and 18q (5 and refs therein). Conceivably, specific tumor suppressor genes localized in the lost part of these chromosomes can be linked with an altered biology of metastatic prostate cancer cells.

Herein we examined metastatic growth from another end, assessing the role of human osteoblast-like cells and osteoblast-related growth factors in the development of chemotherapy-resistant prostate tumor growth, *in vitro*. The pharmacological dose (100 nM) of adriamycin produced apoptosis following an arrest of the PC-3 cells at G2/M phase in the cell cycle. This suggested that adriamycin (100 nM) exerted both a cytostatic and cytotoxic action on the p53-negative and androgen-insensitive PC-3 human prostate cancer cells (35-37). Similar data was

previously reported by cisplatin, camptothecin, teniposide, etoposide, vincristine, lovastatin, and fluorinated pyrimidines assessing apoptosis of PC-3 cells (38).

It is noteworthy that suprapharmacological dose (5 μM) of adriamycin resulted in apoptosis of almost all PC-3 cells but it did not produce an arrest of the PC-3 cells at G2/M phase in the cell cycle. Apparently, adriamycin can exert a dose-dependent cytotoxic/cytostatic effects which can implicate different molecular mechanisms. Indeed, it is known that relatively low concentrations (50 up to 500 nM) of adriamycin interferes with DNA unwinding (39), 1 μM of adriamycin inhibits topoisomerase II (40), and suprapharmacological concentrations (5 up to 10 μM) of adriamycin produce non-protein associated DNA-strand breaks suggestive of free-radical mediated apoptosis (41). Furthermore, chronic exposure to relatively low concentrations (50-100 nM) that is typically sustained in the peripheral blood for up to 12 hr following i.v. administration of adriamycin in cancer patients, it appears to engage a unique growth/cell arrest death pathway involving damage to nascent DNA, endoreduplication of DNA, and differentiation-induction associated with gradual reduction of expression of the *c-myc* oncogene in MCF-7 breast cancer cells (42).

Under our experimental conditions, adriamycin (100 nM for 48 hr) did not produce apoptosis of MG-63 osteoblast-like human osteosarcoma cells but effectively blocked MG-63 cells at G2/M phase in the cell cycle. Adriamycin produced apoptosis of MG-63 cells only at suprapharmacological doses ranging from 5 to 10 μM (data not shown). Therefore, MG-63 osteoblast-like cells were relatively resistant to adriamycin (100 nM)-apoptosis. Furthermore, the adriamycin-cytotoxicity of PC-3 cells was partially neutralized by the presence of MG-63 CM and exogenous osteoblast-related growth factors, such as IGF I and TGF β 1. Apparently, osteoblast-related growth factors rescued PC-3 prostate cancer cells from adriamycin-apoptosis in the 3-D system. This resulted in an adriamycin-resistant PC-3 cell growth in the 3-D system containing MG-63 osteoblast-like osteosarcoma cells.

The importance of the stroma-tumor cell interactions in this 3-D system were previously documented regarding the development of the (a) morphologic evidence of osteoplasia around the MG-63 cells in response to the local growth of PC-3 cells (25), (b) morphological evidence of osteolysis in response to local growth of MCF-7 and ZR-75 breast cancer cells (26), as well as expression of angiogenic potential of PC-3 prostate cancer cells, *in vitro* (43).

Recently, endogenous interleukin 6 was found also to be a resistance factor for etoposide-mediated cytotoxicity of PC-3 and DU145 prostate cancer cells (44) and IGF I was a survival

factor of PC12 cells apoptosis (45). Furthermore, the IGF I inhibition of the apoptosis of PC12 cells was associated with an increased expression of the *bcl-xL* gene product suggesting that growth factors, such as IGF I can regulate apoptosis-related genes, thereby modulating apoptosis (45). Furthermore, particular checkpoints were detected in apoptosis-molecular pathways which can meet with the growth factor-signal transduction pathways (46,57). These checkpoints have implicated serine phosphorylation-elimination of a death agonist *Bad* gene product as part of the response to survival factors (48). Whether, similar mechanism is associated with the action of the osteoblast-survival factors is currently under investigation in our laboratory.

CONCLUSIONS

Osteoblast-derived growth factors can optimize the survival of PC-3 prostate cancer cells producing cytotoxic drug-resistant tumor growth, *in vitro*. Conceivably, therapeutic targeting of bone-derived “survival factors” can improve efficiency and efficacy of hormone and cytotoxic drug chemotherapy in patients with advanced prostate cancer.

Acknowledgments

Michael Koutsilieris is a scholar from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec-FRSQ” and Carlos Reyes-Moreno holds a student Award from the FRSQ-FCAR-Santé. The authors thank Mr. Maurice Dufour for excellent technical assistance in flow cytometry and the Departments of Obstetrics-Gynecology Research Center for continuing support of this research.

REFERENCES

1. Boring CC, Squires TS, and Tong T: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 43: 7-26, 1993.
2. Koutsilieris M: Osteoblastic metastasis in advanced prostate cancer. *Anticancer Res* 13: 443-450, 1993.
3. Galasco CSB: Mechanisms of lytic and blastic metastatic disease of bone. *Clin Orthopaed Rel Res* 12: 20-27, 1982.
4. Koutsilieris M: Skeletal metastasis in advanced prostate cancer: cell biology and therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 18: 51-64, 1995.
5. Koutsilieris M, Dimopoulos MA, Doillon C, Sourla A, Reyes-Moreno C, and Choki I: The molecular concept of prostate cancer. *Cancer J* 9: 89-94, 1996.
6. Koutsilieris M, and Polychronakos C: Proteolytic activity against IGF-binding proteins involved in paracrine interactions prostate adenocarcinoma cells and osteoblasts. *Anticancer Res* 12: 905-910, 1992.
7. Koutsilieris M, Frenette G, Lazure C, Lehoux JG, Govindan MV, and Polychronakos C: Urokinase-type plasminogen activator: a paracrine factor regulating the bioavailability of IGFs in PA-III cell-induced osteoblastic metastases. *Anticancer Res* 13: 481-486, 1993.
8. Koutsilieris M, Rabbani SA, and Goltzman D: Selective osteoblast mitogens can be extracted from prostatic tissue. *Prostate* 9: 109-115, 1993.
9. Koutsilieris M, Rabbani SA, and Goltzman D: Effects of human prostatic mitogens on rat bone cells and fibroblasts. *J Endocr* 115: 447-454, 1987.
10. Koutsilieris M, Rabbani SA, Bennett HPJ, and Goltzman D: Characteristics of prostate-derived growth factors cells of the osteoblast phenotype. *J Clin Invest* 80: 941-946, 1987.
11. Labrie F: Endocrine therapy of prostate cancer: optimal form and timing. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1066-1071, 1995.
12. Kozlowski JM, Ellis WJ, and Grayhack JT: Advanced prostatic carcinoma: early vs late endocrine therapy, in G.L. Andriole and W. J. Catalona editors. Philadelphia, The Urologic Clinics of North America, 1991, pp 15-24.
13. Mertens WC, Stitt L, and Porter AT: Strodium 89 therapy and relief of pain in patients with prostatic carcinoma metastatic to bone: a dose response relationship. *Am J Clin Oncol* 16: 238-242, 1993.
14. Kyprianou N., Bains AK, and Jacobs SC: Induction of apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cells undergoing thymineless death. *Prostate* 25: 66-75, 1994.

15. Furuya Y, and Isaacs JT: Proliferation-dependent vs. independent programmed cell death of prostatic cancer cells involves distinct gene regulation. *Prostate* 25: 301-309, 1994.
16. Landström M., Damber J-E, and Bergh A: Prostatic tumor regrowth after initially successful castration therapy may be related to a decreased cell death rate. *Cancer Res* 54: 4281-4284, 1994.
17. McConkey DJ, Greene G, and Pettaway CA: Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res* 56: 5594-5599, 1996.
18. Reyes-Moreno C., Frenette G, Boulanger J, Lavergne E, Govindan MV, and Koutsilieris M: Mediation of glucocorticoid receptor function by transforming growth factor beta 1 expression in human PC-3 prostate cancer cells. *Prostate* 26: 260-269, 1995.
19. Reyes-Moreno C., and Koutsilieris M: Glucocorticoid receptor function possibly modulates cell-cell interactions in osteoblastic metastases on rat skeleton. *Clin Exp Met* 15: 205-217, 1997.
20. Koutsilieris M., Faure N, Laroche B, Tolis G, Roberts G, and Ackman CFD: Objective response and disease outcome in 59 patients with stage D2 prostatic carcinoma treated with either Buserelin or orchiectomy: disease aggressivity and its association with response and outcome. *Urology* 27: 221-227, 1986.
21. Koutsilieris M., Laroche B, Thabet M, and Fradet Y: The assessment of disease aggressivity in stage D2 prostate cancer patients. *Anticancer Res* 10: 333-336, 1990.
22. Kaighn ME, Shankar NK, Ohnuki Y, Lechner JF, and Jones LW: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell lines (PC-3). *Invest Urol* 17: 16-23, 1979.
23. Tilley WD, Wilson CM, Marcelli M, and McPhaul MJ: Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* 50: 5382-5386, 1990.
24. Boulanger J, Reyes-Moreno C, and Koutsilieris M: Mediation of the glucocorticoid receptor (GR) function by the activation of latent transforming growth factor beta 1 in MG-63 osteoblasts-like osteosarcoma cells. *Int J Cancer* 62: 692-697, 1995.
25. Koutsilieris M, Sourla A, Pelletier G, and Doillon C: Three-dimensional type I collagen gel system for the study of osteoblastic metastases produced by metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res* 9: 1823-1832, 1994.
26. Sourla A., Doillon C, and Koutsilieris M: Three-dimensional type I collagen gel system containing MG-63 osteoblasts-like cells as a model for studying local bone reaction caused by metastatic cancer cells. *Anticancer Res* 16: 2773-2780, 1996.
27. Kyprianou N, and Isaacs JT: "Thymineless" death in androgen independent prostatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 73-81, 1989.

28. Darzynkiewics Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, and Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808, 1992.
29. Koutsilieris M, and Ackman CFD: Complete response of lung metastases caused by prostatic cancer after chronic administration of a gonadotropin-releasing hormone agonistic analogue, buserelin (HOE 766). *Prostate* 10: 19-24, 1987.
30. Behrakis P, and Koutsilieris M: Pulmonary metastases in prostate cancer: host tissue-tumor cell interactions and response to hormone therapy. *Anticancer Res* 17: 1517-1518, 1997.
31. Taplin M.-E, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, and Balk SP: Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332: 1393-1398, 1995.
32. Gottlieb B, Trifiro M, Lumbroso R, and Pinsky L: The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Res* 25: 158-162, 1997.
33. Suzuki H, Akakura K, Komiya A, Aida S, Akimoto S, and Shimazaki J: Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate* 29: 153-158, 1996.
34. Dupont A, Gomez J-L, Cusan L, Koutsilieris M, and Labrie F: Response to flutamide withdrawal in advanced prostate cancer in progression under combination therapy. *J Urol* 150: 908-913, 1993.
35. Rubin SJ, Hallahan DE, Ashman CR, Brachman DG, Beckett MA, Virudachalam S, Yandell DW, and Weichselbaum RR: Two prostate carcinoma cell lines demonstrate abnormalities in tumor suppressor genes. *J Surg Oncol* 46: 31-36, 1991.
36. Tilley WD, Bentel JM, Aspinall JO, Hall RE, and Horsfall DJ: Evidence for a novel mechanism of androgen resistance in the human prostate cancer cell line, PC-3. *Steroids* 60: 180-186, 1995.
37. Isaacs B., Carter BS, and Ewing CM: Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res* 51: 4716-4720, 1991.
38. Borner MM, Myers CE, Sartor O, Sei Y, Toko T, Trepel JB, and Schneider E: Drug-induced apoptosis is not necessarily dependent on macromolecule synthesis or proliferation in the p53 negative human prostate cancer cell line PC-3. *Cancer Res* 55: 2122-2128, 1995.
39. Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, and Gewirtz DA: Interference with DNA unwinding by doxorubicin in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol* 46: 649-656, 1994.
40. Goldenberg GJ, Wang H, and Blair GW: Resistance to adriamycin: relationship of cytotoxicity to drug uptake and DNA single- and double-strand breakage in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and resistant P388 leukemia. *Cancer Res* 46: 2978-2983, 1986.

41. Doroshow JH: Prevention of doxorubicin-induced killing of MCF-7 human breast cancer cells by oxygen radical scavengers and iron chelating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 330-335, 1986.

42. Fornari jr FA, Jarvis WD, Grant S, Orr MS, Randolph JK, White FKH, Mumaw VR, Lovings ET, Freeman RH, and Gewirtz DA: Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (nonoligosomal) DNA fragmentation and reduced c-myc expression in MCF-7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sublethal concentration of doxorubicin. *Cell Growth & Differ* 5: 723-733, 1994.

43. Janvier R, Sourla A, Koutsilieris M, and Doillon C: Stromal fibroblasts are required for PC-3 human prostate cancer cells to produce capillary-like formation of endothelial cells in a three-dimensional co-culture system. *Anticancer Res* 17: 1551-1558, 1997.

44. Borsellino N, Beldegrun A, and Bonavida B: Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* 55: 4633-4639, 1995.

45. Párrizas M, and Leroith D: Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-x_L gene product. *Endocrinology* 138: 1355-1358, 1997.

46. Oltvai ZN, and Korsmeyer SJ: Checkpoints of dueling dimmers foil death wishes. *Cell* 79: 189-192, 1996.

47. Gajewski TF, and Thompson CB: Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 86: 589-592, 1996.

48. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, and Korsmeyer SJ: 1996. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-xL. *Cell* 87: 619-628.

CHAPITRE II

L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES EST EFFECTUÉE VIA L'EXPRESSION DU FACTEUR TRANSFORMANT DE TYPE BETA 1 (TGF β 1) DANS LES CELLULES HUMAINES PC-3 DU CANCER DE LA PROSTATE

RÉSUMÉ

Nous avons déterminé le rôle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans le contrôle de la prolifération des cellules PC-3, une lignée humaine androgène-indépendante du cancer de la prostate, via l'action du facteur de croissance TGF β 1 (transforming growth factor beta 1). Le GR a été détecté dans les cellules PC-3 par une analyse de Western blot en utilisant un anticorps polyclonal de lapin contre le GR humain, développé à l'aide d'un peptide synthétique (hGR₃₈₃₋₃₉₃). Le GR présent dans les cellules PC-3 lie le dexaméthasone tritié (³H-DEXA) avec une affinité similaire au GR de type sauvage. De plus, le complexe activé GR-hormone se lie à l'ADN radioactif, tel que détecté par un essai de retardement sur gel (band shift assay), et active la transcription du gène chimérique MMTV-tk-CAT (*mouse mammary tumor virus-thymidine kinase-chloramphenicol acetyltransferase*) transfecté de façon transitoire dans les cellules PC-3. DEXA (0.1 à 100 nM) et TGF β 1 (0.5 à 50 ng/mL) inhibent la prolifération des cellules PC-3 et augmentent leur distribution dans les phases G₁/G₀ du cycle cellulaire. Le PDGF (*platelet-derived growth factor*) stimule la prolifération des cellules PC-3 et renverse les effets inhibiteurs de DEXA. L'inhibition obtenue avec DEXA (100 nM) a été complètement neutralisée avec l'antagoniste RU486 (1 μ M) et partiellement neutralisée par un anticorps polyclonal contre le TGF β 1. De plus, DEXA augmente l'expression de l'ARNm de TGF β 1 dans les cellules PC-3. Puisque l'inhibition exercée par DEXA a été neutralisée partiellement à l'aide d'un anticorps contre le TGF β 1 et que DEXA augmente l'expression de l'ARNm de TGF β 1, nous pouvons avancer que l'activité biologique du GR dans les cellules PC-3 est au moins en partie effectuée *via* l'expression de TGF β 1.

**MEDIATION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR FUNCTION BY
TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 EXPRESSION IN HUMAN PC-3
PROSTATE CANCER CELLS**

**Carlos Reyes-Moreno, Gilles Frenette, Jocelyn Boulanger, Eliane Lavergne, Manjapra V.
Govindan, and Michael Koutsilieris**

Molecular Endocrinology, Research Center, C.H.U.L, Laval University, St. Foy, Quebec,
Canada

Running title: Glucocorticoid receptor function in PC-3 cells

Key words: glucocorticoid receptor, transforming growth factor β 1,
platelet growth factor, PC-3 prostate cancer cells.

Article publié dans *The Prostate* 26:260-269, 1995

ABSTRACT

We investigated the role of glucocorticoids in controlling the proliferation of androgen-independent PC-3 human prostate cancer cells via the action of transforming growth factor beta 1 (TGF β 1). The presence of glucocorticoid receptor (GR) in PC-3 cells was detected by immunoblotting analysis using a rabbit anti-GR polyclonal antibody against the synthetic human GR peptide (hGR383-393). In PC-3 cells, GR bound radiolabeled dexamethasone with an affinity similar to wild-type GR. In addition, GR-ligand complex bound radiolabeled DNA as detected by DNA band-shift analysis on gel electrophoresis and *trans*-activated the mouse mammary tumor virus-thymidine kinase-chloramphenicol acetyltransferase chimeric gene in transiently transfected PC-3 cells. Dexamethasone (0.1 up to 100 nM) and TGF β 1 (0.5 up to 50 ng/ml) inhibited PC-3 cell proliferation. TGF β 1 and dexamethasone both increased the distribution of PC-3 cells into the G₁/G₀ phase of the cell cycle. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulated the proliferation of PC-3 cells and overcame dexamethasone's inhibition of PC-3 cell growth. Dexamethasone's inhibition (10^{-7} M) of PC-3 cell growth was completely neutralized by RU 486 (10^{-6} M) and partly neutralized by anti-TGF β 1 polyclonal antibody. Furthermore, dexamethasone up modulated the expression of TGF β 1 mRNA in PC-3 cells. Because dexamethasone's inhibition was neutralized at least in part by an anti-TGF β 1 polyclonal antibody and dexamethasone up modulated the expression of TGF β 1 mRNA in PC-3 cells, we conclude that GR function in human PC-3 prostate cancer cells is mediated at least in part by TGF β 1 expression.

INTRODUCTION

Although glucocorticoids inhibit both *in vivo* and *in vitro* the growth of certain normal and transformed cell lines, little is known about the mechanism of this cellular response (1, 2). Glucocorticoid receptor (GR) is a *trans*-acting protein whose action depends on the particular DNA recognition sequence (glucocorticoid responsive element; GRE) within the upstream regulatory region of GR-regulated genes (3). In the prostate gland, cortisol reverses or retards certain molecular processes associated with programmed cell death and maintains the expression of prostate steroid-binding protein in castrated rats (4, 5). Furthermore, androgens antagonize the suppressive effects of glucocorticoids on lymphocyte proliferation (6). These data indicate that GR may use the same steroid response element for these particular molecular events (4, 7). *In vitro* glucocorticoid either inhibits or enhances the androgen-induced proliferation of androgen-dependent cell lines (8-10), and dexamethasone inhibits the proliferation of androgen-independent prostate cancer cells, such as the rat PA-III cells (11).

GR function was shown also to depend on protein-protein interactions, such as with the jun/fos transcription complex (12). Glucocorticoids reversibly blocked the cell cycle at the early G₁ phase, that occurred in a coordinate fashion with modulation of the expression of c-jun transcripts in hepatoma cells (13). In addition, other studies have associated glucocorticoid's action on cell growth with its ability to modulate the expression of autocrine factors, such as transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) and platelet-derived growth factor (PDGF) (14,15).

The PC-3 prostate cancer cell line lacks androgen receptor (AR) specific binding sites and expression of AR mRNA as detected by Northern analysis and S₁ nuclease protection (16). Therefore, we studied the presence and functional status of GR in human PC-3 metastatic prostate cancer cells and tested its function in regulating the proliferation of PC-3 cells via TGF β 1 expression.

Our results documented the presence of functional intact GR in PC-3 cells. Increasing concentrations of dexamethasone activated endogenous GR to stimulate transcription activation of mouse mammary tumor-thymidine kinase-chloramphenicol

acetyltransferase (MMTV-CAT) reporter gene in transiently transfected PC-3 cells. In addition, dexamethasone arrested cell progression at the G₁/G₀ phase of the cell cycle.

We conclude that GR function in PC-3 cells is mediated at least in part by TGF β 1 for the following reasons: (a) both dexamethasone and TGF β 1 inhibited PC-3 proliferation; (b) anti-TGF β 1 polyclonal antibody in part blocked dexamethasone inhibition; (c) PDGF stimulated the proliferation of PC-3 cells and neutralized dexamethasone's inhibition of PC-3 cells; and (d) dexamethasone up modulated the expression of TGF β 1 mRNA in PC-3 cells. In addition, we postulate that interactions of GR function with autocrine factors such as PDGF and TGF β 1 may regulate growth and metastatic potential of human prostate cancer cells as exemplified by PC-3 cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture systems: The PC-3 and CV-1 cell lines were from the American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD). CV-1 cells known to contain no steroid receptors were used as negative controls in the DNA band-shift experiments. Cells were grown in 75-cm² culture flasks using Dulbecco's modified Eagle medium-F12 (DMEM-F12, GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) containing 0 to 10% bovine serum (BS). Cells were plated at a cell density of 5×10^4 cells per well in 24-well plates and grown with DMEM-F12 medium containing various concentrations of BS, depending on the experiment. Mitogenic activity was assessed by the uptake of tritiated-thymidine incorporation and DNA content (11). Indices of cell cycle were measured by flow cytometry analyzing DNA content in propidium iodine-stained cells using a counter EPICS 753 pulse cytometer (Coulter Counter, Hialeah, FL) (13) thus assessing the distribution of PC-3 cells into cell-cycle phases. We used a specific anti-TGF β 1 polyclonal antibody (R&D Systems, Montreal, Canada) at final dilution of 10 μ g/ml and PDGF (Sigma, St. Louis, MO; 1-25 ng/ml) to reverse the effects of dexamethasone and TGF β 1 on the proliferation of PC-3 cells.

Isolation of mRNA and Northern blot analysis: The PC-3 cells were homogenized in 4 M guanidine thiocyanate (Fisher Scientific) containing 25 mM sodium citrate, 0.5% lauryl sarcosine, and 0.1 M 2-mercaptoethanol. The homogenate was extracted with phenol/chloroform, and RNA was precipitated in 80% ethanol as described previously (11). The RNA content was estimated by spectrophotometry at 260 and 280 nm. Ten (10) μg of poly-A mRNA was isolated by oligo-dT cellulose chromatography, electrophoresed into 1.2% agarose denaturing gel, and transferred to Hybond N (Amersham, Arlington Heights, IL). Membranes were prehybridized and hybridized as described previously (11). Blots were probed with ^{32}P -labeled human TGF β 1 and GAPDH cDNA. Human GAPDH and TGF β 1 cDNAs were obtained from ATCC. Autoradiograms were exposed to Kodak X-Omat RP films with Cronax lightning screens (Dupont, Lachine, Quebec, Canada). The intensity of the bands in the films was determined by LKB 2222-020 Ultrascan XL laser densitometer (Pharmacia, Baie d'Urfe, Qc, Canada). Formamide was from BRL and ^{32}P -labeled nucleotides were from Amersham. All other chemicals were of analytical grade. The constitutive expression of GAPDH mRNA was used to evaluate the expression of TGF β 1 mRNA in PC-3 cells.

Transient transfection and assays determining CAT activity: The ability of endogenous GR to activate gene transcription in PC-3 cells was studied employing the well-established glucocorticoid responsive MMTV-CAT chimeric gene in the presence of the β -galactosidase expression vector CH 110 (17). Transfected cells were treated with dexamethasone and the levels of CAT activity were used to determine the relative transcription activation of MMTV-CAT gene by endogenous GR (18). The PC-3 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% charcoal-dextran-treated fetal calf serum, gentamycin (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and fungizone (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Then the cells were plated in 100-mm dishes with 4 ml of DMEM supplemented with charcoal-treated fetal calf serum (10%) at a density of 6×10^5 cells/plate. After overnight incubation of the cells in a humidified 5% CO_2 incubator, 5 ml of fresh medium was added 2 h before transfection. Cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation technique (17) with 10 μg of each reporter plasmid MMTV-CAT and with 5 μg of β -galactosidase expression vector CH-110 (Pharmacia) using 960 μl of the precipitate. Plasmids were purified on a *Cscl* gradient, and transfected cells were treated with various concentrations of dexamethasone (Sigma), RU 486 (Roussel, France), and R1881(Sigma). The precipitate remained in

contact with the cells for 12 to 16 h. After exposure to calcium phosphate, precipitate cells were treated with 2 ml of 15% glycerol in Hanks' balanced salt solution for 5 min, washed twice, fed with media containing hormones from 1,000 X stock solutions in ethanol and harvested after 24 h for CAT assays as described previously (17,18). Aliquots of cell extracts containing 10 u of β -galactosidase were used to determine CAT activity. Results were expressed as mean of triplicate experiments performed under identical conditions using supernatants from three different pools of PC-3 transfectants.

Hormone binding assay: PC-3 cells were grown in DMEM/F-12 medium containing DCC-CS, pH 7.4. Cells were collected by trypsinization, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) (20 mM phosphate, 0.9% NaCl, pH 7.4), and homogenized in ice-cold TED (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 1mM dithiothreitol. Extracts were prepared using a polytron PT-10 (11). The homogenates were centrifuged at 30,000 Xg at 4°C for 30 min, and 200 ul of cytosol was incubated for 12 to 18 h at 0 to 4°C with 1 to 20 nM of 3 H-dexamethasone in the presence and absence of excess unlabeled steroid. Incubation was stopped by adding 200 μ l of 5% charcoal (containing 1% bovine gamma globulin in TED and 0.5% dextran T-70) for 10 min at 4°C. The samples were centrifuged at 2,000 X g for 10 min at 4°C. Radioactivity was determined in 200 ul of the preparation mixed with 8 ml of scintillation liquid in scintillation vials and counted by a scintillation counter, counting efficiency of 50% as described previously (11).

Western blotting: Extracts of PC-3 cells were prepared by lysing PC-3 cells in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer and sonicating them twice for 30" at 4°C . Equal amounts of protein (150 mg) were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (19). Then proteins were transferred onto immobilon-P membranes using BLOTTO (5% wt/vol nonfat dry milk, 0.01% Antifoam A (Sigma) as described previously (19). Blots were reacted for 2 h with anti-GR antibody diluted 1:100 in BLOTTO and with the anti-GR antibody purified by GR-affinity column. Anti-GR antibody was raised in rabbits against synthetic human GR peptide (hGR383-393; NH₂-Phe-Pro-Gly-Arg-Thr-Val-Phe-Ser-Asn-Gly-Tyr-COOH; synthesis was done by Neosystem, Shanbow, France) coupled with bovine serum albumin (BSA). Antibodies were detected 3 months after injection. As the hGR peptide was coupled to BSA and PC-3 cells were grown in DMEM/F12 media

containing CS, Western blot analysis was performed in the presence and in absence of excess BSA. In addition, we performed this analysis using a preparation of this GR antibody prepurified on a GR affinity column. This enabled us to conclude that this polyclonal antibody was GR-specific. Blots were washed three times over a period of 1 h with TEN (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA and 140 mM NaCl), TEN + 0.05% TWEEN 20, and TEN alternately (19). Finally, filters were incubated with donkey anti-rabbit IgG (Amersham) conjugated with alkaline phosphatase in BLOTTO for 1 h. Filters were washed three times with TEN, TWEEN buffer and once with TEN. Enzymatic detection was made using BCIP/NBT substrate (19).

DNA-GR interaction: The DNA-protein binding assays were carried out by band-shift analysis on gel electrophoresis using cell extracts prepared from PC-3 and CV-1 cells treated with or without dexamethasone (100 nM for 30' and 24 h). The proteins bound to the radioactive DNA were separated by gel electrophoresis (20). CV-1 cells known to lack steroid hormone receptors were used as negative controls (20). Semiconfluent PC-3 and CV-1 cells, incubated for 30 min and 24 h with 100 nM of dexamethasone, were homogenized using the extraction buffer (0.6 M KCl, 20 mM Tris pH 7.5, 20% glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin), and centrifuged at 10,000g for 10'; 5 mg of whole cell extract was used. Synthetic oligonucleotide GRE-US^{5'} AGAACACAGTGTCT^{3'} and complementary lower strand were end labeled using (³²P) ATP and T4-polynucleotide kinase. The labeled oligonucleotides were annealed and purified by DNA-cellulose chromatography (20). Ten thousand (10,000) counts per min (cpm) of labeled-annealed oligonucleotides were used per binding assay in the presence of 50 mg/ml poly d(I) poly d(C) (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). The receptor-DNA complexes were separated on 4% polyacrylamide gel using TBE (22.5 mM Tris-Borate, 0.5 mM EDTA, pH 8) as electrophoresis buffer at room temperature. The gels were dried and autoradiographed by Kodak XAR-5 films using intensifying screens at -20°C.

Statistical analysis: Differences in group means were assessed for statistical significance using the one-tailed multiple comparison procedure of Dunnett only when treatments were compared with control values. When single comparisons were made, Student's *t* test was used.

RESULTS

1. Detection of GR in PC-3 cells. The presence of GR in PC-3 cells was detected by Western analysis using an anti-human GR polyclonal antibody (Fig. 1).

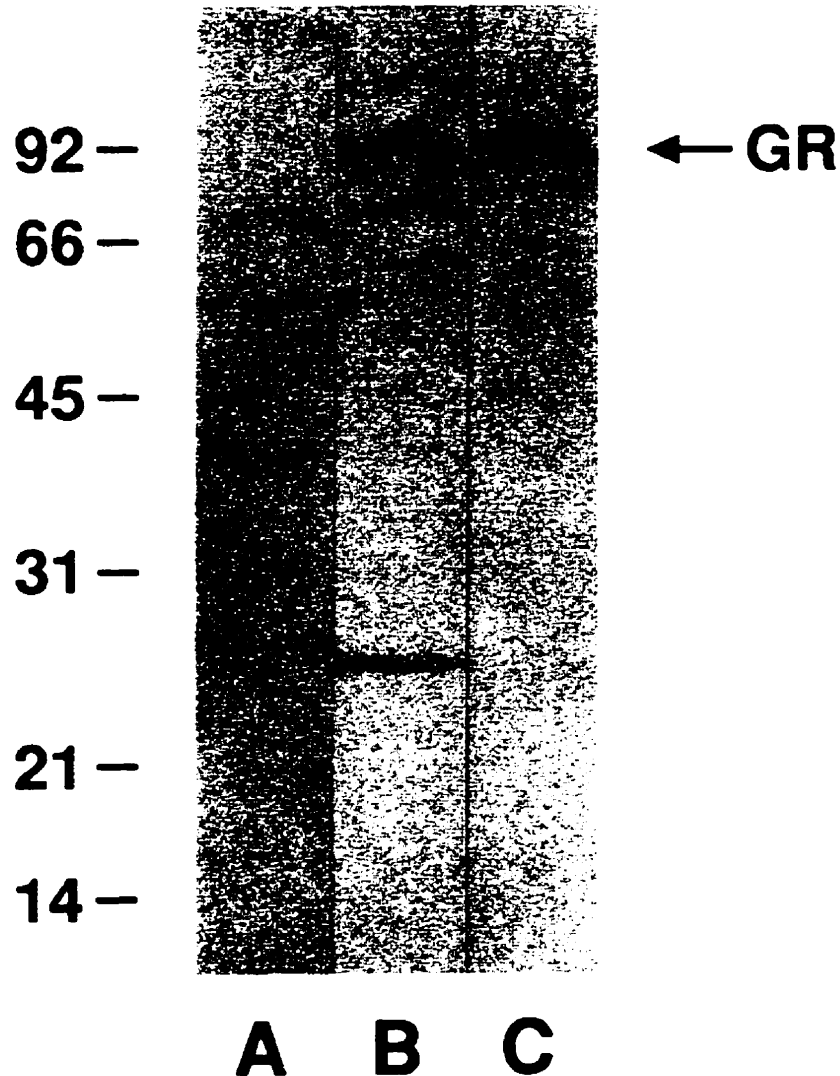


Fig. 1. Glucocorticoid receptor (GR) expression in PC-3 cells as detected by Western blot analysis. Lane A = analysis using preimmunized rabbit serum. Lane B = analysis using rabbit anti-GR polyclonal antibody blotted in excess of BSA, and lane C = Western blot analysis using this polyclonal anti-GR antibody after its purification on a GR affinity column; the affinity resin was made by coupling the peptide (hGR383-393) on a CNBr activated sepharose. Affinity column was equilibrated in PBS and the purified antibody was eluted with 0.1 N acetic acid neutralized by Tris 1M, pH 7.6.

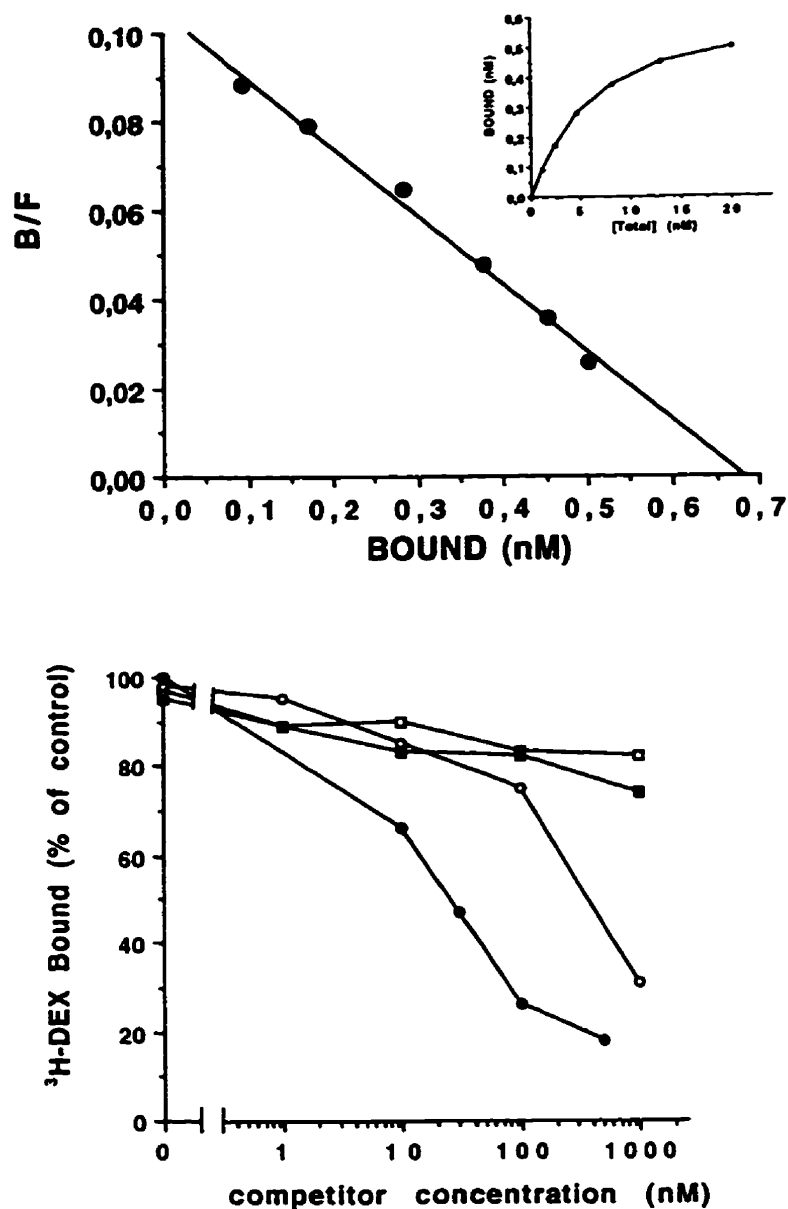


Fig. 2. Upper panel: saturation analysis and Scatchard analysis of glucocorticoid receptor (GR) in PC-3 cells. In this particular experiment the association constant was $0.15 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ and the number of the binding sites was 654 fmol per mg of protein. **Lower panel:** relative specificity of various steroid hormones such as dexamethasone (●), dihydrotestosterone;DHT (■), synthetic progesterone-R 5020 (○), and estradiol (□), with the tritiated-dexamethasone binding sites in PC-3 cell cytosols. Dextran-treated cytosols (DCC) of PC-3 cells were incubated with 10 nM tritiated-dexamethasone for 12 to 18 h at 4°C with or without increasing concentration of various unlabelled steroids.

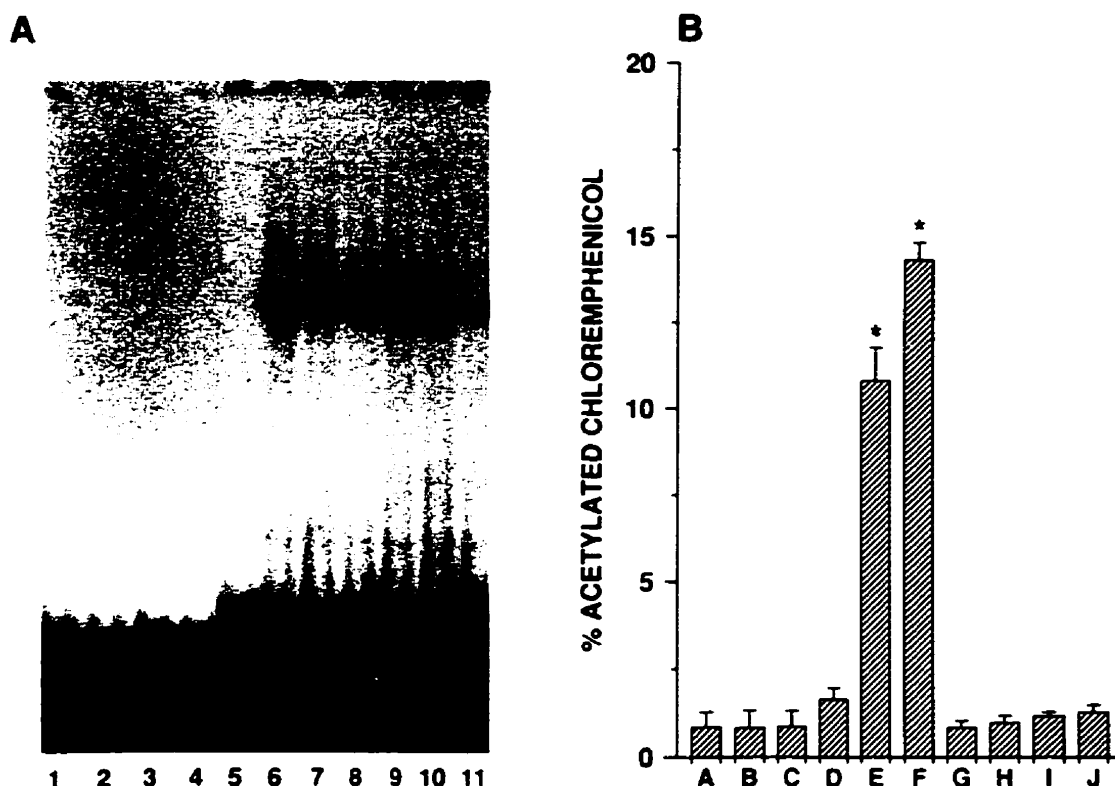


Fig. 3. Left panel: Glucocorticoid receptor (GR)-DNA binding analysis in CV-1 and PC-3 cells as determined by radiolabeled DNA band-shift analysis on gel electrophoresis. Note the absence of GR-DNA radiolabeled band in CV-1 cell extracts; lane 1 = CV-1 cells grown in DCC treated CS, lane 2 = CV-1 cells treated with 100 nM of dexamethasone for 30', lane 3 = CV-1 cells treated with 100 nM of dexamethasone for 30 min plus 10x excess of radioinert DNA, and lane 4 = CV-1 cells treated with 100 nM of dexamethasone plus 100x excess of radioinert DNA. CV-1 cells are known to contain no steroid receptors. Lane 5 presents another negative control experiment (band-shift analysis in absence of cell extract). In contrast, GR-DNA band-shifting was detected using PC-3 cell extracts incubated with 100 nM of dexamethasone for 30' (lane 6). This radiolabeled GR-DNA band density on gel was decreased in experiments using excess of radioinert DNA (lane 7 = 10x and lane 8 = 100x excess of radioinert DNA). We obtained similar results using extracts of PC-3 cells incubated with 100 nM of dexamethasone for 24 h; lane 9 = detection of DNA band-shifting that corresponded to GR-DNA binding; and decreased density of GR-DNA band with excess radioinert DNA (lane 10 = 10x and lane 11 = 100x excess of radioinert DNA). **Right panel:** Ability of endogenous GR to *trans*-activate MMTV-CAT chimeric gene in transiently transfected PC-3 cells in the presence of the β -galactosidase expression vector CH 110. lane A = CAT activity in control transfectans (PC-3 cells grown in medium containing DCC-treated CS). Lanes B and C = CAT activity in transfected cells incubated with increasing concentrations of R1881; lane B = 1 nM and lane C = 1 mM of R1881. Lanes D-F = transfectans treated with increasing concentration of dexamethasone; lane D = 1 nM, lane E = 10 nM, lane F = 100 nM of dexamethasone. lane G-I = CAT activity in transfected cells treated with 1, 10 and 100 nM of dexamethasone plus 1 mM of RU 486, respectively; lane J = the effects of 1 mM of RU 486 alone. Results are presented as % above controls. Percent (%) of acetylated chloremphenicol activity in control transiently transfected cells was = 1 ± 0.1 ; mean and the standard error of the mean of triplicated determinations ($\bar{X} \pm SE$). * $p < 0.001$.

Functional status of GR in PC-3 cells. Because immunodetection of GR in PC-3 cells does not provide evidence for the functional status of hormone binding domain (HBD) of GR, we performed receptor binding assays. We documented that GR in PC-3 cells had an association constant similar to that of wild-type hGR (Fig. 2; upper panel). The association constant was $0.13 \pm 0.01 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, and the GR number was 650 ± 20 fmol per mg of protein. Specificity for ligand binding was documented by radioactive ligand displacement experiments (Figure 2; lower panel). These data were in concert with our previous findings with regard of GR in androgen-independent PA-III prostate cancer cell line (11). Therefore, PC-3 cells contained GR with intact ligand binding capacity.

To investigate further the functional status of GR in PC-3 cells, we analyzed the ability of activated GR (GR-dexamethasone complexes) to bind radiolabeled DNA by DNA band-shift analysis (Fig. 3; left panel). The radiolabeled-DNA binding analysis (band-shift analysis on gel electrophoresis) was done both with and without 10 and 100-fold molar excess of radioinert DNA using whole cell extracts of PC-3 cells preincubated with or without 100 nM of dexamethasone for 30' and 24 h. Activated GR were able to bind radiolabeled DNA (Fig. 3, left panel; lanes 6 and 9). Specificity was determined by (a) the absence of the corresponding radiolabeled DNA-GR band in extracts of CV-1 cells known to lack the expression of steroid receptors (Fig. 3, left panel, lanes 1-4); (b) the absence of DNA-GR radioactive band in negative control experiments containing no protein (Fig. 3, left panel, lane 5) and by (c) the decrease density of the GR-DNA radioactive band in excess radio inert DNA (Fig. 3, left panel, lanes 7,8 and 10,11). Therefore, PC-3 cells contained GR with intact DNA binding capacity.

The ability of GR in PC-3 cells to bind DNA does not preclude intact transcription activity. Therefore, we tested whether increasing concentrations of dexamethasone stimulated the transcription activity in PC-3 cells. This was done by measuring increasing levels of CAT activity in transiently transfected PC-3 cells with the MMTV-CAT chimeric gene in the presence of the β -galactosidase expression vector CH 110. Dexamethasone stimulated the transcription activity of MMTV-CAT chimeric gene (Fig. 3, right panel, lanes D-F). *Trans*-activation of MMTV-CAT chimeric gene with 100 nM of dexamethasone was completely blocked by 1 mM of RU 486, a glucocorticoid and progesterone receptor blocker (Fig. 4, right panel, lane G-I). RU

486 alone (Fig. 3, lane J) had no effect on the transcription activation of MMTV-CAT reporter gene. In addition, 1 nM up to 1 mM concentration of R1881, an androgen agonist, did not stimulate transcription activity of MMTV-CAT chimeric gene (Fig. 3, right panel, lanes B and C) thus confirming the androgen-unresponsive phenotype of PC-3 cells. Therefore, GR-DNA binding in PC-3 cells was transcriptionally active.

Biological relevance of GR function for the proliferation of PC-3 cells. Incubation of PC-3 cells with increasing concentrations of dexamethasone (0.1-100 nM) inhibited the proliferation of PC-3 cells as detected by (a) the decreasing rate of incorporation of ^3H -thymidine (cpm/ μg DNA) into PC-3 cells after 24 h (Fig. 4, upper panel, A and B) and (b) block of the expected increase of DNA content after 48 h (Fig. 5; A-C). RU 486 did not alter significantly the proliferation rate of PC-3 cells, but it reversed completely dexamethasone's (10^{-7} M) inhibition of PC-3 cell proliferation (Fig. 4; C and D, respectively).

Using flow cytometry to analyze the phase distribution of PC-3 cells into the cell cycle, we documented that 100 nM of dexamethasone significantly enhanced the distribution of PC-3 cells at the G₁/G₀ phase (from $47.6 \pm 1.2\%$ up to $54 \pm 1.6\%$; $X \pm \text{SE}$; $p < 0.05$), thus decreasing the distribution of PC-3 cells at the S + G₂/M phase. This was suggestive of an arrest (block or prolongation) of the progression of PC-3 cells into cell cycle at the G₁/G₀ phase. No microscopic evidence of apoptosis was noted in PC-3 cells after 48 h of treatment with 100 nM of dexamethasone.

Possible mediators of glucocorticoid inhibition of the growth of PC-3 cells. TGF β 1 decreased the rate of PC-3 cell proliferation as detected by ^3H -thymidine incorporation (Fig. 4; lower panel, A-C) and DNA content (Fig. 5; D-F). Anti-TGF β 1 polyclonal antibodies at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ marginally stimulated the proliferation of PC-3 cells (Fig. 4; upper panel, F). Because prostate cancer cells express TGF β 1, it is conceivable that anti-TGF β 1 antibody at least temporarily neutralized the effect of steady-state expression of TGF β 1 in PC-3 cells (36). Furthermore, this anti-TGF β 1 antibody, known to neutralize the effects of TGF β 1 (R & D Systems) partially neutralized the effect of dexamethasone's inhibition of PC-3 cell proliferation (Fig. 4, upper panel, E). Anti-TGF β 1, at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, partially blocked TGF β 1 inhibition of PC-3 cell proliferation (Fig. 4; lower panel, D). In addition, TGF β 1 increased the distribution of PC-3 cells at the G₁/G₀

phase of the cell cycle (from $48 \pm 1.2\%$ up to $57.6 \pm 0.3\%$; $X \pm SE$; $p < 0.05$), thus arresting (blocking or prolonging) the progression of PC-3 cells into the S + G₂/M phase. PDGF (1-25 ng/ml) stimulated the growth of PC-3 cells as detected by (a) the tritiated-thymidine incorporation assay (Fig. 4, upper panel, H and I) and (b) the DNA content assay (Fig. 5, G-I). PDGF overcame completely dexamethasone's (10^{-7} M) inhibition of PC-3 cell growth (Fig. 4; upper panel, G).

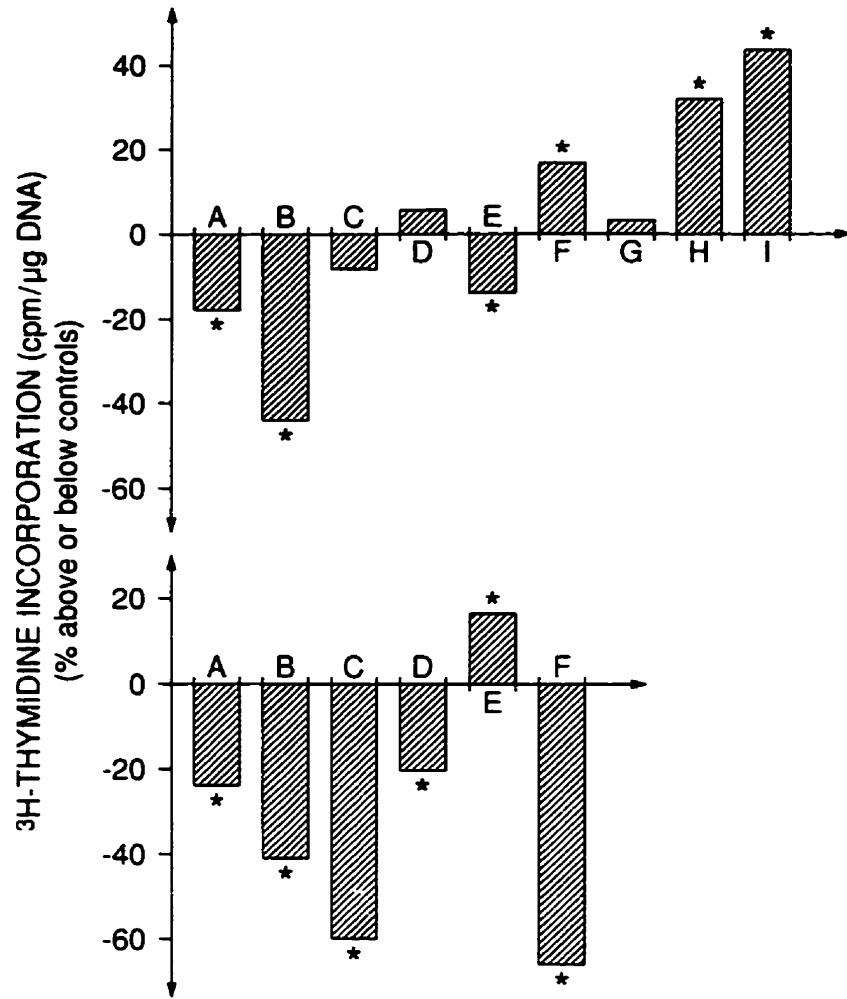
To study further the possible relevance of GR function on the expression of TGF β 1 in PC-3 cells, we evaluated the expression of TGF β 1 mRNA in PC-3 cells after treatment with dexamethasone for 0, 2, 12, 24, and 48 h by Northern analysis of the relative expression of TGF β 1 (TGF β 1/GAPDH) poly-A mRNA. The expression of TGF β 1 mRNA was up modulated by 100 nM of dexamethasone (Fig. 6).

Fig. 4. (Next page)

Upper panel: dexamethasone inhibited the incorporation of tritiated-thymidine (cpm/mg of DNA) into PC-3 cells. **lane A** = 10^{-8} M, and **B** = 10^{-7} M of dexamethasone. RU 486 (10^{-6} M) have no effect on the proliferation of PC-3 cells (**lane D**) but blocked completely dexamethasone's (10^{-7} M) inhibition of PC-3 cells (**lane C**). Dexamethasone's (10^{-7} M) inhibition of PC-3 cells was partially neutralized by an anti-TGF β 1 polyclonal antibody at final concentration 10 μ g/ml (**lane E**). At this concentration anti-TGF β 1 polyclonal antibody increased the proliferation of PC-3 cells (**lane F**). PDGF stimulated the proliferation of PC-3 cells in a dose-dependent manner (**lane H** = 10 ng/ml and **I** = 25 ng/ml). Twenty five (25 ng/ml) of PDGF reversed the dexamethasone (10^{-7} M) inhibition of PC-3 cells (**lane G**).

Lower panel: The inhibitory effects of 0.5 ng/ml (**lane A**), 10 ng/ml (**lane B**), and 25 ng/ml (**lane C**) of TGF β 1. **Lane D** = the effects of 25 ng/ml of TGF β 1 plus TGF β 1 polyclonal antibody at final concentration 10 μ g/ml and **Lane E** = the effects of TGF β 1 polyclonal antibody at final concentration 10 μ g/ml alone. **Lane F** = the effects of 25 ng/ml of TGF β 1 plus 10^{-7} M of dexamethasone. PC-3 cells were cultured in DMEM/F-12 medium containing 0.5% BS and mitogenicity was assessed by the rate of tritiated-thymidine incorporation into PC-3 cells after 24 h incubation with the substance under investigation.

Results were expressed as % above or below controls = incorporation of tritiated-thymidine of PC-3 cells (cpm/ μ g DNA) treated with dexamethasone or growth factors minus incorporation of tritiated-thymidine of control PC-3 cells divided by the latter and multiplied by 100). The mean value and the standard error of the mean ($X \pm SE$) of the tritiated-thymidine incorporation into control PC-3 cells was = $15,347 \pm 544$ (cpm/ μ g DNA) of triplicated determinations. * $p < 0.001$.



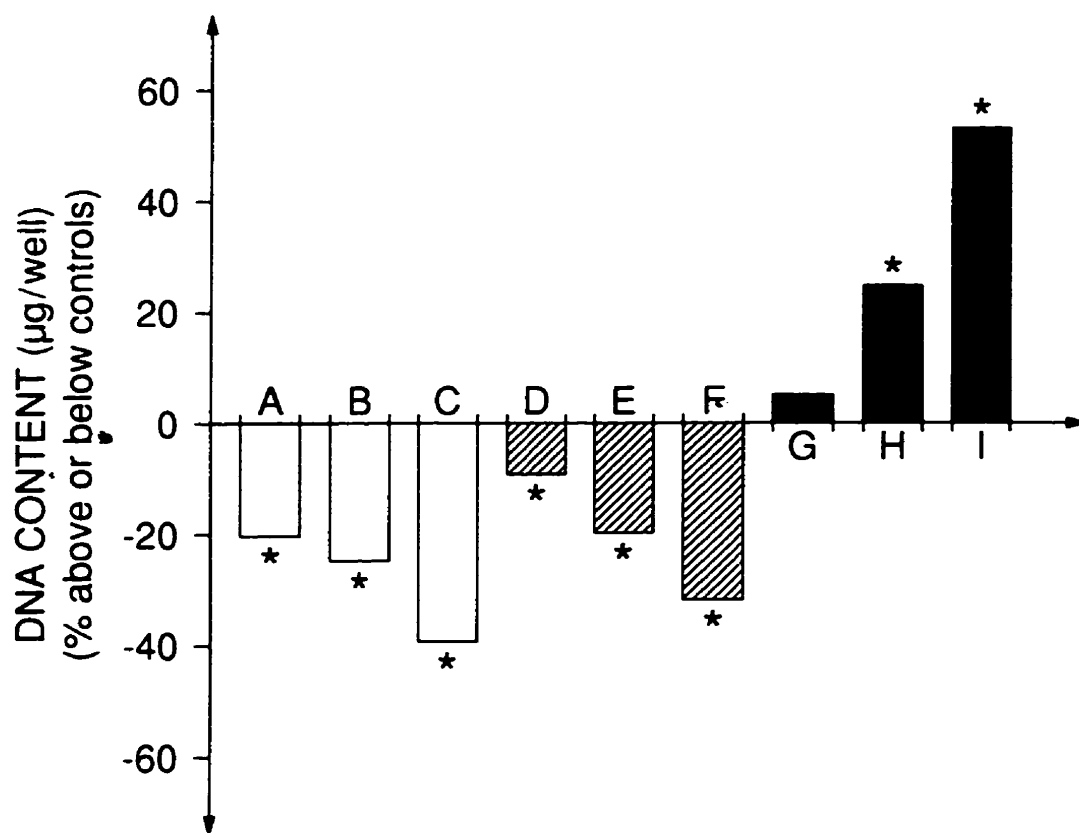


Fig. 5. DNA content ($\mu\text{g}/\text{well}$) of PC-3 cells treated with dexamethasone (lanes; A = 10^{-9} M, B = 10^{-8} M, and C = 10^{-7} M), TGF β 1 (lanes; D = 0.5 ng/ml, E = 10 ng/ml, and F = 25 ng/ml), and PDGF (lanes; H = 10 ng/ml, and I = 25 ng/ml) for 48 h. Lane G = the effects of 10^{-7} M of dexamethasone plus 25 ng/ml of PDGF. Dexamethasone and TGF β 1 inhibited the expected increase of DNA content observed in controls; and PDGF increased the expected DNA content in control PC-3 cell cultures. Note the complete neutralization of dexamethasone's inhibition of PC-3 cells by PDGF. Results were expressed as in the legend to the Figure 1. The mean value and the standard error of the mean ($\bar{X} \pm \text{SE}$) of DNA content for control PC-3 cells was = 5.178 ± 0.162 ($\mu\text{g}/\text{well}$) of triplicated determinations. * $p < 0.001$.

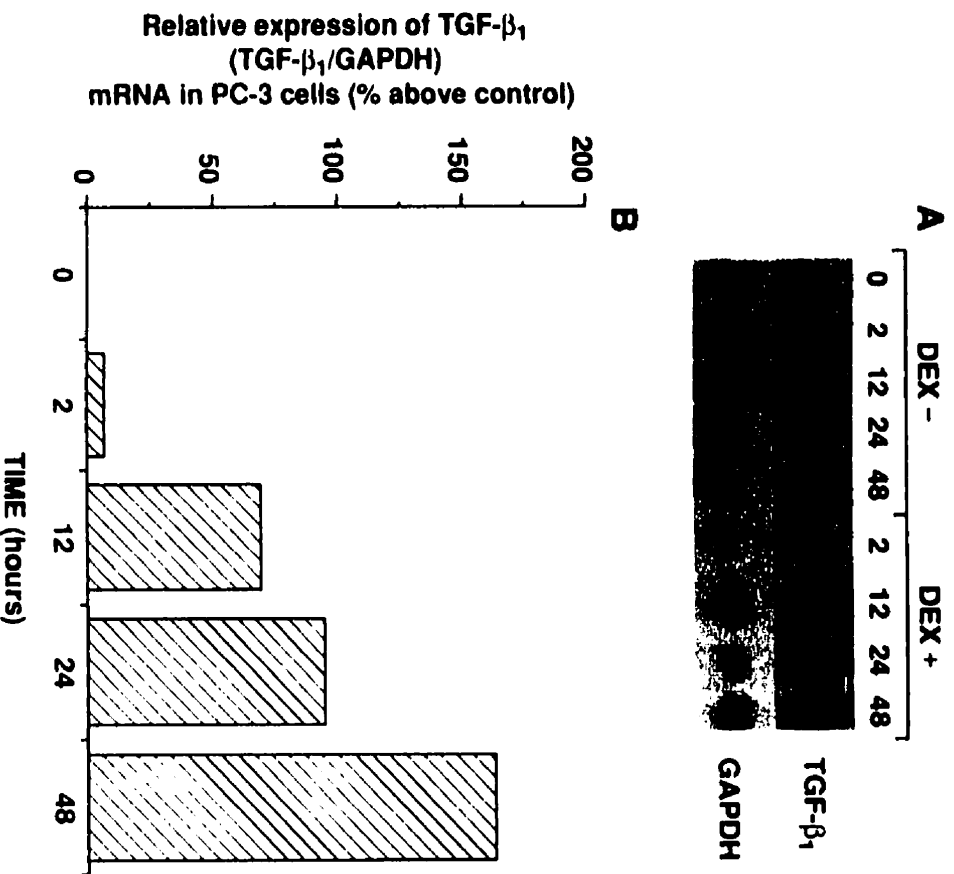


Fig. 6. The ratio of the relative expression of poly-A TGF β_1 (TGF β_1 /GAPDH) mRNA in PC-3 cells treated with 100 nM of dexamethasone for 0, 2, 12, 24, and 48 h versus control cultures (PC-3 cells under identical experimental conditions cultured without dexamethasone; 5 μ g of poly-A mRNA was blotted). Results are presented as % above control = relative expression of poly-A TGF β_1 (TGF β_1 /GAPDH) mRNA in treated PC-3 cells minus the relative expression of poly-A TGF β_1 (TGF β_1 /GAPDH) mRNA in nontreated PC-3 cells; divided by the later and multiplied x100 at 0, 2, 12, 24, 48 h. Similar results were obtained in three separate experiments.

DISCUSSION

The PC-3 cell line was established from an osteoblastic metastasis of a patient with hormone refractory advanced prostate cancer (21). The PC-3 cells have been used as an in vitro model to study the paracrine interactions between metastatic prostate cancer cells and osteoblasts leading to the osteoblastic reaction in metastatic prostate cancer (22, 23). The PC-3 cells were characterized to lack androgen receptor (AR) expression (16). There is now evidence suggesting that certain tumor cell clones in advanced prostate cancer patients can adapt to conditions of androgen deprivation as well as evidence of the existence of AR-negative prostate tumor cell clones within prostate cancer tumors. These data have enhanced interest in studying the biology of androgen-independent prostate cell lines, such as PC-3 cells.

In addition, data exist to indicate the interaction of GR and AR on the same steroid-responsive element to regulate transcription activation (4-7), suggesting that GR function could become relevant to the biology of androgen-independent prostate cancer cells (4-6,11). Therefore, we studied the functional status of GR in PC-3 cells and whether TGF β 1 expression, a growth factor well known to control cell proliferation and programmed cell death in the prostate (24-28), mediated glucocorticoid effects on the proliferation of PC-3 cells.

Western blot analysis using GR polyclonal antibodies raised against a synthetic GR peptide (hGR383-393) documented GR expression in PC-3 cells (Fig. 1). The GR in PC-3 cells have had an hormone binding domain (HBD) capable of binding dexamethasone with an affinity similar to wild-type GR (Fig. 2). The GR-ligand complex was able to bind DNA, thus *trans*-activating the expression of MMTV-CAT chimeric gene in transiently transformed PC-3 cells (Fig. 3). In addition, dexamethasone up modulated the expression of TGF β 1 poly-A mRNA in PC-3 cells (Fig. 6). Therefore, GR function inhibited the proliferation of PC-3 prostate cancer cells at least in part via a TGF β 1-dependent mechanism (Figs. 4 and 5). Because the up modulation of the expression of TGF β 1 mRNA was not spectacular, it is conceivable that dexamethasone's effects on the proliferation of PC-3 cells may also implicate activation of latent TGF β 1.

Because GR and AR are postulated to use the same steroid-responsive element for certain molecular events (4-6), it seemed conceivable that androgens, if functional AR were present in PC-3 cells, would probably also inhibit the growth of PC-3 cells. Indeed, androgens inhibited the proliferation of stably transfected PC-3 cells with wild-type AR cDNA (29). These data suggested that prostate cancer cell clones exemplified by PC-3 cells should differ profoundly from normal prostate cells and other AR-responsive prostate cancer cell clones, because (a) conditions of androgen deprivation will not affect cell growth, and (b) expression of the androgen-unresponsive phenotype is linked with a growth advantage of these cells compared with androgen-dependent prostate cancer cells (29).

It is tempting to speculate that hormone-deprivation therapies prescribed for advanced prostate cancer patients would inhibit the proliferation of the androgen-dependent cell clones without affecting the growth of other androgen-unresponsive prostate cancer cell clones such as those exemplified by PC-3 cells. This may be relevant to tumor cell biology of the most common site of prostate cancer progression, osteoblastic metastasis (30-32). Therefore, glucocorticoid therapy may be a justifiable therapeutic approach, aiming to inhibit proliferation of androgen-unresponsive prostate cancer cells exemplified by PC-3 cells.

Recently, hydroxy-flutamide (OH-Flu) "a pure anti-androgen" withdrawal produced an objective clinical response in patients with advanced prostate cancer who experienced disease progression under combination hormonal therapy (gonadotropin hormone-releasing hormone analogue (GnRH-A) plus OH-Flu) (33, 34). This indicated that among prostate cancer cell clones certain cells are taking advantage of the administration of antiandrogens such as hydroxy-flutamide (34). Although the exact pathogenic mechanism of this response remains unclear (35), it is conceivable that advanced prostate cancer is a disease composed of a mixture of cell clones that (a) may respond to androgens, (b) may respond paradoxically to androgen and anti-androgens, and (c) may not respond.

Because GR function inhibited PC-3 cell growth, we investigated the role of growth factors such as PDGF and TGF β 1 for this action. PDGF stimulated the proliferation of PC-3 cells and completely overcame dexamethasone's inhibition,

suggesting dexamethasone's down modulation of PDGF expression in PC-3 cells. This was in concert with the reported mechanism of dexamethasone's inhibition of DDT₁MF-2 ductus deferens cell line (9). The proliferation of PC-3 cells was also inhibited by TGF β 1, and an anti-TGF β 1 polyclonal antibody partially blocked dexamethasone's inhibition of PC-3 cells, indicating that dexamethasone could exert its action on PC-3 cells using another mediating mechanism. By assessing the phase distribution of the PC-3 cell cycle, we determined that both TGF β 1 and dexamethasone arrested the progression of PC-3 cells at the G₁/G₀ phase of cell cycle. In addition, dexamethasone up modulated expression of TGF β 1 mRNA in PC-3 cells (Fig. 6), but it could indirectly activate also latent TGF β 1. Therefore, we concluded that glucocorticoid inhibition on PC-3 cell growth was mediated at least in part by TGF β 1 expression, which is in concert with other studies reporting that dexamethasone and TGF β 1 arrested the hepatoma cell cycle at the G₁ phase (13) and that dexamethasone's inhibition of hepatoma cell growth was mediated by TGF β 1 expression (14).

Recent studies have documented that TGF β 1 mRNA expression is dramatically elevated in prostate cancer tumors (36). The production of TGF β 1 by metastatic prostate cancer cells could explain the marginal but significant stimulation of PC-3 cell growth produced by anti-TGF β 1 polyclonal antibody in our experiments (Fig. 4; upper panel, lane F).

In addition, TGF β 1 overproducing MATLyLu prostate cancer cells (engineered by stable transfection) produced more extensive metastatic disease than untransfected MATLyLu cells (28). In these experiments endogenous and exogenous TGF β 1 transiently inhibited the growth of R3327 MATLyLu prostate cancer cells (28). Loss of sensitivity to TGF β 1 in MATLyLu R3327 cells was explained via down-regulation of TGF β receptors, uncoupling of TGF β receptors from their signal transduction pathway, or stimulation of growth factors that overcome the growth inhibition (28). In this context, TGF β is known to stimulate the production of basic fibroblast growth factor (37), PDGF (38), insulin-like growth factor I (39), and PDGF receptors (38) in several *in vitro* systems. Therefore, the TGF β 1 inhibition of PC-3 cell growth could be a transient effect that might not influence the proliferation of metastatic prostate cancer cells *in vivo*.

In contrast, up modulation of TGF β 1 expression could increase the metastatic capacity of PC-3 cells (28) via a plethora of other TGF β 1-mediated effects documented to interfere with the biology of cancer cell, such as (a) extracellular matrix protein formation and degradation (40), (b) inhibition of cell adhesion to fibronectin via overexpression of tenascin (41), (c) modulation of integrins adhesion molecules (42), and (d) angiogenesis (43).

CONCLUSIONS

We conclude that (a) functionally intact GR is present in PC-3 cells, (b) GR function is mediated at least in part by TGF β 1 expression in PC-3 cells, and (c) interactions of GR function with growth factors such as PDGF and TGF β 1 could modulate proliferation and possibly the metastatic potential of human prostate cancer cells as exemplified by PC-3 cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant to MK from the Cancer Research Society (CRS) of Montreal and the Medical Research Council (MRC) of Canada. MK is a scholar of the Fonds a la Recherche en Sante du Quebec (FRSQ), Carlos Reyes-Moreno holds a student Award from the "FRSQ-FCAR-Santé", MVG is a member of the MRC group in Molecular Endocrinology, and JB is holding a studentship award from MRC of Canada.

REFERENCES

1. Durant S, Duval D, Homo-Delarche F: Factors involved in the control of fibroblast proliferation by glucocorticoids: a review. *Endocrinol Rev* 7:254-269, 1986.
2. Huang DP, Schwartz CE, Chiu JF, Cook JR: Dexamethasone inhibition of rat hepatoma growth and α -fetoprotein synthesis. *Cancer Res* 44:2976-2980, 1984.
3. Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895, 1988.
4. Davies D, Rushmere NK: Association of glucocorticoid receptors with prostate nuclear sites for androgen receptors and with androgen response elements. *J Mol Endocrinol* 5:117-127, 1990.
5. Rennie SP, Bowden JF, Freeman SN, Bruchoovsky N, Cheng H, Lubanh DB, Wilson EM, French FS, Main L: Cortisol alters gene expression during involution of the rat prostate. *Mol Endocrinol* 3:703-708, 1989.
6. Blauer KL, Poth M, Rogers HM, Bernton EW: Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effect of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology* 129:3174-3179, 1991.
7. Davies P, Eaton CL: Regulation of prostate growth. *J Endocrinol* 131:5-17, 1991.
8. Syms AJ, Norris JS, Smith RG: Proliferation of a highly androgen-sensitive ductus deferens cell line (DDT₁MF-2) is regulated by glucocorticoids and modulated by growth on collagen. *In Vitro* 19:929-936, 1983.
9. Syms AJ, Norris J, Smith RG: Autocrine regulation of growth: I. Glucocorticoid inhibition is overcome by exogenous platelet derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 122:68-74, 1984.
10. Hiroaka D, Nakamura N, Nishizawa Y, Uschida N, Naguchi S, Matsumoto K, Sato B: Inhibitory and stimulatory effects of glucocorticoids on androgen-induced growth of murine shionogi carcinoma 115 in vivo and in mice and cell culture. *Cancer Res* 47:6560-6564, 1987.
11. Koutsilieris M, Grondin F, Lehoux JG: The expression of mRNA for glucocorticoid receptor gene and functional glucocorticoid receptors detected in PA-III rat prostate adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 12:899-904, 1992.
12. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P: Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 60:1189-1204, 1990.

13. Sanchez I, Goya L, Vallerga AK, Firestone GL: Glucocorticoids reversibly arrest rat hepatoma cell growth by inducing an early G₁ block in cell cycle progression. *Cell Growth Differ* 4:215-225, 1993.
14. Johnson BH, Gomi M, Jacowlew SB, Moriwaki K, Thompson EB: Actions and interactions of glucocorticoids and transforming growth factor b on two related human myeloma cell lines. *Cell Growth Differ* 4:25-30, 1993.
15. Norris JS, Comett LE, Hardin JW, Kohler PO, MacLeod SL, Srivastava A, Syms AJ, Smith RG: Autocrine regulation of growth:glucocorticoids inhibit transcription of c-sis oncogene-specific RNA transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 1:124-128, 1984.
16. Tilley WD, Wilson CM, Markelli M, McPhaul MJ: Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* 50:5382-5386, 1990.
17. Govindan MV, Leclerc S, Roy R, Rathanaswamy P, Xie B: Differential regulation of mouse mammary tumor virus bacterial chloraphenicol acetyltransferase chimeric gene by human mineralocorticoids hormone binding and transactivation by androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:91-103, 1991.
18. Govindan MV :Specific region in hormone binding domain is essential for hormone binding and trans-activation by androgen receptor. *Molecular Endocrinol* 4:417-427, 1990.
19. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
20. Harris BA, Robishaw JD, Mumby SM, Gilman AG: Molecular cloning of complementary DNA for the alpha subunit of the G protein that stimulates adenylate cyclase. *Science* 229:1274-1277, 1985.
21. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: Establishment and characterization of a human carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16-23, 1979.
22. Koutsilieris M: Osteoblastic metastasis in advanced prostate cancer. *Anticancer Res* 13:443-450, 1993.
23. Simpson E, Harrod J, Eilon G, Jacobs JW, Mundy GR: Identification of a messenger ribonucleic acid fraction in human prostatic cancer cells coding for a novel osteoblast-stimulating factor. *Endocrinology* 117:1615-1619, 1985.
24. Kyprianou N, Isaacs JT: Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-b in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* 123:2124-2131, 1988.

25. Schuurmans ALG, Bolt J, Mulder E: Androgens and transforming growth factor b modulate the growth response to epidermal growth factor in human prostatic tumor cells (LNCaP). *Mol Cell Endocrinol* 60:101-104, 1988
26. Wilding G, Zugmeier G, Knabbe C, Flanders K, Gelmann E: Differential effects of transforming growth factor b on human prostate cancer cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 62:79-87, 1989.
27. Shain SA, Lin AL, Koger JD, Karaganis AG: Rat prostate cancer cels contain functional receptors for transforming growth factor-b. *Endocrinology* 126:818-825, 1990.
28. Steiner MS, Barrack ER: Transforming growth factor-b1 overproduction in prostate cancer:effects on growth in vivo and in vitro. *Mol Endocrinology* 6:15-25, 1992.
29. Yuan S, Trachtenberg J, Mills GB, Brown TJ, Xu F, Keating A: Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA. *Cancer Res* 53:1304-1311, 1993.
30. Koutsilieris M, Faure N, Laroche B, Tolis G, Roberts G, Ackman CFD: Objective response and disease outcome in 59 patients with stage D2 prostatic carcinoma treated with either buserelin or orchiectomy:disease aggressivity and its association with response and outcome. *Urology* 27:221-227, 1986.
31. Koutsilieris M, Ackman CFD: Complete response of lung metastases caused by prostatic cancer after chronic administration of a gonadotropin-releasing hormone analog, buserelin (HOE 766). *Prostate* 10:19-24, 1987.
32. Koutsilieris M, Laroche B, Thabet M, Fradet Y: The assessment of disease aggressivity in stage D2 prostate cancer patients. *Anticancer Res* 10:333-336, 1990.
33. Kelly WK, Scher HJ: Prostate specific antigen decline after antiandrogen withdrawal: the flutamide withdrawal syndrome. *J Urol* 149:607-609, 1993.
34. Dupont A, Gomez JL, Cusan L, Koutsilieris M, Labrie F: Response to flutamide withdrawal in advanced prostate cancer in progression under combination therapy. *J Urol* 150:908-913, 1993.
35. Warriar N, Page N, Koutsilieris M, Govindan MV: Anti-androgens inhibit human androgen receptor-dependent gene transcription activation in the human prostate cancer cells (LNCaP). *Prostate* 24:176-186, 1994.
36. Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Brinkman TS, Berger WH: Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 47:707-712, 1987.

37. Cook PW, Coffey Jr RJ, Magun BE, Pittelkow MR, Shipley GD: Expression and regulation of mRNA coding for acidic and basic fibroblast growth factor a in cells derived from human skin. *Mol Endocrinol* 4:1377-1385, 1990.
38. Gronwald RGK, Seifert RA, Bowen-Pope DF: Differential regulation of expression of two platelet-derived growth factor receptor subunits by transforming growth factor-b. *J Biol Chem* 264:8120-8125, 1989.
39. Eiford PR, Lamberts SWJ: Contrasting modulation by transforming growth factor b1 of insulin-like growth factor-I production in osteoblasts and chondrocytes. *Endocrinology* 127:1635-1639, 1990.
40. Bernard JA, Lyons RM, Moses H L: The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1032:79-87, 1990.
41. Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M: Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53:383-390, 1988.
42. Heino J, Massague J: Transforming growth factor-b switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 264:21806-21811, 1989.
43. Yang EY, Moses HL: Transforming growth factor beta 1-induced changes on cell migration, proliferation and angiogenesis in chicken chorioallantoid membrane. *J Cell Biol* 111:731-741, 1990.

CHAPITRE III

**L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES EST
MÉDIÉE PAR L'ACTIVATION DE LA FORME LATENTE DE TGF- β 1 (LATENT
TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1) DANS LES CELLULES MG-63
D'OSTÉOSARCOME HUMAIN.**

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'état fonctionnel du récepteur des glucocorticoïdes présent dans les cellules MG-63 par des essais de liaisons au récepteur, de retardement de migration sur gel et par transactivation du gène reporteur MMTV-tk-CAT transfecté de façon transitoire dans les cellules MG-63. Nos résultats ont démontré que le dexaméthasone augmente la distribution des cellules MG-63 dans la phase G₁/G₀ du cycle cellulaire, diminuant ainsi le taux de synthèse d'ADN et la croissance cellulaire. Par ailleurs, le TGF-β1 produit aussi une inhibition de la prolifération des cellules MG-63. Nous avons constaté que l'effet inhibiteur du dexaméthasone sur la croissance de cellules MG-63 a été neutralisé par l'antagoniste RU486 et un anti-corps développé contre le TGF-β1. De plus, le dexaméthasone augmente le niveau de TGF-β1 actif (détecté dans le milieu conditionné par les cellules MG-63) sans altérer significativement le niveau d'expression de l'ARNm de TGF-β1 dans les cellules MG-63. Nous pouvons donc conclure que, dans les cellules MG-63 d'ostéosarcome humain, l'activité biologique du récepteur des glucocorticoïdes est médiée par l'activation de la forme latente de TGF-β1.

**MEDIATION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR FUNCTION
BY THE ACTIVATION OF LATENT TRANSFORMING GROWTH FACTOR
BETA 1 IN MG-63 HUMAN OSTEOSARCOMA CELLS.**

Jocelyn BOULANGER, Carlos REYES-MORENO and Michael KOUTSILIERIS

Molecular Endocrinology, Research Center, Centre Hospitalier de l' Université Laval (CHUL),
Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2.

GR function in MG-63 osteosarcoma cells

Article publié dans International journal of cancer, 61:692-697, 1995.

Summary

We analyzed glucocorticoid receptor function by using ligand binding assays, DNA band-shift analysis, and trans-activation of the mouse mammary tumor virus-thymidine kinase-chloramphenicol acetyltransferase reporter gene in transiently transfected MG-63 human osteosarcoma cells. Dexamethasone increased the distribution of MG-63 cells in the G₁/G₀ phase of the cell cycle, thus decreasing the rate of DNA synthesis and cell growth. Its effect on MG-63 cell growth was neutralized by RU486 and anti-transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) antibody. In addition, (a) dexamethasone increased the levels of the active TGF-β1 in MG-63-conditioned media without significantly altering the expression of TGF-β1 mRNA in MG-63 cells, and (b) TGF-β1 inhibited the proliferation of MG-63 cells. Therefore, we conclude that glucocorticoid receptor function is mediated by the activation of latent-TGF-β1 in MG-63 osteosarcoma cells.

INTRODUCTION

Glucocorticoid receptor (GR) is a trans-acting protein whose action depends on the particular DNA recognition sequence (glucocorticoid responsive element; GRE) within the upstream regulatory region of GR-regulated genes (Evans 1988). In addition, GR function depends on protein-protein interactions, such as those with the jun/fos transcription complex (Jonat et al, 1990). Growth factors, such as transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) and platelet-derived growth factor (PDGF), mediate the action of glucocorticoids on cell growth (Syms et al, 1984; Johnson et al, 1993). In vitro, glucocorticoids either inhibit or enhance the proliferation of various cell lines (Syms et al, 1984; Koutsilieris et al, 1992, Reyes-Moreno et al, 1995).

In clinical practice, glucocorticoids are widely used in the prevention of posttransplantation tissue rejection and the treatment of rheumatoid arthritis, advanced metastatic cancer, and asthma. Chronic therapy with glucocorticoids has been firmly associated with an increased rate of bone resorption and bone fractures (Peck et al, 1984). In addition, high-dose dexamethasone therapy was reported to produce a subjective and sometimes an objective clinical response in advanced prostate cancer patients experiencing hormone refractory (androgen-insensitive) bone metastases (Hellmann et al, 1993). Therefore, there exist strong interest to investigate the mediators of GR function in osteoblast-like cells, which in turn, modulate bone physiology and cell to cell interactions in bony metastasis.

MG-63 is an osteoblast-like human osteosarcoma cell line that contains relatively low levels of alkaline phosphatase and higher levels of type III than type I collagen, expresses osteocalcin, and it responds poorly to parathyroid hormone but well to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (Jukkola et al, 1993). In this study, we used MG-63 osteosarcoma cells as an in vitro model for studying GR function in osteoblast-like cells.

First, we documented the presence of intact GR in MG-63 cells using ligand binding assays and DNA band-shift analysis; and measuring the endogenous GR transcription activity in transiently transfected MG-63 cells with the mouse mammary tumor virus-thymidine kinase-chloramphenicol acetyltransferase reporter gene (MMTV-CAT chimeric gene). Because (a) dexamethasone and TGF- β 1 inhibited the proliferation and cell growth of MG-63 cells, (b) RU486 and anti-TGF- β 1 neutralizing antibodies blocked dexamethasone's inhibition of MG-63 cells, and (c) dexamethasone failed to modulate the expression of TGF- β 1 mRNA but increased

the levels of active TGF- β 1 in MG-63 conditioned media (CM), we conclude that GR function in MG-63 osteosarcoma cells is probably mediated by activation of latent TGF- β 1.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and bioassay systems. The MG-63 and CV-1 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD, U.S.A). The cells were grown in 75-cm² culture flasks using Dulbecco's modified Eagle medium/F-12 (DMEM/F-12, GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A) containing 0 to 10% bovine serum, depending on the experiment. Cells were plated at a cell density of 5×10^4 cells per well in 24-well plates. Cell proliferation was assessed by the rate of tritiated thymidine incorporation (cpm/mg of DNA), and cell growth by the DNA content (mg DNA/well) and cell number. Indices of cell cycle were measured by flow cytometry analyzing DNA content in propidium iodine-stained cells using a counter EPICS 753 pulse cytometer (Coulter Counter, Hialeah, FL) thus assessing the distribution of MG-63 cells into cell-cycle phases. Results were expressed as percent (%) above or below controls; measurements in treated cells minus measurements of controls were divided by the latter X100 (Koutsilieris et al, 1992; Reyes-Moreno et al, 1995). We also used a specific anti-TGF- β 1 polyclonal antibody at final dilution of 10 mg/ml to reverse dexamethasone's inhibition of MG-63 cell proliferation. At a concentration of 5 mg/ml this anti-TGF- β 1 neutralizing antibody can block 50% of the activity of 0.25 ng/ml of rhTGF- β 1 in cell assays (R&D Systems, Minneapolis, MN; Reyes-Moreno et al, 1995). Measurements of active TGF- β 1 in MG-63 CM were done by the quantitative "sandwich" enzyme immunoassay technique (R & D Systems).

Isolation of mRNA and Northern blot analysis. The MG-63 cells were homogenized in 4 M guanidine thiocyanate (Fisher Scientific, Montreal, Canada) containing 25 mM sodium citrate, 0.5% lauroyl sarcosine, and 0.1 M 2-mercaptoethanol. The homogenate was extracted with phenol/chloroform and RNA was precipitated in 80% ethanol as described previously (Koutsilieris et al, 1992; Reyes-Moreno et al, 1995). The RNA content was estimated by spectrophotometry at 260 and 280 nm. Ten mg of total mRNA was analyzed in 1.2% agarose denaturing gel and transferred to Hybond N (Amersham, Arlington Heights, IL). Membrane was prehybridized and hybridized as described previously (Koutsilieris et al, 1992). Blots were probed with ³²P-labeled human TGF- β 1 obtained from ATCC. The analysis of 18S mRNA quantitated TGF- β 1 mRNA expression. Autoradiograms were exposed to Kodak X-Omat RP

films with Cronax lightning screens (Dupont, Quebec, Canada) for 3 days (signal for TGF- β 1) and 2 h (signal for 18S). The intensity of the bands in the films was determined by LKB 2222-020 Ultrascan XL laser densitometer (Pharmacia, Baie d'Urfe, Qc, Canada). Formamide was from BRL and ^{32}P -labeled nucleotides were from Amersham. All other chemicals were of analytical grade.

Transient transfection and assays determining CAT activity. The ability of endogenous GR to activate gene transcription in MG-63 cells was studied employing the well-established glucocorticoid responsive MMTV-CAT chimeric gene in the presence of the β -galactosidase expression vector CH 110 (Govindan et al, 1991; Reyes-Moreno et al, 1995). Transfected cells were treated with dexamethasone, and the levels of CAT activity were used to determine the relative transcription activation of MMTV-CAT gene by endogenous GR. The MG-63 cells were cultured in DMEM/F-12 supplemented with 10% charcoal-dextran-treated fetal calf serum, gentamycin (16 mg/ml), and fungizone (1 mg/ml). Then the cells were plated in 100-mm dishes with 4 ml of DMEM/F-12 supplemented with charcoal-treated fetal calf serum (10%) at a density of 6×10^5 cells/plate. After overnight incubation of the cells in a humidified 5% CO_2 incubator, 5 ml of fresh medium was added 2 h before transfection. Cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation technique with 10 μg of each reporter plasmid MMTV-CAT and 5 μg of β -galactosidase expression vector CH-110 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using 960 ml of the precipitate. Plasmids were purified on a Csal gradient, and transfected cells were treated with various concentrations of dexamethasone (Sigma, St. Louis, MO) and RU486 (Roussel, Romainville, France). The precipitate remained in contact with the cells for 12 to 16 h. After exposure to calcium phosphate, precipitate cells were treated with 2 ml of 15% glycerol in Hanks' balanced salt solution for 5 min, washed twice, fed with media containing hormones from 1,000X stock solutions in ethanol and harvested after 24 h for CAT assays as described previously (Govindan et al, 1991; Reyes-Moreno et al, 1995). Aliquots of cell extracts containing 10 U of β -galactosidase were used to determine CAT activity. Results were expressed as mean of triplicate experiments performed under identical conditions using supernatants from three different pools of MG-63 transfectants.

Hormone binding assay. MG-63 cells were grown in DMEM/F-12 medium containing dextran coated charcoal calf serum (DCC-CS), pH 7.4. Cells were collected by trypsinization, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) (20 mM phosphate, 0.9% NaCl, pH 7.4), and homogenized in ice-cold TED (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol). Extracts were prepared using a polytron PT-10 (Koutsilieris et al, 1992). The homogenates were

centrifuged at 30,000 Xg at 4°C for 30 min, and 200 ml of cytosol was incubated for 12 to 18 h at 0 to 4°C with 1 to 20 nM of ³H-dexamethasone in the presence and absence of excess unlabeled steroid. Incubation was stopped by adding 200 ul of 5% charcoal (containing 1% bovine gamma globulin in TED and 0.5% dextran T-70) for 10 min at 4°C. The samples were centrifuged at 2,000 Xg for 10 min at 4°C. Radioactivity (bound fraction) was determined in 200 µl of the supernatant mixed with 8 ml of scintillation liquid in scintillation vials and counted by a scintillation counter, with a counting efficiency of 50% (Koutsilieris et al, 1992).

DNA-GR interaction. The DNA-protein binding assays were carried out by band-shift analysis on gel electrophoresis using cell extracts prepared from MG-63 and CV-1 cells treated with or without dexamethasone (10^{-7} M for 30 min. The proteins bound to the radioactive DNA were separated by gel electrophoresis (Harris et al, 1985; Reyes-Moreno et al, 1995). CV-1 cells which are known to lack steroid hormone receptors were used as negative controls (Govindan et al, 1991). Semiconfluent MG-63 and CV-1 cell cultures were incubated for 30 min with 10^{-7} M of dexamethasone and then homogenized using the extraction buffer (0.6 M KCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 20% glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin) and centrifuged at 10,000g for 10 min; 5 µg of protein cell extracts was used for binding assays. Synthetic oligonucleotide glucocorticoid responsive element (GRE) 5' AGAACACAGTGTCT3' and complementary lower strands were end-labeled using (³²P) ATP and T4-polynucleotide kinase. The labeled oligonucleotides were annealed and purified by DNA-cellulose chromatography (Harris et al, 1985; Govindan et al, 1991; Reyes-Moreno et al, 1995). For each binding assay; 10,000 counts per min of labeled-annealed oligonucleotides were used in the presence of 50 mg/ml poly d(I) poly d(C) (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). The receptor-DNA complexes were separated on 4% polyacrylamide gel using TBE (22.5 mM Tris-borate, 0.5 mM EDTA, pH 8) as electrophoresis buffer at room temperature. The gels were dried and autoradiographed by Kodak XAR-5 films using intensifying screens at -20°C.

Statistical analysis. Differences in group means were assessed for statistical significance using the one-tailed multiple comparison procedure of Dunnett only when treatments were compared with control values. When single comparisons were made, Student's *t*-test was used.

RESULTS

Detection of functional GR in MG-63 cells. The GR in MG-63 cells had an association constant similar to that of wild-type hGR. The association constant was $0.35 \pm 0.15 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ and the GR number was $444 \pm 55 \text{ fmol per mg of protein (X} \pm \text{SE)}$ (Fig. 1). These data were in agreement with previous reports studying GR in osteoblast-like cells (Chen et al, 1986).

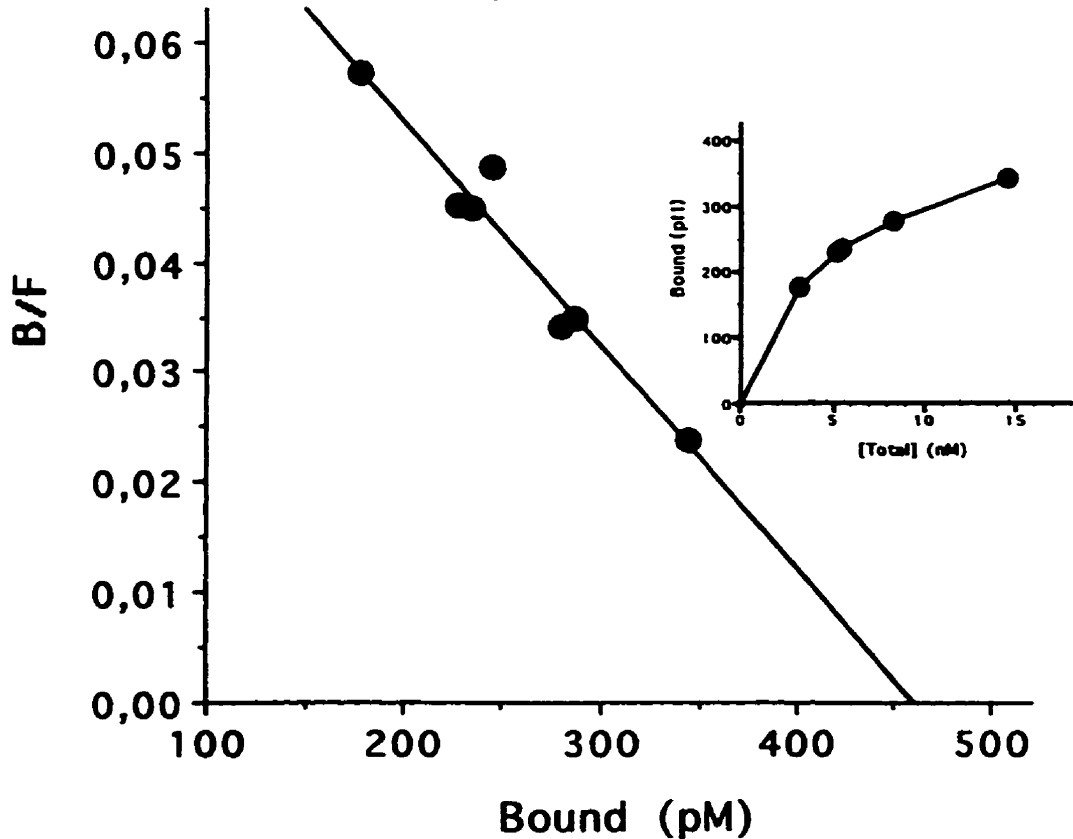


Fig. 1: An example of the Scatchard analysis of tritiated dexamethasone binding sites in MG-63 cell extracts, as described in Materials and Methods. In this experiment K_a was $0.35 \pm 0.15 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ and the GR number was $444 \pm 55 \text{ fmol per mg of protein (X} \pm \text{SE)}$. The insert presents the saturation curve of tritiated dexamethasone binding in MG-63 cell extracts.

To investigate further the function of GR in MG-63 cells, we analyzed the ability of activated GR (GR-ligand complexes) to bind radiolabeled DNA detected by DNA band-shift analysis (Fig. 2). The band-shift analysis on gel electrophoresis was done with and without 10-fold and 100-fold molar excess of radioinert DNA using cell extracts of MG-63 cells preincubated with or without 10^{-7} M of dexamethasone for 30 min. Activated GR could bind radiolabeled DNA (Fig. 2; lanes

6-8). Specificity was determined by (a) the absence of the corresponding radiolabeled DNA-GR bands in extracts of CV-1 cells known to lack the expression of steroid receptors (Fig. 2; lanes 1-4), (b) the absence of DNA-GR radioactive band in negative control experiments containing no protein (Fig. 2; lane 5), and (c) the decreased density of the GR-DNA radioactive band with excess radioinert DNA (Fig. 2; lanes 7 and 8). Therefore, we concluded that MG-63 cells contained GR of intact DNA binding capacity.

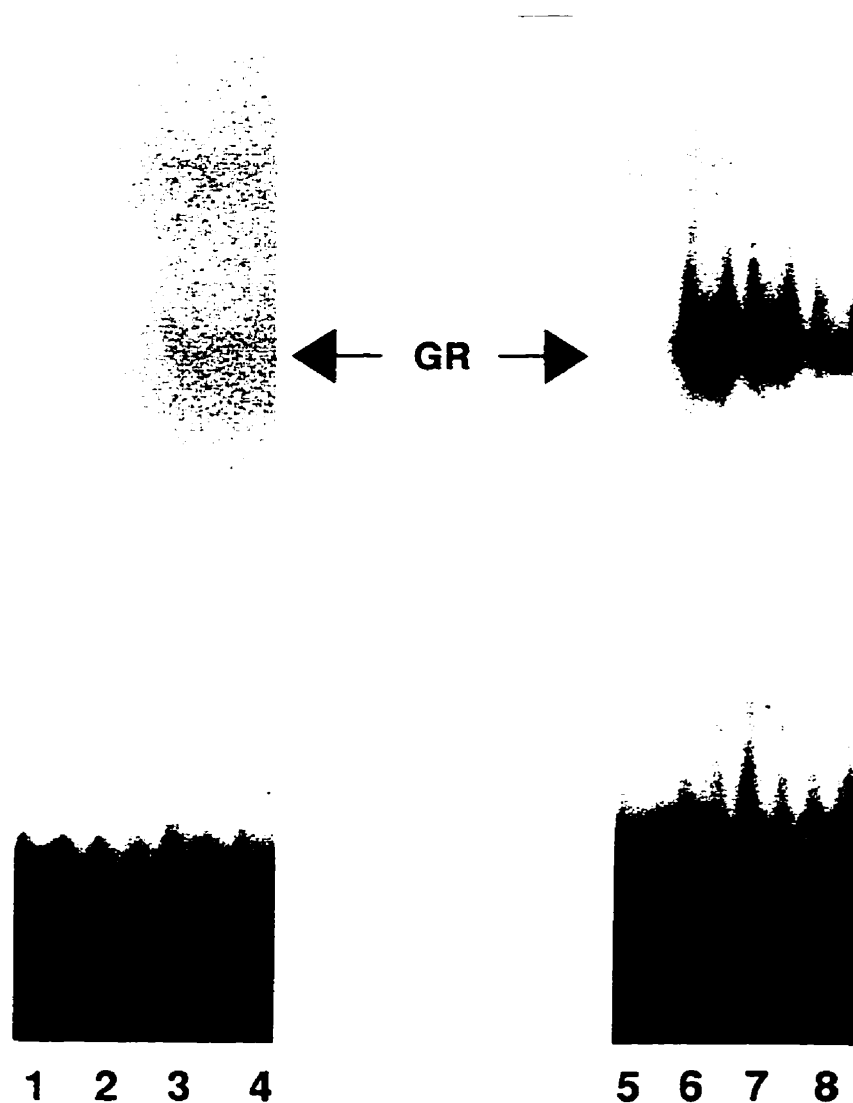


Fig. 2: DNA band-shift analysis in CV-1 cell extracts (lanes 1-4) and MG-63 cells (lanes 6-8). Note the absence of glucocorticoid (GR)-DNA radiolabeled band in CV-1 cell extracts (negative control experiments); lane 1 = nontreated CV-1 cell extracts, lane 2 = CV-1 cell extracts preincubated with 100 nM of dexamethasone, and lanes 3 and 4 = as in lane 2 but analyzed with 10-fold and 100-fold molar excess of radioinert DNA, respectively. Lane 5 = negative experiment (analysis without cell extract). The GR-ligand complexes of MG-63 cell extracts preincubated with 10^{-7} M of dexamethasone for 30 min bound to radiolabeled DNA (lane 6). Incubation with 10-fold and 100-fold molar excess of radioinert DNA decreased the intensity of the DNA-GR-ligand band in MG-63 cells (lane 7 = 10-fold molar excess, and lane 8 = 100-fold molar excess).

The ability of GR in MG-63 cells to bind DNA does not preclude intact transcription activity. Therefore, we tested whether increasing concentrations of dexamethasone stimulated the transcription activity in MG-63 cells. This test comprised measuring the increasing levels of CAT activity in transiently transfected MG-63 cells with the MMTV-CAT chimeric gene in the presence of the β -galactosidase expression vector CH 110. Dexamethasone stimulated the transcription activity of MMTV-CAT chimeric gene (Fig. 3; lanes 2-5). Trans-activation of MMTV-CAT chimeric gene with 10^{-7} M of dexamethasone was completely blocked by 10^{-6} M of RU486, a glucocorticoid and progesterone receptor blocker (Fig. 3; lane 6). RU486 (10^{-6} M) had no effect on the transcription activation of MMTV-CAT reporter gene (Fig. 3; lane 7). Therefore, GR in MG-63 cells was transcriptionally active.

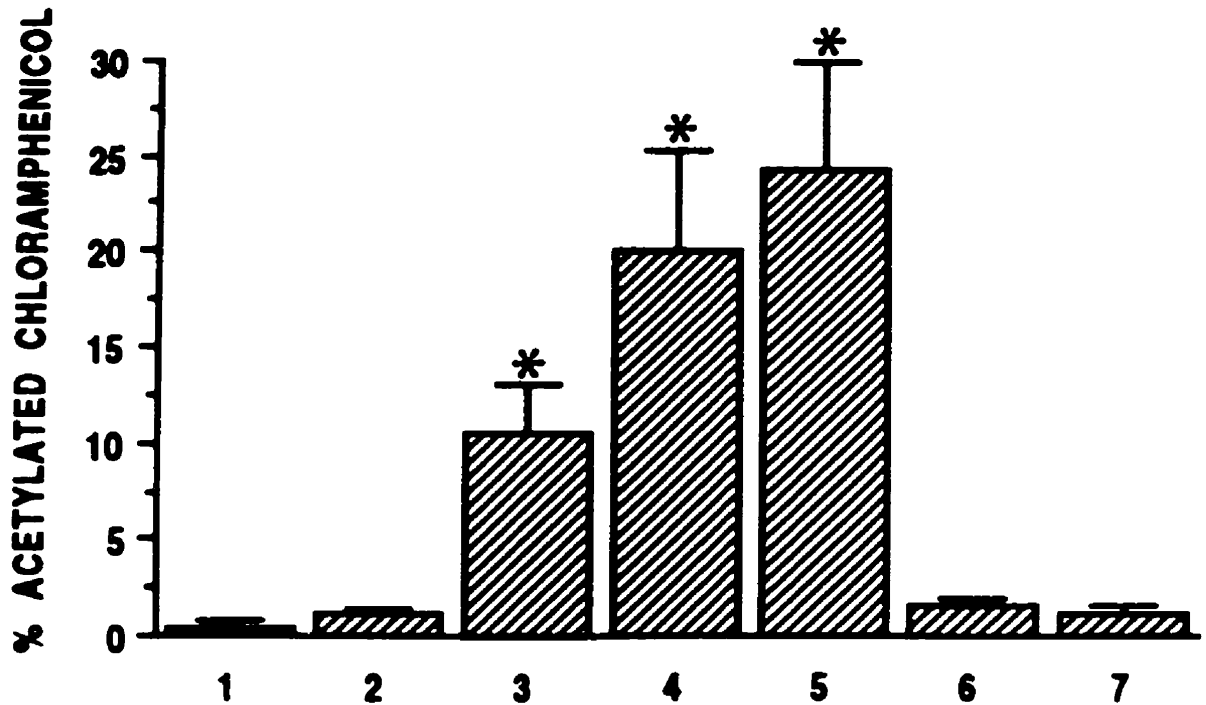


Fig. 3: Endogenous glucocorticoid receptor transcription activity in MG-63 cells transiently transfected with the mouse mammary tumor virus-thymidine kinase-chloramphenicol acetyltransferase (MMTV-CAT) reporter gene as described in Materials and Methods. Lane 1 = basal levels of CAT activity in MG-63 transfectants, and lanes 2-5 = CAT activity in MG-63 transfectants incubated for 30 min with dexamethasone lane 2 = 10^{-10} M, lane 3 = 10^{-9} M, lane 4 = 10^{-8} M, and lane 5 = 10^{-7} M. Dexamethasone's stimulation (10^{-7} M) was blocked by 10^{-6} M RU486 (lane 6). RU486 (10^{-6} M) did not increase CAT activity in MG-63 cells (lane 7).

Biological relevance of GR function for the proliferation and cell growth of MG-63 cells. Incubation of MG-63 cells with increasing concentrations of dexamethasone decreased the expected rate of cell growth and proliferation of MG-63 cells in the control cell cultures as detected by (a) the decreased rate of the expected tritiated thymidine incorporation (cpm/mg DNA) after 24 h of incubation (Fig. 4, upper panel), (b) the decreased of the expected DNA content (mg/well) after 48 h of incubation (Fig. 4, middle panel), and (c) the decreased of the expected number of MG-63 cells after 4 days of incubation with dexamethasone (Fig. 4, lower panel). RU486 (10^{-6} M) did not significantly alter the rate of MG-63 cell growth (Fig. 4, middle panel; lane F, and lower panel; lane D) but completely reversed dexamethasone's inhibition (10^{-7} M) of MG-63 cells (Fig. 4, middle panel; lane D, and lower panel; lane B).

Using flow cytometry to analyze the phase distribution of MG-63 cells into the cell cycle, we documented that 10^{-7} M of dexamethasone significantly enhanced the distribution of MG-63 cells at the G_1/G_0 phase (from $47.6\% \pm 1.2$ to $64\% \pm 2.6$; $X \pm SE$; $p < 0.05$), consequently decreasing the distribution of MG-63 cells at the S + G_2/M phase in the cell cycle. This was suggestive of an arrest (block or prolongation) of the progression of MG-63 cells in the G_1/G_0 phase. No microscopic evidence of apoptosis (detachment of MG-63 cells from wells) was noted in MG-63 cells after 48 h of treatment with 10^{-7} M of dexamethasone.

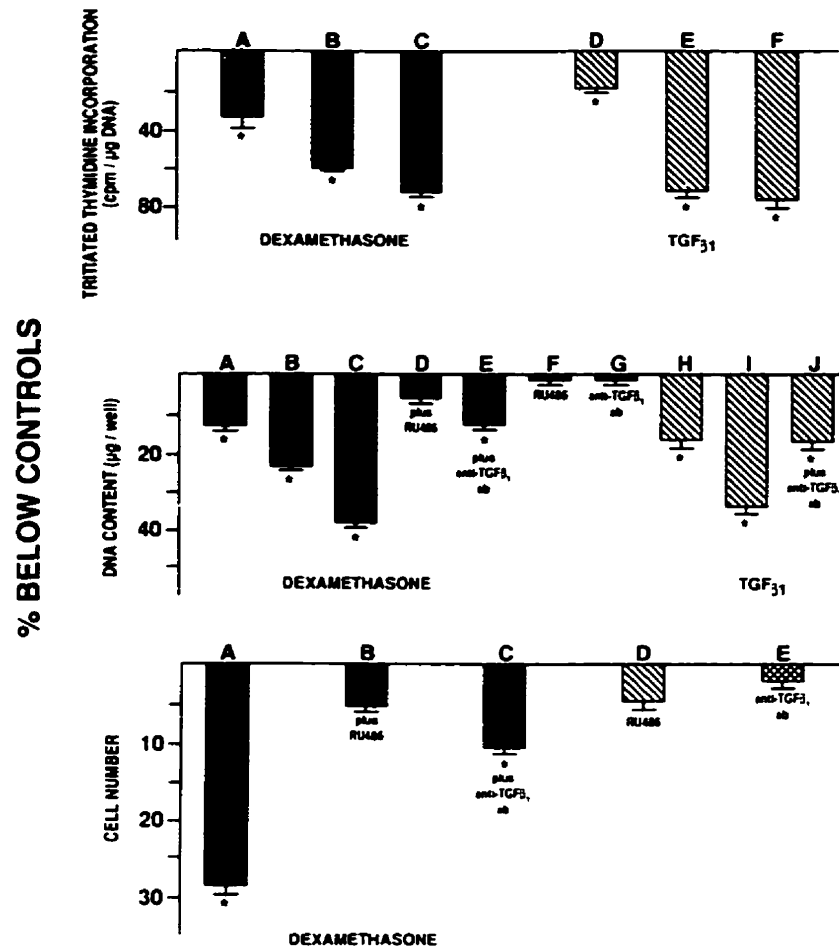
Fig. 4 (next page):

Upper panel: Decreasing rate of tritiated thymidine incorporation in MG-63 cells after 24 h of incubation with increasing doses of dexamethasone (A= 10^{-9} M, B= 10^{-8} M, and C= 10^{-7} M) and TGF- β 1 (D=1 ng/ml, E=10 ng/ml, F=25 ng/ml). Tritiated thymidine incorporation in control cell was $5,443 \pm 166$ ($X \pm SE$). Experiments were performed as described in Materials and Methods section.

Middle panel: Decreasing of the expected DNA content in MG-63 cells after incubation with increasing doses of dexamethasone (A= 10^{-9} M, B= 10^{-8} M, and C= 10^{-7} M) and TGF- β 1 (H=10 ng/ml, I=25 ng/ml). The DNA content in control cell culture was $= 1.44 \pm 0.15$ (mg/well; $X \pm SE$). RU486 (10^{-6} M) and anti-TGF- β 1 ab (10 mg/ml) produced no effect in MG-63 cell growth (lanes F and G, respectively). RU486 (10^{-6} M) blocked the dexamethasone's inhibition (10^{-7} M) (lane D); and anti-TGF- β 1 ab (10 mg/ml) partially blocked the dexamethasone (10^{-7} M) and TGF- β 1 (25 ng/ml) inhibition of MG-63 cells (lanes E and J, respectively).

Lower panel: The expected number of MG-63 cells was decreased after incubation with 10^{-7} M of dexamethasone (A= 10^{-7} M) for 4 days. RU486 (10^{-6} M) (lane B) and anti-TGF- β 1 (10 mg/ml) (lane C) blocked the dexamethasone's (10^{-7} M) inhibition of MG-63 cells. RU486 (10^{-6} M) and anti-TGF- β 1 ab (10 mg/ml) have no effect on MG-63 cell growth.

Figure 4 (see text above):



Possible mediators of glucocorticoid inhibition of the growth of MG-63 cells. TGF-β1 decreased the rate of proliferation of MG-63 cells (Fig. 4, upper panel D; lanes E and F) and of the cell growth (Fig. 4, middle panel; lanes H and I). Although anti-TGF-β1 polyclonal antibodies at a final concentration of 10 mg/ml did not affect the growth of MG-63 cells (Fig. 4, middle panel; lane G, and lower panel; lane E), it partially blocked the effect of dexamethasone on MG-63 cells (Fig. 4, middle panel; lane E, and lower panel; lane C). In addition, as expected it partially blocked the TGF-β1 inhibition (50 ng/ml) of MG-63 cells (Fig. 4, middle panel; lane J).

To study the possible mediation of GR function by the expression of TGF- β 1 mRNA, we evaluated the relative expression of TGF- β 1/18S mRNA in MG-63 cells incubated with or without 10^{-7} M of dexamethasone for 12, 24, and 48 h. Northern analysis revealed that the relative expression of TGF- β 1/18S mRNA in treated MG-63 cells did not significantly differ from the relative expression of TGF- β 1/18S mRNA in control MG-63 cells (Fig. 5).

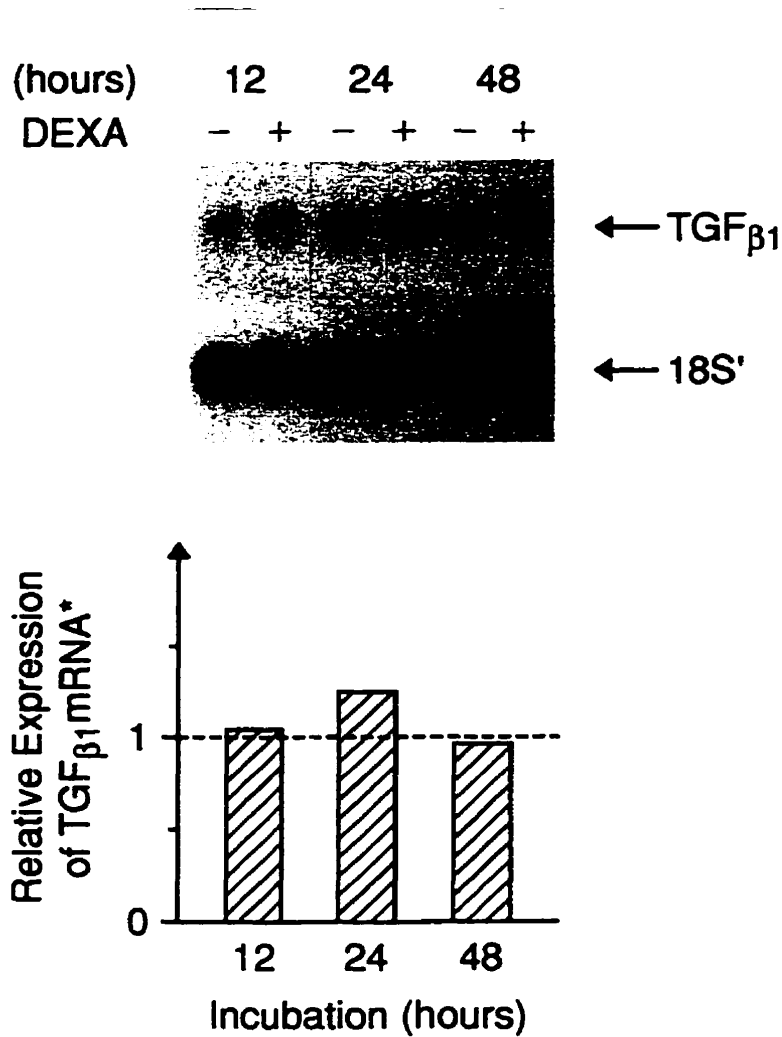


Fig. 5: Northern analysis of the relative expression of TGF- β 1/18S in MG-63 cells as described in Materials and Methods. No difference was found in the relative expression of TGF- β 1/18S mRNA between treated and control cells incubated for 12, 24, and 48 h with 10^{-7} M of dexamethasone or vehicle. The experiment was performed as described in the Materials and Methods.

In contrast to the expression of mRNA in cells, the levels of active TGF- β 1 were remarkably higher in MG-63 CM incubated with 10^{-7} M of dexamethasone than in control MG-63 CM treated with vehicle (V) for 48 h {(V) = 0.56 ± 0.1 and (DEXA) = 1.56 ± 0.1 ng/ml; $p < 0.001$; ($X \pm SE$)}. The TGF- β 1 levels did not differ significantly between the CM of MG-63 cells treated and nontreated with dexamethasone for (a) 12 h (V) = 0.24 ± 0.08 ; (DEXA) = 0.28 ± 0.10 , and (b) 24 h: (V) = 0.34 ± 0.09 ; (DEXA) = 0.45 ± 0.05 ng/ml; ($X \pm SE$) (Fig. 6).

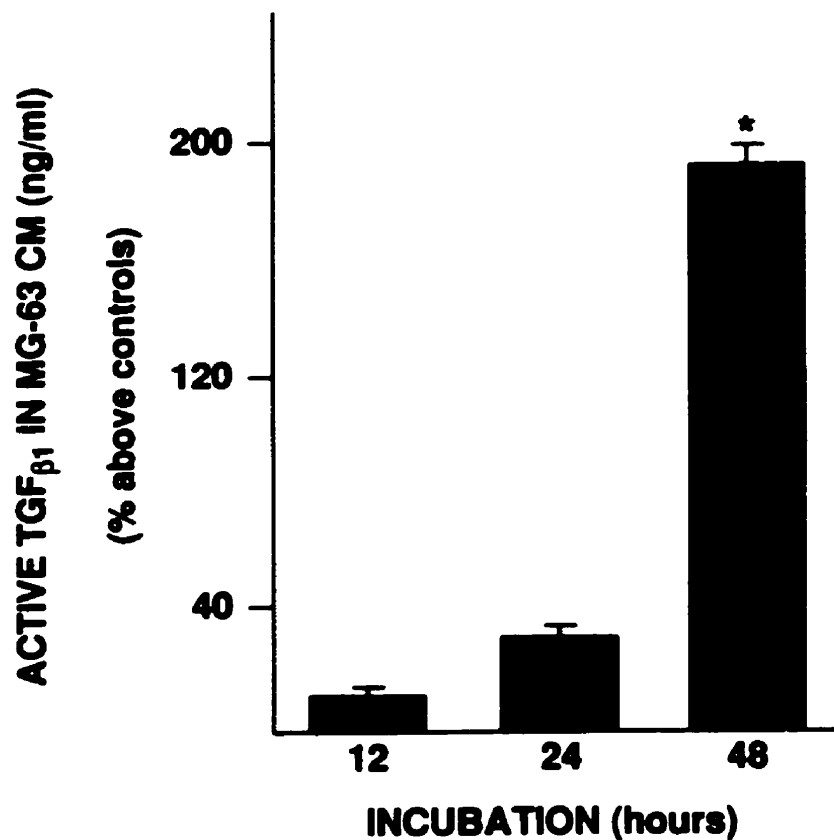


Fig. 6: Determination of active TGF- β 1 levels in MG-63 conditioned media (CM) as described in the Materials and Methods. There was no significant increase after 12 and 24 h of incubation with 10^{-7} M of dexamethasone in the treated MG-63 CM compared with control MG-63 CM. The levels of active TGF- β 1 was significantly increased after 48 h of incubation as measured by ELISA assay (R & D Systems).

DISCUSSION

Although the clinical use of long-term therapy with glucocorticoids leads to a remarkable decrease in bone mass and to pathologic fractures in humans (Peck et al, 1984; Chen et al, 1986), *in vitro* the GR function induces the differentiation of osteoprogenitor cells (Kamalia et al, 1992). The seemingly paradoxical effects of glucocorticoids *in vitro* suggests that dexamethasone can induce the differentiation of osteoprogenitor cells while concurrently inhibiting the proliferation of osteoprogenitor cells and osteoblasts, which in turn decreases the number of mature osteoblasts after long-term therapy, leading to net bone loss *in vivo* (Cheng et al, 1994).

The GR function in bones depends on the following: (a) the differential expression of the osteogenic factors involved in the autocrine regulation of osteoprogenitor cells and osteoblasts (Centrella et al, 1994), (b) the differential expression of growth factor receptors and other growth factor-binding proteins, such as insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and TGF β -binding proteins (Koutsilieris, 1995; Centrella et al, 1994), (c) modulation of the expression of extracellular matrix proteins (Heino and Massague, 1989; Koutsilieris, 1995); and (d) modulation of protease activity, such as the plasminogen activator/plasmin system (Allan et al, 1991; YEE et al, 1993; Koutsilieris, 1995; Koutsilieris et al, 1993) and cathepsin-B and -D (Oursler et al, 1993).

We used the MG-63 osteoblast-like human osteosarcoma cells as an *in vitro* system for studying the possible mediation of GR function by TGF- β 1 expression in bone cells. Our studies documented the functional integrity of the GR in MG-63 cells as analyzed by ligand binding assays, DNA band-shift analysis, and transcription activity of the MMTV-CAT reporter gene in transiently transfected MG-63 cells. Dexamethasone and TGF- β 1 inhibited the growth and proliferation of MG-63 cells. Anti-TGF- β 1 antibody neutralized dexamethasone's inhibition of MG-63 cells, and dexamethasone increased the levels of active TGF- β 1 in MG-63 CM without altering the expression of TGF- β 1 mRNA in short-term cultures (12 up to 48 h).

There are conflicting reports in the literature regarding the effects of TGF- β 1 on osteoblasts. TGF- β 1 is a multipotential cytokine that influences bone formation and resorption. It is synthesized as a high-molecular-weight precursor that is proteolytically processed before secretion, to yield a mature 12.5-kDa TGF- β 1 peptide and a 100-kDa latency associated peptide (LAP). Secreted TGF- β 1 (latent-TGF- β 1) comprises two 12.5-kDa peptides covalently linked

via disulfide bonding and two LAP propieces noncovalently associated with the TGF- β 1 peptide dimer; this is the form of TGF- β 1 secreted by osteoblasts. The role of TGF β s in bone physiology and pathology was been recently summarized by Centrella et al 1994. Various steroid hormones appear to have important regulatory effects on local TGF β s expression in bone. Because the effects of TGF β s are biphasic and distinct variations exist in the relative potency of the TGF β isoforms (TGF- β 1-3) in bones, changes in the expression and activation of specific TGF β s may account for a particular cell type regulation (Johnson et al, 1993; Centrella et al, 1994).

In our study dexamethasone's inhibition of MG-63 cells was reversed by an anti-TGF- β 1 antibody. Therefore, it is conceivable that TGF- β 1 can mediate GR function in MG-63 osteosarcoma cells. Previous studies (Oursler et al, 1993) reported that dexamethasone (10^{-8} M for 48 h) has no significant effect on the expression of TGF- β 1 mRNA in primary cultures of enzymatically prepared normal human osteoblasts (hOBs). In that report, although a dexamethasone-dependent increase for up to 90% of the TGF- β 1 activity was detected in hOBs CM after 48 h of incubation it did not affect the TGF- β 1 expression at either the mRNA or peptide levels. Therefore, the authors suggest that dexamethasone can activate latent TGF- β 1 by upmodulating the expression of proteases such as cathepsin-B and -D (Oursler et al, 1993).

Our study also found that dexamethasone does not modulate the expression of TGF- β 1 mRNA in MG-63 osteoblast-like human osteosarcoma cells. Therefore, the anti-TGF- β 1 antibody reversal of dexamethasone's inhibition was probably caused by activation of latent TGF- β 1. The quantitative analysis of active TGF- β 1 confirmed higher TGF- β 1 levels in MG-63 CM preincubated with dexamethasone than in control MG-63 CM. Therefore, we conclude that dexamethasone also increases active TGF- β 1 levels without affecting its expression in MG-63 osteoblast-like osteosarcoma cells. Because we and others have documented that GR function in various cancer cell lines GR is mediated by TGF- β 1 expression (Reyes-Moreno et al, 1995; Johnson et al, 1993), it is temping to speculate that mediation of GR function by the activation of latent-TGF- β 1 probably is an osteoblast-specific regulation.

The Saos-2 osteoblast-like human osteosarcoma cells, after long-term exposure to dexamethasone, express phenotype corresponding to better differentiated osteoblasts compare with the original Saos-2 cells (Rao et al, 1994). Corroborating data exist suggesting that TGF- β 1 potentiates the differentiation of osteoblasts (Cheng et al, 1994). In addition, there are also data suggesting that the increasing TGF- β 1 activity, in its turn, can stimulate the expression of TGF-

β 1 mRNA in long-term cultures (Obberghen-Schilling et al, 1988). Therefore, it is possible that expression of the well-differentiated phenotype in osteoblast-like cells, after long-term treatment with dexamethasone, can be simply caused by the effects of increasing TGF- β 1 action in human osteosarcoma cells.

In the context of prostate cancer therapy, the use of glucocorticoids provided some evidence for a subjective and in a few cases an objective clinical response in patients experiencing androgen-insensitive prostate cancer with extensive osteoblastic metastases (Hellmann et al, 1993). In addition, GR function inhibited the cell growth and the proliferation of androgen-independent human prostate cancer cells (Reyes-Moreno et al, 1995). Therefore, it is tempting to postulate that high-dose treatment with dexamethasone can alter the evolution of osteoblastic metastases in the advanced prostate cancer patients progressing to the androgen-insensitive stage of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

J. B. holds a studentship award from the Medical Research Council of Canada (MRC), and C. R-M. holds a studentship award from the Fonds de la Recherche en Sante du Quebec (FRSQ). M. K. is a Scholar (Chercheur-Boursier) of the FRSQ. This study was partially supported by a grant from the Cancer Research Society, Inc., of Montreal (CRS, Inc) to M. K.. The authors thank Dr. M. V. Govindan for technology transfer and Mr. G. Frenette for excellent technical assistance.

REFERENCES

- ALLAN, E.H., ZEHEB, R., GELEHTER, T D., HEATON, J.H., FUKUMOTO, S., YEE, J.A. and MARTIN, T.J., Transforming growth factor beta inhibits plasminogen activator (PA) activity and stimulates production of urokinase-type PA, PA-inhibitor-1 mRNA, and protein in rat osteoblast-like cells. *J. Cell Physiol.*, **149**, 34-43 (1991).
- CENTRELLA, M., HOROWITZ, M.C., WOZNEY, J.M. and McCARTHY, T.L., Transforming growth factor-b gene family members and bone. *Endocr. Rev.*, **15**, 27-39 (1994).
- CHEN, T.L., HAUSCHKA, P.V., CABRALES, S. and FELDMAN, D., The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures:receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses. *Endocrinology*, **118**, 250-259 (1986).
- CHENG, S-L., YANG, J.W., RIFAS, L., ZHANG, S-F. and AVIOLI, L.V., Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro:induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, **134**, 277-286 (1994).
- EVANS, R. M., The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895 (1988).
- GOVINDAN, M.V., LECLERC, S., Roy, R., RATHANASWAMY, P. and XIE, B., Differential regulation of mouse mammary tumor virus bacterial chloraphenicol acetyltransferase chimeric gene by human mineralocorticoids hormone binding and transactivation by androgen receptor. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 91-103 (1991).
- HARRIS, B., A., ROBISHAW, J.D., MUNDY, S.M. and GILMAN, A.G., Molecular cloning of complementary DNA for the alpha subunit of G protein that stimulates adenylate cyclase. *Science*, **229**, 1274-1277 (1985).
- HEINO, J. and MASSAGUE, J., Transforming growth factor-b switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol. Chem.* **264**, 21806-21811 (1989).
- HELLMANN, K., PHILIPS, R.H. and GOLD, M., High dose dexamethasone and base of brain irradiation for hormone refractory metastatic carcinoma of the prostate. *Clin. Exp. Metastasis*, **11**, 227-229 (1993).
- JONAT, C., RAHNASDORF, H.J., PARK, K.K., CATO, A.C.B., GEBEL, S., PONTA, H. and HERRLICH, P., Antitumor promotion and antiinflammation:down-regulation of AP-1 (*fos/jun*) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, **60**, 1189-1204 (1990).
- JOHNSON, B.H., GOMI, M., JACOWLEW, S.B., MORIWAKI, K. and THOMSON, E.B., Actions and interactions of glucocorticoids and transforming growth factor b on two related human myeloma cell lines. *Cell Growth Differ.*, **4**, 25-30 (1993).

JUKKOLA, A., RISTELI, L., MELKKO, J., and RISTELI, J., Procollagen synthesis and extracellular matrix deposition in MG-63 osteosarcoma cells. *J. Bone Mineral Res.*, **8**, 651-657 (1993).

KAMALIA, N., McCULLOCH, C.A.G., TANENBAUM, H.C. and LINEBACK, H., Dexamethasone recruitment of self-renewing osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell cultures. *Blood*, **79**, 320-326 (1992).

KOUTSILIERIS, M., Osteoblastic metastases in advanced prostate cancer: cell biology and therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **18**:51-64 (1995).

KOUTSILIERIS, M., FRENETTE, G., LAZURE, C., LEHOUX, J-G., GOVINDAN, M., V. and POLYCHRONAKOS, C., Urokinase-type plasminogen activator: a paracrine factor regulating the bioavailability of IGFs in the PA-III cell-induced osteoblastic metastases. *Anticancer Res.*, **13**, 481-486 (1993).

KOUTSILIERIS, M., GRONDIN, F. and LEHOUX, J-G., The expression of mRNA for glucocorticoid receptor gene and functional glucocorticoid receptors detected in PA-III rat prostate adenocarcinoma cells. *Anticancer Res.*, **12**, 899-904 (1992).

OBBERGHEN-SCHILLING, E., ROCHE, N.S., FLANDERS, K.C., SPORN, M.B. and ROBERTS, A.B., Transforming growth factor b1 positively regulates its own expression in normal and transfected cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7741-7746 (1988).

OURSLER, M.J., RIGGS, L. and SPELSBERG, T.C., Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor-b by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, **133**, 2187-2196, 1993.

PECK, W., GENNARI, C. and RAISZ, L., Corticosteroids and bone. *Calcif. Tissue Int.*, **36**, 3-7 (1984).

RAO, L.G., WYLIE, J.N., SUTHERLAND, M.S.K. and MURRAY T.M., 17 β -estradiol and parathyroid hormone potentiate each other's stimulatory effects on alkaline phosphatase activity in Saos-2 cells in a differentiation-dependent manner. *Endocrinology*, **134**, 624-620 (1994).

REYES-MORENO, C., FRENETTE, G., BOULANGER, J., LAVERGNE, E., GOVINDAN, M.V. and KOUTSILIERIS, M., Mediation of glucocorticoid receptor function by transforming growth factor beta 1 expression in human PC-3 prostate cancer cells. *Prostate*, in press (1995).

SYMS, A.J., NORRIS, J.S. and SMITH, R.G., Autocrine regulation of growth: I. Glucocorticoid inhibition is overcome by exogenous platelet derived growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 68-74 (1984).

YEE, J.A., YAN, L., DOMINGUEZ J.C., ALLAN, E.H. and MARTIN, T.J., Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF β) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J. Cell Physiol.*, **157**, 528-534 (1993).

CHAPITRE IV

**L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES
AGIRAIT COMME MODULATEUR DES INTERACTIONS
CELLULE-CELLULE AU NIVEAU DES MÉTASTASES
OSTÉOBLASTIQUES CHEZ LE RAT**

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'état fonctionnel du récepteur des glucocorticoïdes (GR) et sa capacité à moduler les interactions cellule-cellule entre les cellules PA-III du cancer de la prostate de rat et les ostéoblastoïdes UMR-106, dérivées d'un ostéosarcome chez le rat. Ces cellules ont été utilisées en tant que modèle *in vitro* pour étudier l'activité biologique du GR dans les tumeurs induites par les cellules PA-III au niveau du squelette chez le rat et la subséquente réaction ostéoblastique observée. L'état fonctionnel du GR des deux lignées cellulaires a été déterminé par des essais de liaison à l'hormone, par des essais de retardement sur gel et par des essais d'activité transcriptionnel du GR dans les cellules PA-III et UMR-106 transfectées de façon transitoire avec le gène rapporteur MMTV-tk-CAT. Le dexaméthasone et le facteur transformant de type beta 1 (TGF- β 1) inhibent la prolifération cellulaire des deux lignées cellulaires. L'inhibition observée par la dexaméthasone a été renversée par les facteurs de croissance IGF-I (*insulin-like growth factor I*) et PDGF (*platelet-derived growth factor*) ainsi que par un anticorps anti-TGF- β 1. L'IGF-I, le PDGF, l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), le milieu conditionné des cellules UMR-106 (CM UMR-106) et celui des cellules du cancer de la prostate PA-III (CM PA-III) stimulent la prolifération des deux lignées cellulaires. Les effets mitogéniques de l'uPA, de l'IGF-I et du CM PA-III sur les cellules UMR-106 ont été neutralisés en présence d'un anticorps anti-IGF-I. De plus, le dexaméthasone exerce une régulation différentielle sur l'expression des ARNm du TGF- β 1 (augmentation) et de l'uPA (diminution) dans les cellules PA-III sans affecter de façon apparente l'expression de l'ARNm de TGF β 1 et uPA dans les cellules UMR-106. Ces données suggèrent donc que TGF- β 1, uPA et IGF-I pourraient moduler au moins en partie les interactions cellule-cellule et agir comme médiateurs de l'activité biologique du GR dans les cellules PA-III du cancer de la prostate et les ostéoblastoïdes UMR-106.

GLUCOCORTICOID RECEPTOR FUNCTION POSSIBLY MODULATES CELL-CELL INTERACTIONS IN OSTEOLASTIC METASTASES ON RAT SKELETON.

CARLOS REYES-MORENO AND MICHAEL KOUTSILIERIS

Molecular Endocrinology Laboratory, Research Center, Centre Hospitalier de L'Universite Laval (C.H.U.L), St. Foy, Quebec, G1V 4G2, Canada.

Running title: GR function in PA-III prostate cancer and UMR 106 osteosarcoma cells.

Key Words: osteoblastic metastasis, prostate cancer, urokinase-type plasminogen activator, insulin-like growth factor I, transforming growth factor β 1.

Article publié dans Clinical and Experimental Metastasis, 15:205-217, 1997.

ABSTRACT

We analyzed the glucocorticoid receptor (GR) function and its ability to modulate cell-cell interactions between the PA-III rat prostate cancer and UMR 106 osteoblast-like rat osteosarcoma cells as *in vitro* model for studying GR function in PA-III cell-induced tumor and blastic reaction in rat bone. Intact GR was detected by ligand binding assays, DNA band-shift, and GR *trans*-activation analysis of PA-III and UMR 106 cells transiently transfected with the mouse mammary tumor virus-thymidine kinase-chloramphenicol acetyltransferase reporter gene. Dexamethasone and transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) inhibited the growth of PA-III and UMR 106 cells. Dexamethasone's inhibition of PA-III and UMR 106 cells was reversed by anti-TGF β 1 antibody and exogenous insulin-like growth factor I (IGF-I). Exogenous IGF-I, urokinase-type plasminogen activator (uPA), UMR 106 conditioned media (CM) and PA-III CM stimulated the proliferation of PA-III and UMR 106 cells. The mitogenic activity exerted by uPA and PA-III CM in UMR 106 cells was completely neutralized by anti-IGF-I specific antibody. In addition, dexamethasone up regulated TGF β 1 mRNA and down regulated uPA mRNA expression in PA-III cells without affecting TGF β 1 and uPA mRNA expression in UMR 106 cells. These data suggested that TGF β 1, uPA, and IGF-I mediate at least in part cell-cell interactions and GR function in PA-III prostate cancer and UMR 106 osteosarcoma cells.

INTRODUCTION

Although rat and human prostate and several prostate cancer cell lines contain glucocorticoid receptor (GR) the importance of GR function in the biology of prostate cancer remains hypothetical. (1-3) GR is a *trans*-acting protein whose action depends on the particular DNA recognition sequence (glucocorticoid responsive element; GRE) within the upstream regulatory region of GR-regulated genes. (1,4) GR function also depends on protein-protein interactions, such as the *jun/fos* transcription complex (5) and autocrine factors, such as transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and platelet-derived growth factor in certain *in vitro* systems. (3,6-8)

Spontaneously developed prostate cancer tumors in aged germ-free Lobund-Wistar (L-W) rats (PA tumors) have given birth to four transplantable androgen-insensitive prostate cancer cell lines (PA-I, -II, -III, and -IV cells). (9-11) The PA cells exhibited selective metastatic potential to various visceral organs in L-W rats. (9,10) In addition, transplantation of PA-III rat prostate cancer cells over the scapula, calvaria, and tibia of Lobund-Wistar rats produced PA-III cell-induced tumors and blastic reaction in rat bones. (9,11) This osteoblastic reaction was microscopically similar to woven bone produced by the metastatic prostate cancer cells in human skeleton. (11-15)

Recently, several studies have documented the pivotal role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the pathophysiology of blastic reaction produced by metastatic prostate cancer cells in bone. (16-18) The selective mitogenic activity exerted by uPA in rat and human osteoblast-like osteosarcoma cells was attributed either to its N-terminal domain the so called "growth factor domain-GFD" (16) or its catalytic COOH-terminal domain capable of activating plasminogen to plasmin, thereby producing limited hydrolysis locally. (17,18) The latter was documented

that produces limited proteolysis of insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) (17-19) and latent-transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) (20-24), which in turn can increase bioavailability of IGFs and activate TGF β 1 in bone matrix. In this context, uPA/plasmin/TGF β 1/IGFs/IGFBPs interactions was postulated to play an important role for both the metastatic growth of prostate cancer cells and blastic reaction in rat and human bone. (22,23)

To analyze the possible role of GR function in androgen-insensitive PA-III cell-induced tumors and the subsequently produced blastic reaction in rat skeleton, we first characterized GR in PA-III prostate cancer and UMR 106 osteosarcoma cells. These cells have been successfully used in the past as *in vitro* models for studying biology of androgen insensitive prostate cancer cells and osteoblast-like cells, respectively. (22,23) Then we assessed possible mediators of GR function in PA-III and UMR 106 cells, evaluating the interplay between GR function and PA-III/UMR 106 cell conditioned media (CM), TGF β 1, uPA, and IGF-I to control the growth of PA-III and UMR 106 cells. In addition, we analyzed the ability of GR function to regulate the expression of TGF β 1 and uPA mRNA in PA-III and UMR 106 cells.

Herein we report that GR function (i) differentially modulated the expression of TGF β 1 (up regulation) and uPA (down regulation) mRNA in PA-III cells, (ii) increased TGF β 1 activity in UMR 106 cells without affecting the expression of TGF β 1 mRNA in UMR 106 cells, and (iii) inhibited the growth of PA-III and UMR 106 cells. In addition, dexamethasone's inhibition of PA-III and UMR 106 cells was neutralized by exogenous IGF-I and anti-TGF β 1 antibody, and uPA and PA-III CM stimulated the proliferation of UMR 106 cells by an IGF-dependent mechanism. Therefore, we conclude that TGF β 1, uPA, and IGF-I are implicated in cell-cell interactions between prostate cancer cells and osteoblast-like cells and TGF β -dependent mechanism mediated at

least in part GR function in PA-III prostate cancer and UMR 106 osteosarcoma cells. Therefore it is conceivable that GR function possibly modulates cell-cell interactions in PA-III cell-induced tumors and blastic reaction in rat bone.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture systems. The PA-III cell line was obtained by Dr. M. Pollard, Lobund Laboratory, University of Notre Dame (Notre Dame, IN). PA-III cells have been successfully grown in our laboratory for more than 10 years. The UMR 106 osteoblast-like osteosarcoma cells and CV-1 cells were obtained from the American Type of Cell Culture (ATCC, Bethesda, MD). The CV-1 cells known to contain no steroid receptors were used as negative controls in the DNA band-shift experiments. (3)

Cells were grown in 75-cm² culture flasks using Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (DMEM/F-12, GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) containing 10% bovine serum (BS). The cells were plated at a cell density of 5×10^4 cells in 24-well plates and grown with DMEM/F-12 medium containing various concentrations (0.5 to 10%) of BS, depending on the experiment. Indices of cell cycle was measured by flow cytometry analyzing DNA content in propidium iodine-stained cells with a counter EPICS 753 pulse cytometer (Coulter counter, Hialeah, FL), (3,6,7) thereby assessing the phase distribution of PA-III and UMR 106 cells in the cell cycle.

Mitogenic activity was assessed by tritiated-thymidine incorporation and DNA content assays in treated cells as compared with reference the values of concurrent control cell cultures. (2,3,13-15) We used the pan-specific anti-TGF β polyclonal neutralizing antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) at a final dilution of 10 μ g/ml (dilution of 5 μ g/ml can neutralize by 50% the activity of 0.25 ng/ml of rhTGF β 1 in cell bioassays) (2) to

test its ability to interact with dexamethasone to control the growth of PA-III and UMR 106 cells. Recombinant human IGF-I and TGF β 1 were also from the R&D Systems. Specific anti-human IGF-I monoclonal neutralizing antibody (UB3-189) able to neutralize also rat IGF-I (3,17,18) was obtained from the National Institutes of Health (NIADDK-NIH, Bethesda, MD). Rat uPA was purified in our laboratory from PA-III CM (17) and human uPA was from Sigma (St. Louis, MI).

Hormone binding assay. PA-III and UMR 106 cells were grown in parallel cell cultures using DMEM/F-12 medium, containing 10% CS in 75-cm² culture flasks. PA-III and UMR 106 cells reaching confluence (approximately 7-d) were collected by trypsinization, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS; 20 mM phosphate, 0.9% NaCl, pH 7.4), and homogenized in ice-cold TED (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 1 mM dithiolthreitol). Extracts were prepared using a polytron PT-10 as previously described. (2,3) The homogenates were centrifuged at 30,000 X g at 4°C for 30 min, and 200 μ l of cytosol was incubated for 12 to 18 h at 0 to 4°C with 1 to 20 nM of ³H-dexamethasone in the presence and absence of excess unlabeled steroid. Incubation was stopped by adding 200 μ l of 5% charcoal (containing 1% bovine gamma globulin in TED and 0.5% dextran T-70) for 10 min at 4°C. The samples were centrifuged at 2,000 X g for 10 min at 4°C. Radioactivity was determined by measurements of 200 μ l preparation which was mixed with 8 ml scintillation liquid in scintillation vials. Counter's counting efficiency was 50%. (3)

DNA-GR interaction. The DNA-protein binding assays were carried out by band-shift analysis on gel electrophoresis using PA-III and UMR 106 cell extracts prepared from confluent PA-III, UMR 106, and CV-1 cells. The proteins bound to radioactive synthetic GRE DNA (see below) separated by gel electrophoresis. (3,25,26) The CV-1 cells known to lack steroid hormone receptors were used as negative controls. (3,26) PA-III, UMR 106, and CV-1

cells were incubated for 30' with 100 nM of dexamethasone to ensure full activation of putative GR and then homogenized using the extraction buffer (0.6 M KCl, 20 mM Tris pH 7.5, 20% glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin) and centrifuged at 10,000 x g for 10'. Five (5) µg of protein extracts was used for binding assays. Synthetic oligonucleotide GRE-US 5'AGAACACAGTGTCT³' and complementary lower strand were end-labeled using ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP and T4-polynucleotide kinase. The labeled oligonucleotides were annealed and purified by DNA-cellulose chromatography. (2,25,26) Ten thousand (10,000) counts per min of labeled-annealed oligonucleotides were used per binding assay in the presence of 50 µg/ml poly d(I) poly d(C) (Pharmacia, Piscataway, NJ). The receptor-DNA complexes were separated on 4% polyacrylamide gel using TBE (22.5 mM Tris-borate, 0.5 mM EDTA, pH 8) as electrophoresis buffer at the room temperature. The gels were dried and autoradiographed by Kodak XAR-5 films using intensifying screens at -20°C.

Transient transfection and assays of CAT activity. We analyzed the ability of endogenous GR to activate gene transcription in PA-III and UMR 106 cells transiently transfected by the MMTV-tk-CAT chimeric gene in the presence of the β -galactosidase expression vector CH110. The reporter plasmid MMTV-tk-CAT was constructed by the 352 bp HaeIII-PvuII fragment of MMTV-long terminal repeat by the addition of BamHI linkers and insertion at the BamHI site of pBLCAT8⁺. The construct contained 224 bp of tk-sequences adjacent to the CAT gene. The region between the TATAAA box and -224 contained all the hormone regulatory elements identified by nitrocellulose binding assay and DNAase-I footprinting. (3,26) The PA-III and UMR 106 cells were cultured in DMEM/F-12 supplemented with 10% charcoal-dextran-treated fetal calf serum, gentamycin (16 µg/ml), and fungizone (1 µg/ml). Then the cells were plated in 100-mm dishes with 4 ml of DMEM/F-12 supplemented with charcoal-treated fetal calf serum (10%) at a density of 6 X 10⁵ cells/plate. After overnight incubation of the cells in a humidified 5% CO₂

incubator, 5 ml of fresh medium was added for 2 h before transfection. Cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation technique, using 10 μ g of reporter plasmid MMTV-CAT and with 5 μ g of β -galactosidase expression vector CH110 (Pharmacia, Montreal, Canada). (3,26) Plasmids purified on a CscI gradient and transiently transfected cells were treated with various concentrations of dexamethasone (Sigma); RU 486, a GR blocker (Roussel, Paris, France); and R1881, a synthetic androgen (Sigma) to assess whether endogenous GR and androgen receptor (AR) can activate transcription in these cells. The precipitate remained in contact with both the PA-III and UMR 106 cells for 6 h. Then cells were treated with 2 ml of 15% glycerol in Hanks' balanced salt solution for 3 min, washed twice, fed with media containing hormones from 1,000 X stock solutions in ethanol and finally harvested after 24 h for CAT assays as described previously. (2,26) Aliquots containing 10 units (U) of β -galactosidase were used to determine CAT activity in these experiments. Results were expressed as mean of triplicate experiments done under identical conditions. (2,26)

Extraction of mRNA and analysis by Northern blots. Confluent (70-75%) cultures of PA-III and UMR 106 cells were homogenized in 4 M guanidine thiocyanate (Fisher Scientific, Montreal, PQ) containing 25 mM sodium citrate, 0.5% lauroyl sarcosine, 0.1 M 2-mercaptoethanol, and kept at -20°C . The homogenate was extracted with phenol/chloroform and RNA was precipitated in 80% ethanol as described previously. (2,3) The RNA content was estimated by spectrophotometry at 260 and 280 nm. Membrane was prehybridized and blots of total RNA were probed with ^{32}P -labeled cDNA probes labeled by random priming using [^{32}P]dCTP (Amersham; Cat. No. PB 10205; 3,000-4,000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$). Hybridization was at 42°C as previously described (3). The human cDNA probes of TGF β 1, uPA, GAPDH were obtained from ATCC (Bethesda, Md). Autoradiograms were exposed to Kodak X-Omat RP films with Cronax Lighting screens (Dupont, Lachine, PQ) for 3 days. The intensity of the bands in the films was determined by

LKB 2222-020 Ultrosan XL laser densitometer (Pharmacia, Baie d'Urfe, PQ). Formamide was from BRL. All other chemicals were of analytical grade.

Statistical analysis. Differences in group means were assessed for statistical significance using the one-tailed multiple comparison procedure of Dunnett only when treatments were compared with control values. When single comparisons were made, Student's *t* test was used. (3,13-15)

RESULTS

1. Ligand-binding domain of GR in PA-III and UMR 106 cells. Hormone binding studies confirmed GR in PA-III and UMR 106 cell extracts. The association constant (K_a) was $0.22 \pm 0.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ($X \pm \text{SE}$) in PA-III cells and $0.14 \pm 0.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ($X \pm \text{SE}$) in UMR 106 cells. Cytosols contained binding capacity of 97 ± 25 ($X \pm \text{SE}$) fmol per mg of protein (PA-III cells) and 135.7 ± 58 ($X \pm \text{SE}$) fmol per mg of protein (UMR 106 cells). These data were in concert with what is known about GR in rat prostate cancer cells and osteosarcoma cells, indicative of intact GR hormone-binding domain in PA-III and UMR 106 cells. (1,2,27,28)

2. DNA-binding domain of GR in UMR 106 and PA-III cells. An intact GR-binding domain does not necessarily prejudice an intact GR-DNA binding domain. Therefore, DNA-band shift analysis documented that activated GR in PA-III and UMR 106 cells binds radiolabeled GRE (Fig. 1, lanes 6 and 9). The specificity of the radiolabeled band in our experiment was determined by its absence (a) in experiments using extracts of CV-1 cells known to contain no steroid hormone receptors (Fig. 1, lanes 2-4), (b) in control experiments performed without cell extracts (Fig. 1, lanes 1 and 5), and (c) its decreasing signal in competition experiments using 10-fold and 100-fold molar excess of radioinert GRE (Fig. 1, lanes 7, 8, 10, 11).

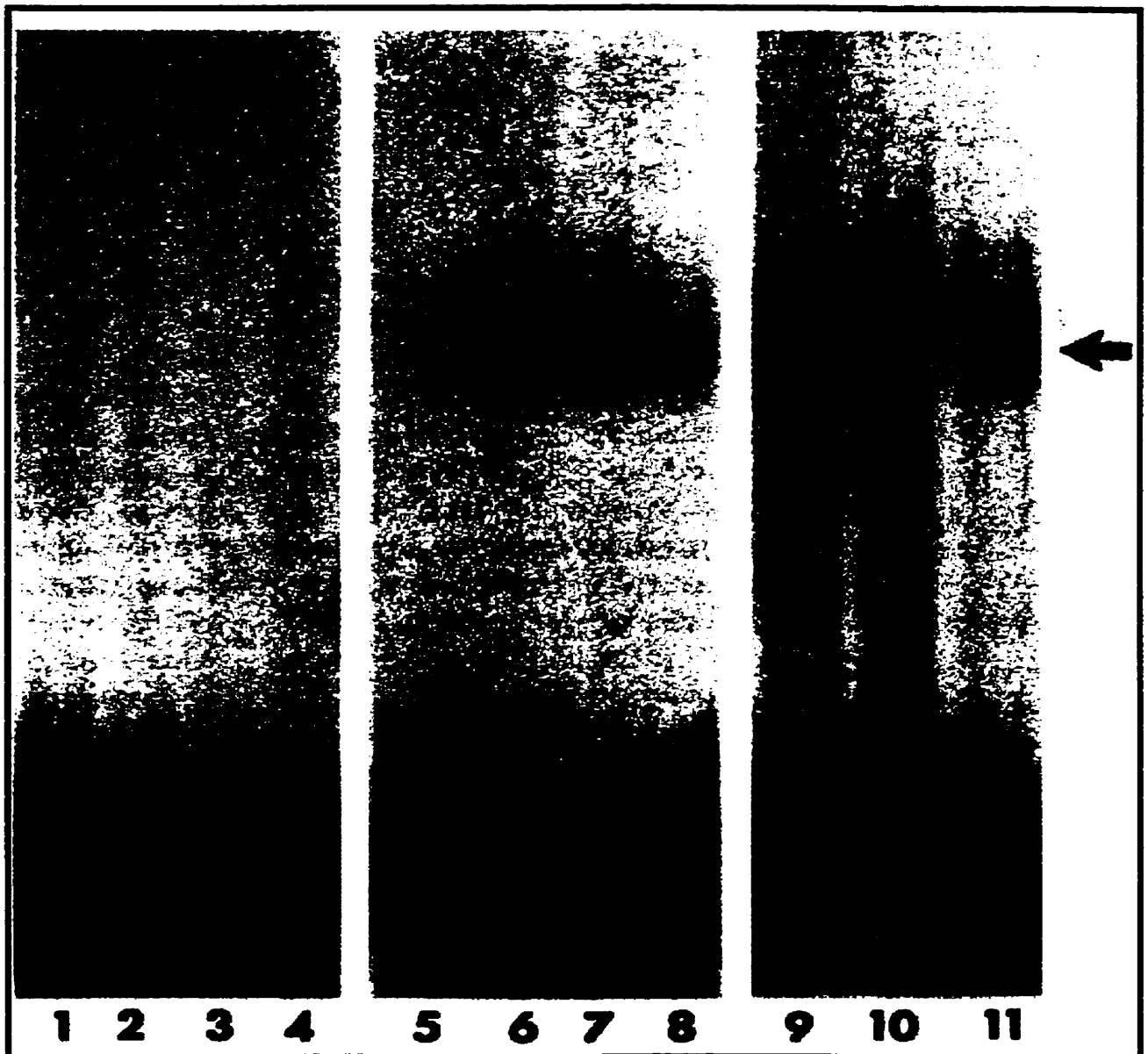


Fig. 1. An example of the DNA band-shift analysis in CV-1, PA-III and UMR 106 cells. Note the absence of GR-DNA radiolabeled band in CV-1 cell extracts (control experiments); **lane 1**= analysis without cell extracts, **lane 2**= CV-1 cell extracts preincubated with 100 nM of dexamethasone, and **lanes 3 and 4**= as in **lane 2** but analyzed with 10-fold and 100-fold molar excess of radioinert GRE DNA, respectively. GR-DNA radiolabeled band was also absent in analysis without cell extracts in **lane 5**. GR-DNA radiolabeled band was detected in both the PA-III and UMR 106 cell extracts (**lanes 6 and 9**, respectively). The signal of the GR-DNA radiolabeled band decreased when cell extracts as in **lanes 6 and 9** were analyzed in the presence of 10-fold and 100-fold molar excess of radioinert GRE DNA (PA-III cells: **lanes 7, 8**, and UMR 106 cells: **lanes 10, 11**, respectively).

3. Transcription activation in PA-III and UMR 106 cells.

Because, an intact GR-DNA binding domain does not necessarily prejudice a transcriptionally active GR, we analyzed trans-activation of PA-III and UMR 106 cells transiently transfected by the MMTV-tk-CAT reporter gene in the presence of the β -galactosidase expression vector CH110. CAT activity was measured in response to dexamethasone and R1818 treatment in aliquots estimated to contain 10 units (U) of β -galactosidase activity. Increasing concentrations of dexamethasone stimulated the transcription activity of the MMTV-tk-CAT chimeric gene in PA-III and UMR 106 cells (Fig.2, PA-III; lanes 2-4: UMR 106; lane 10).

R1881, a synthetic androgen, did not activated transcription of MMTV-tk-CAT reporter gene in transiently transfected PA-III cells (Fig. 2, lanes 6-8) and marginally stimulated CAT activity in transiently transfected UMR 106 cells (Fig. 2, lane 11). These data confirmed androgen-insensitivity phenotype of PA-III cells and AR in UMR 106 cells. (2,29) The levels of CAT activity stimulated by R1881 (10^{-7} M) was significantly lower than those obtained by dexamethasone (10^{-7} M) in transiently transfected UMR 106 cells (Fig. 2, lane 10,11). Because the experiments were performed in aliquots containing 10 U of β -galactosidase activity, these data possibly suggest significantly lower number of AR compared with that of GR in UMR 106 cells.

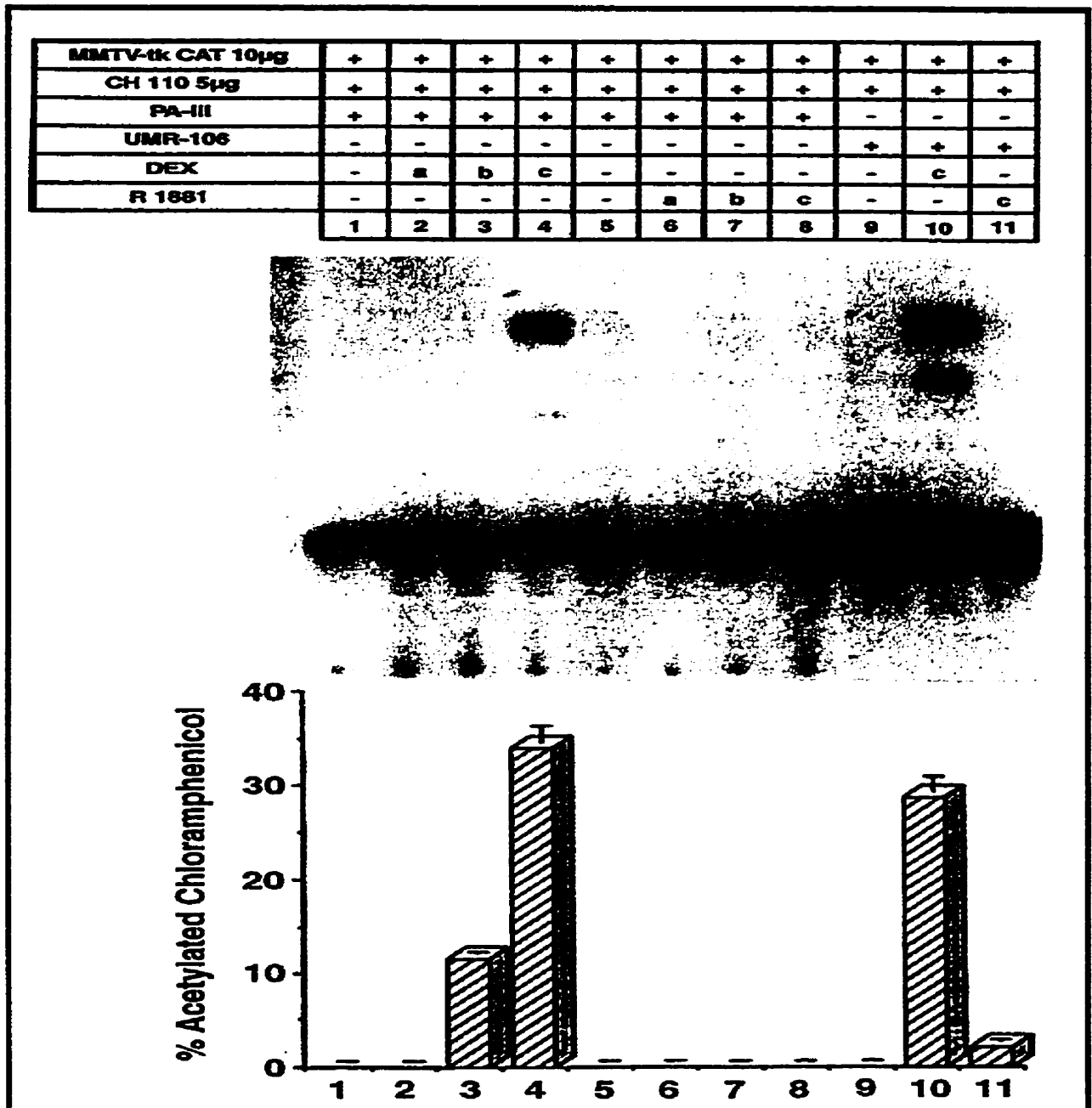


Fig. 2. Endogenous transcription activity of GR and AR as detected by CAT activity in PA-III and UMR 106 cells transiently transfected with the MMTV-CAT chimeric gene in the presence of the β -galactosidase expression vector CH 110. CAT activity was analyzed in aliquots containing 10 Units (U) of β -galactosidase activity as described in Materials and Methods. **PA-III cells:** Lane 1= control analysis (without hormone treatment), lanes 2= 1 nM, lane 3= 10 nM, lane 4= 100 nM of dexamethasone. R1881 failed to stimulate CAT activity in PA-III cells as detected in lane 5= control analysis, lane 6= 1 nM, lane 7= 10 nM, and lane 8= 100 nM of R1881; **UMR 106 cells:** lane 9= control analysis, lane 10= 100 nM of dexamethasone, lane 11= concentration of 100 nM of R1881 modestly stimulated CAT activity in UMR 106 cells.

4. The role of GR function in PA-III and UMR 106 cell growth. Dexamethasone significantly enhanced the distribution of PA-III and UMR 106 cells in the G₁/G₀ phase, suggestive of an arrest or prolongation of cell cycle in G₁/G₀ phase (Table 1). In addition, increasing concentrations of dexamethasone decreased ³H-thymidine incorporation (Fig. 3, upper panel) and DNA content in PA-III and UMR 106 cells (Fig. 3, lower panel). RU486, a GR blocker reversed dexamethasone's inhibition of PA-III (Fig. 4, upper panel) and UMR 106 cells (Fig. 4, upper panel). There was no microscopic evidence of apoptosis in PA-III and UMR 106 cells treated with 10⁻⁷ M of dexamethasone for 48 h as assessed by trypan blue exclusion test, cell detachment, cell shrinkage, chromatin condensation and fragmentation of nuclei.

TABLE 1. PHASE DISTRIBUTION OF PA-III AND UMR 106 CELLS INTO THE CELL CYCLE AS ASSESSED BY FLOW CYTOMETRY (% of cells)

	G ₀ /G ₁	S+G ₂ /M
PA-III cells		
Control	37.6±2.5	62.4±1.2
Dexamethasone		
100 pM	48.8±2.2*	51.2±2.5*
100 nM	67.4±3.1*	32.6±1.4*
TGFβ1		
25 ng/ml	49.7±2.6*	50.3±2.4*
IGF-I		
25 ng/ml	22.5±2.8*	77.5±3.6*
UMR 106 cells		
Controls	56.8±2.9	43.2±1.5
Dexamethasone		
100 pM	58.6±3.5	41.4±4.8
100 nM	73.0±2.0*	27.0±1.0*
TGFβ1		
25 ng/ml	78.4±3.5*	21.6±2.5*
IGF-I		
25 ng/ml	40.0±2.0*	60.0±3.0*

*P<0.001 (X±SE)

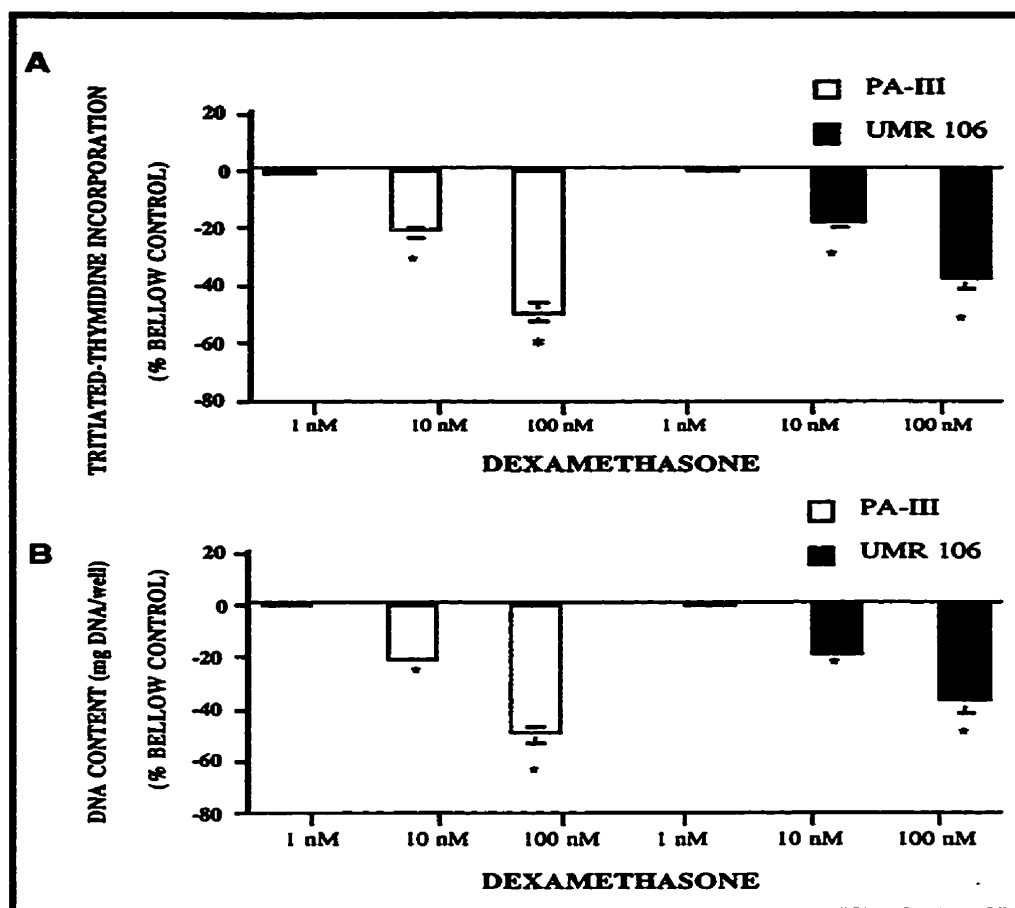


Fig. 3. Dexamethasone's inhibition of the tritiated-thymidine incorporation (upper panel) and DNA content (lower panel) in PA-III and UMR 106 cells after 24 h and 48 h incubation, respectively. Cells were cultured in DMEM/F-12 medium containing 0.5% BS. Results were expressed as % below controls (% below control = incorporation of tritiated-thymidine or DNA content in cells treated with dexamethasone minus incorporation of tritiated-thymidine or DNA content of control cells divided by the latter and X100). Tritiated-thymidine incorporation of control PA-III cells = $13,649 \pm 534$ and UMR 106 cells = $17,733 \pm 1,044$ (cpm/ μ g DNA; $\bar{X} \pm SE$) and DNA content of control PA-III cells = 3.99 ± 0.11 and UMR 106 = 3.74 ± 0.31 (μ g DNA/well; $\bar{X} \pm SE$) in triplicate determinations. * $p < 0.001$.

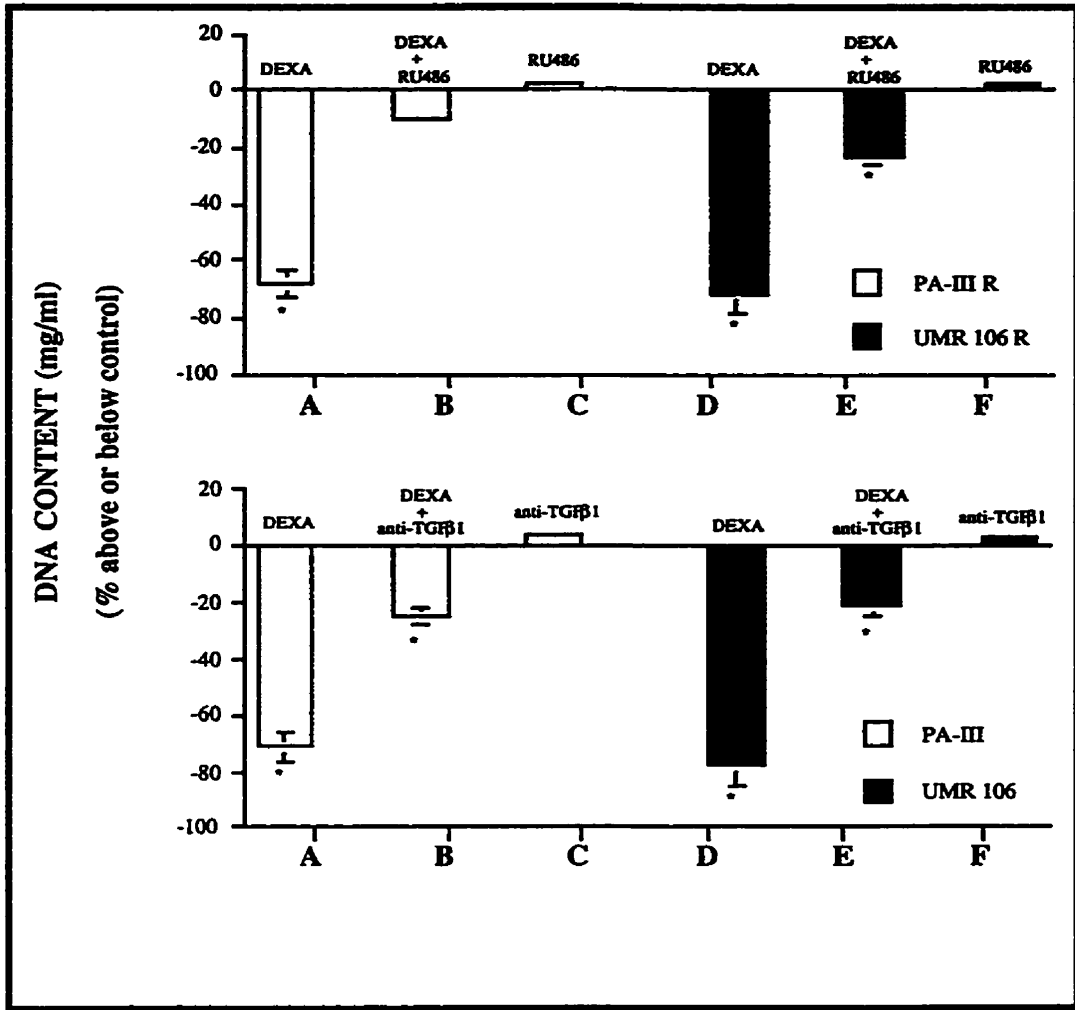


Fig. 4. Upper panel: Dexamethasone decreased the DNA content in PA-III (□) and UMR 106 (■) cells (lanes A and D, respectively). RU486 did not alter significantly DNA content in PA-III and UMR 106 cells (lanes C and F, respectively) but blocked dexamethasone's inhibition in PA-III and UMR 106 cells (lanes B and E, respectively). Lower panel: Anti-TGFβ1 polyclonal antibody did not alter the DNA content in PA-III and UMR 106 cells (lanes C and F, respectively) but blocked at least in part the dexamethasone's inhibition in PA-III and UMR 106 cells (lanes B and E, respectively). Experimental conditions were as described in the legend to the Fig. 3. Control levels of DNA content in PA-III cells = $3,99 \pm 0.118$; UMR 106 cells = $3,75 \pm 0.311$ in triplicate determinations ($\mu\text{g DNA/well}$; $\bar{X} \pm \text{SE}$). * $p < 0.001$.

5. IGF-I and TGFβ1 actions in PA-III and UMR 106 cells. Increasing concentrations of TGFβ1 significantly lowered the DNA content of PA-III and UMR 106 cells (Table 2). Under identical

experimental conditions, 25 ng/ml of TGF β 1 enhanced the distribution of PA-III and UMR 106 cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle. This was indicative of an arrest or prolongation in the G₀/G₁ phase of the cell cycle (Table 1). In addition, the effects of the TGF β 1 (10 ng/ml) and dexamethasone (10⁻⁷ M) were additive in lowering the DNA content in PA-III and UMR 106 cell cultures (Table 2). Therefore, TGF β 1 and dexamethasone had apparently similar effects in PA-III and UMR 106 cell growth.

TABLE 2. IGF-I AND SPECIFIC ANTI-TGF β 1 ANTIBODY NEUTRALIZE THE DEXAMETHASONE AND TGF β 1 INHIBITION OF PA-III PROSTATE CANCER AND UMR-106 OSTEOBLAST-LIKE CELLS

DNA content (μ g/well/10 ⁵ cells)		% above or below controls PA-III cells UMR-106 cells	
IGF-I	10 ng/ml	28 \pm 2.5*	46 \pm 1.5*
	25 ng/ml	58 \pm 3.0*	71 \pm 2.0*
TGF β 1	25 ng/ml	-23 \pm 3.1*	-48 \pm 1.5*
	plus anti-TGF β 1 ab (10 μ g/ml)	-10 \pm 2.5*	-16 \pm 2.2*
	plus 10 ng/ml PDGF	15 \pm 1.5*	18 \pm 2.3*
	plus 10 ng/ml IGF-I	25 \pm 1.6*	38 \pm 2.1*
Dexamethasone	100 nM	-34 \pm 4.5*	-42 \pm 3.7*
	plus 10 ng/ml TGF β 1	-76 \pm 5.2*	-84 \pm 2.8*
	plus anti-TGF β 1 ab	-14 \pm 1.4*	-18 \pm 2.3*
	plus 10 ng/ml PDGF	28 \pm 1.6*	26 \pm 2.8*
	plus 10 ng/ml IGF-I	39 \pm 4.7*	32 \pm 3.0*

DNA content in control PA-III= 3,33 \pm 0.21, and UMR 106 cells= 3,88 \pm 0.16; \bar{x} \pm SE; DMEM/F-12 containing 0.5% CS (48h incubation).
*P<0.001.

IGF-I increased the distribution of PA-III and UMR 106 cells in the S+G₂/M phase of the cell cycle (Table 1) and exogenous IGF-I stimulated the proliferation of UMR 106 and PA-III cells

(Table 3). Interestingly, 10 ng/ml of IGF-I completely reversed TGF β 1 and dexamethasone inhibition of PA-III and UMR 106 cells (Table 2). Therefore, IGF-I and TGF β 1/dexamethasone had opposite effects on cell growth and cell distribution into the cell cycle.

TABLE 3. MEDIATION OF UMR-106 AND PA-III CM MITOGENIC ACTIVITY BY AN IGF-DEPENDENT MECHANISM

Tritiated-thymidine incorporation cpm/ μ g DNA ($\bar{X} \pm SE$)	
	PA-III cells
Serum-free DMEM/F-12 (control)	14,245 \pm 848
plus 10% calf serum	58,221 \pm 1,115*
plus anti-IGF-I ab (1:2,000)	13,999 \pm 966
plus IGF-I (10 ng/ml)	53,651 \pm 1,543*
plus IGF-I + anti-IGF-I ab	15,687 \pm 2,085
plus UMR 106 cell-CM (100 μg/ml)	39,447 \pm 224*
plus UMR 106 cell-CM + anti-IGF-I ab	15,826 \pm 556
	UMR 106 cells
Serum-free DMEM/F-12 (control)	20,778 \pm 2,007
plus 10% calf serum	62,174 \pm 1,781*
plus anti-IGF-I ab (1:2,000)	18,997 \pm 2,111
plus IGF-I (10 ng/ml)	57,982 \pm 2,663*
plus IGF-I + anti-IGF-I ab	22,132 \pm 1,278
plus PA-III cell-CM (100 μg/ml)	35,663 \pm 2,281*
plus PA-III cell CM + anti-IGF-I ab	21,338 \pm 1,223

*P<0.001

6. PA-III/UMR 106 CM and uPA effects in PA-III and UMR 106 cells. UMR 106 CM and PA-III CM stimulated the proliferation of PA-III and UMR 106 cells, respectively. Because anti-IGF-I monoclonal antibody completely blocked these actions,

we concluded that mitogenic activity of UMR 106 CM and PA-III CM was mediated at least in part by an IGF-dependent mechanism (Table 3).

TABLE 4. MITOGENIC ACTIVITY OF uPA IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS IS MEDIATED BY AN IGF-DEPENDENT MECHANISM

Tritiated-thymidine incorporation cpm/ μ g DNA ($\bar{x} \pm SE$)		
PA-III cells		
Serum-free DMEM/F-12 (control)		17,677 \pm 1,223
plus rat uPA	1 ng/ml	16,651 \pm 2,198
	10 ng/ml	16,389 \pm 1,955
	100 ng/ml	15,004 \pm 1,557
	1 μ g/ml	15,550 \pm 2,866
UMR 106 cells		
Serum-free DMEM/F-12 (control)		21,156 \pm 1,472
plus rat uPA	1 ng/ml	23,468 \pm 854
	10 ng/ml	37,029 \pm 1,241*
	100 ng/ml	46,582 \pm 3,237*
plus rat uPA	10 ng/ml	23,249 \pm 3,025
+ anti-IGF-I ab (1:2,000)		
plus human uPA	0.1 μ g/ml	22,652 \pm 1,877
	10 μ g/ml	38,155 \pm 2,334*
plus human uPA (10 μg/ml)		23,249 \pm 3,025
+ anti-IGF-I ab (1:2,000)		

* $P < 0.001$

Rat uPA purified from PA-III CM (17) and human uPA stimulated the proliferation of UMR 106 osteosarcoma cells (Table 4). The concentration of human uPA (100 μ g/ml) required to stimulate UMR 106 rat osteosarcoma cells was 100-fold to 1000-

fold higher than that of rat uPA (100 ng/ml). These data suggested a species-specific barrier for human uPA actions in UMR 106 rat osteosarcoma cells. Rat and human uPA had no appreciable effect on the proliferation of PA-III cells (Table 4). Therefore, the mitogenic actions exerted by human and rat uPA on UMR 106 cells were apparently cell-specific. The proliferative activity stimulated by rat and human uPA in UMR 106 osteosarcoma cells was completely neutralized by anti-IGF-I monoclonal antibody. Therefore, mitogenic actions of uPA in UMR 106 cells was mediated by an IGF-dependent mechanism (Table 4).

7. GR function and TGF β 1 and uPA mRNA expression. To further characterize the interplay between GR function and TGF β 1 and uPA actions in PA-III and UMR 106 cells, we assessed by Northern analysis the effects of dexamethasone on TGF β 1 and uPA mRNA expression (10^{-7} M of dexamethasone for 48 h). Dexamethasone down modulated uPA mRNA (Fig.5) and up modulated (2-fold) TGF β 1 mRNA expression in prostate cancer cells as was reported previously. ^(2,3) Dexamethasone did not alter TGF β 1 mRNA expression in UMR 106 rat osteosarcoma cells (Fig. 5) and uPA mRNA was undetectable in UMR 106 cells. Failure of dexamethasone to modulate TGF β 1 mRNA expression was previously reported in MG-63 human osteosarcoma cells and normal human osteoblasts. The increasing TGF β 1 activity detected in these cell systems was attributed to activation of latent-TGF β 1 by the up regulated cathepsin-B and -D expression. ^(30,31)

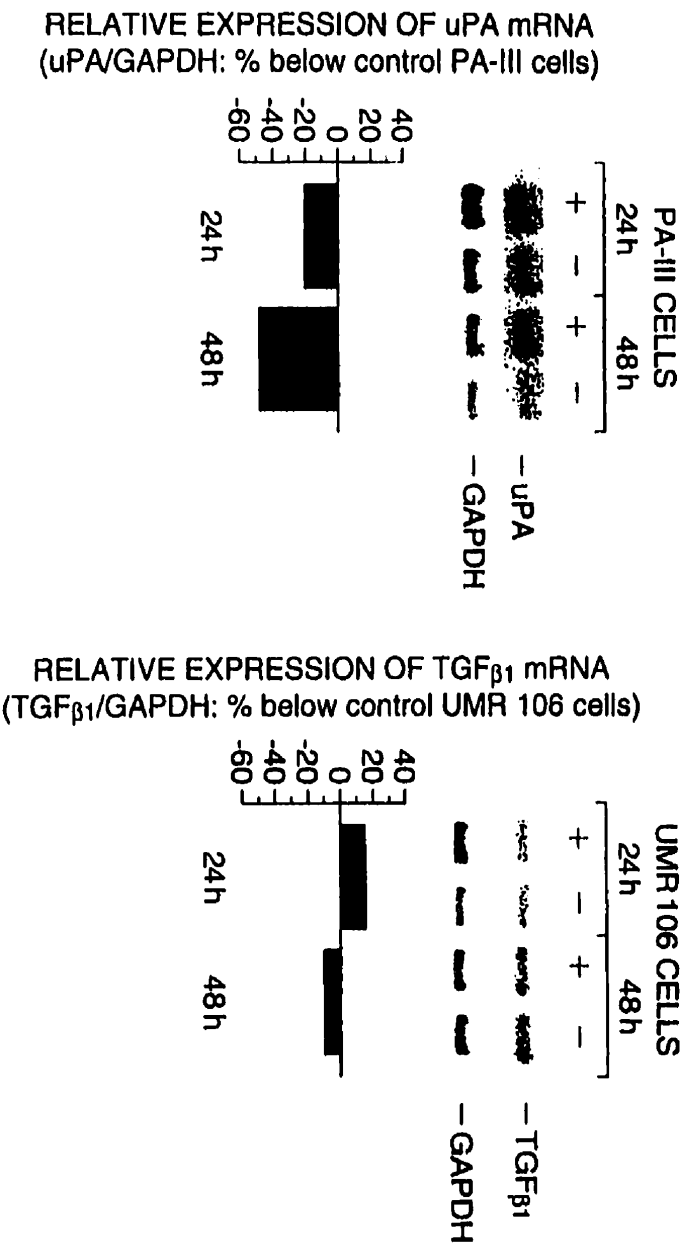


Fig. 5. Expression of TGF β ₁ and uPA mRNA as assessed by Northern analysis using total RNA extracts of PA-III and UMR 106 cells. The cells were incubated with and without 100 nM of dexamethasone for 24 and 48 h. Ten (10) μ g of total RNA was analyzed by Northern blots. The expression of GAPDH mRNA was used for quantitative purposes. The GR function did not alter the expression of TGF β ₁ mRNA in UMR 106 cells but down modulated uPA mRNA in PA-III cells.

8. Mediators of GR function in PA-III and UMR 106 cells.

Anti-TGF β ₁ polyclonal antibody (10 μ g/ml; final concentration) partly blocked dexamethasone's inhibition of PA-III and UMR 106 cells (Fig. 4, lower panel and Table 2). Therefore, dexamethasone's inhibition was at least in part mediated by increasing TGF β ₁ mRNA expression in PA-III cells (Fig. 5) and activation of latent-TGF β ₁ in UMR 106 osteosarcoma cells. (30,31)

In addition, 10 ng/ml of IGF-I completely reversed dexamethasone's inhibition of PA-III and UMR 106 cells (Table 2). Recently, dexamethasone down regulated IGF-I mRNA expression in UMR 106 cells.⁽³²⁾ Therefore, it is fair to state that down modulation of IGF-I mRNA and activation of latent-TGF β 1 mediate probably dexamethasone's inhibition of UMR 106 cells.

Because PA-III cell CM contained IGF activity (Table 3), conceivably producing IGFs, it is possible that an IGF-dependent mechanism participates in the dexamethasone inhibition of PA-III cells.

DISCUSSION

Recently, the ability of transplanted PA-III cells to produce the osteoblastic reaction in L-W rat skeleton was exploited as an *in vivo* model for studying the paracrine interactions between prostate cancer cells and osteoblasts. (2,9,11,17,18,22-24) The failure of androgens and androgen-depletion therapies to modulate the growth of PA-III tumors in L-W rats (2,9-11) suggested that AR function is not necessary for the development of the osteoblastic reaction in this system. (22,23) This concurs with clinical data suggesting that osteoblastic metastases in advanced prostate cancer are frequently androgen-insensitive and common sites of disease progression toward the terminal stage of the disease (hormone refractory cancer; stage D3). (33-35) The median survival in stage D3 prostate cancer patients is 4 to 12 months. (35)

Recently, the use of high-doses glucocorticoids treatment (0.5 mg/kg/day) provided evidence for subjective and in a few cases objective clinical response in stage D3 hormone refractory prostate cancer patients. (36,37) In addition, previous studies have shown that GR function inhibited the proliferation of androgen-insensitive PC-3 human prostate cancer cells, (3) suggesting that GR function can be of clinical importance in hormone refractory prostate cancer. (22,23) Therefore, we analyzed the possible mediators of GR function in PA-III and UMR 106 osteosarcoma cells, evaluating the interplay of glucocorticoids with PA-III CM, UMR 106 CM, TGF β 1, uPA, and IGF-I to control the growth of PA-III and UMR 106 cells.

Intact GR was detected in PA-III and UMR 106 cells and dexamethasone inhibited the growth of PA-III and UMR 106 cells. Dexamethasone's inhibition of UMR 106 and PA-III cells was neutralized by anti-TGF β antibody. In addition, GR function differentially modulated the expression of TGF β 1 (up modulation)

and uPA (down modulation) in PA-III cells while had no effect on TGF β 1 mRNA expression in UMR 106 cells. We did not detect uPA mRNA expression in UMR 106 cells. Although it is possible that UMR 106 osteosarcoma contained uPA mRNA expression undetectable by Northern analysis used in our experiments, it is fair to conclude that in the context of cell-cell interactions presence of uPA receptor alone is enough to direct the mitogenic activity exerted by PA-III cell-produced uPA on UMR 106 osteosarcoma cells (16,17,22,23) .

To date several studies have documented the important role of TGF β 1 in prostate cancer tumors. (22,23,38,39) TGF β 1 inhibited the growth of human prostate cancer cells, (3) interfered with extracellular matrix protein formation and degradation, (38,39) inhibition of cell adhesion to fibronectin via overexpression of tenascin, (40) modulation of integrins adhesion molecules, (41) and angiogenesis. (42) Therefore, increased expression of TGF β 1 mRNA in PA-III cells and increased TGF β 1 activity in UMR 106 cells produced by dexamethasone treatment can affect the growth of PA-III cells, ability of PA-III cells for invasion and metastases, and cell-cell interactions between PA-III cells and rat bone cells.

The failure of GR to modulate TGF β 1 mRNA expression in UMR 106 osteosarcoma cells is in concert with previous studies which reported that dexamethasone increased TGF β 1 activity without affecting TGF β 1 mRNA expression in human MG-63 osteosarcoma cells and normal human osteoblasts. The increasing TGF β 1 activity in normal human osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells was attributed to up regulation of cathepsin-B and cathepsin-D (30,31) expression, which in turn activated latent-TGF β 1. In addition, the effects of TGF β 1 are known to depend on the presence of other growth factors, degree of cell differentiation and confluence of the osteoblast-like culture systems, (31,43-45) suggesting that local IGFs and uPA expression/activity and GR

function can interplay with TGF β 1 expression/activity to control cell-cell interactions and cell growth of PA-III and UMR 106 cells.

In this context, our data documented that UMR 106 CM and PA-III CM contained mitogens which exerted their actions by an IGF-dependent mechanism. Furthermore, the mitogenic activity exerted by rat uPA purified by PA-III CM (17) and human uPA on UMR 106 osteosarcoma cells was mediated by an IGF-dependent mechanism. Therefore, uPA participates in PA-III and UMR 106 cell-cell interactions by a IGF-dependent mechanism. Finally, dexamethasone's inhibition was neutralized by exogenous administration of anti-TGF β 1 antibody and IGF-I, thereby suggesting that GR function is at least in part mediated by a TGF β -dependent and IGF-dependent mechanisms in both the PA-III and UMR 106 cells.

Based on these data, it is tempting to postulate that high-doses dexamethasone treatment can have an impact on cell-cell interactions in PA-III cell-induced tumor in rat bone. Particularly, down regulation of uPA expression in PA-III cells can produce changes in cell-cell interactions in this system. Decreasing uPA expression can temper local hydrolysis of IGFBPs, (17,18) which in its turn decreases IGFs bioavailability/activity, locally (Fig.6). In addition, dexamethasone can down regulate IGFs expression in rat osteoblasts. (32) Consequently, both these mechanisms can result in decreasing IGFs activity, provoking regression of the PA-III cell-induced tumor and blastic reaction in rat bone (Fig. 6).

Furthermore, dexamethasone's up regulation of TGF β 1 expression in PA-III cells (Fig. 6) combined with increasing TGF β 1 activity in UMR 106 cells (Fig.6) predict net increase of TGF β 1 activity in PA-III cell-induced tumors in rat bone.

Therefore, high-doses glucocorticoid treatment possibly regresses PA-III cell-induced tumor in rat bone. It is conceivable that similar mechanisms mediate the objective yet unexplainable clinical response fortuitously produced by the use of high-doses glucocorticoid therapy in hormone refractory prostate cancer patients (3,22,23,36,37)

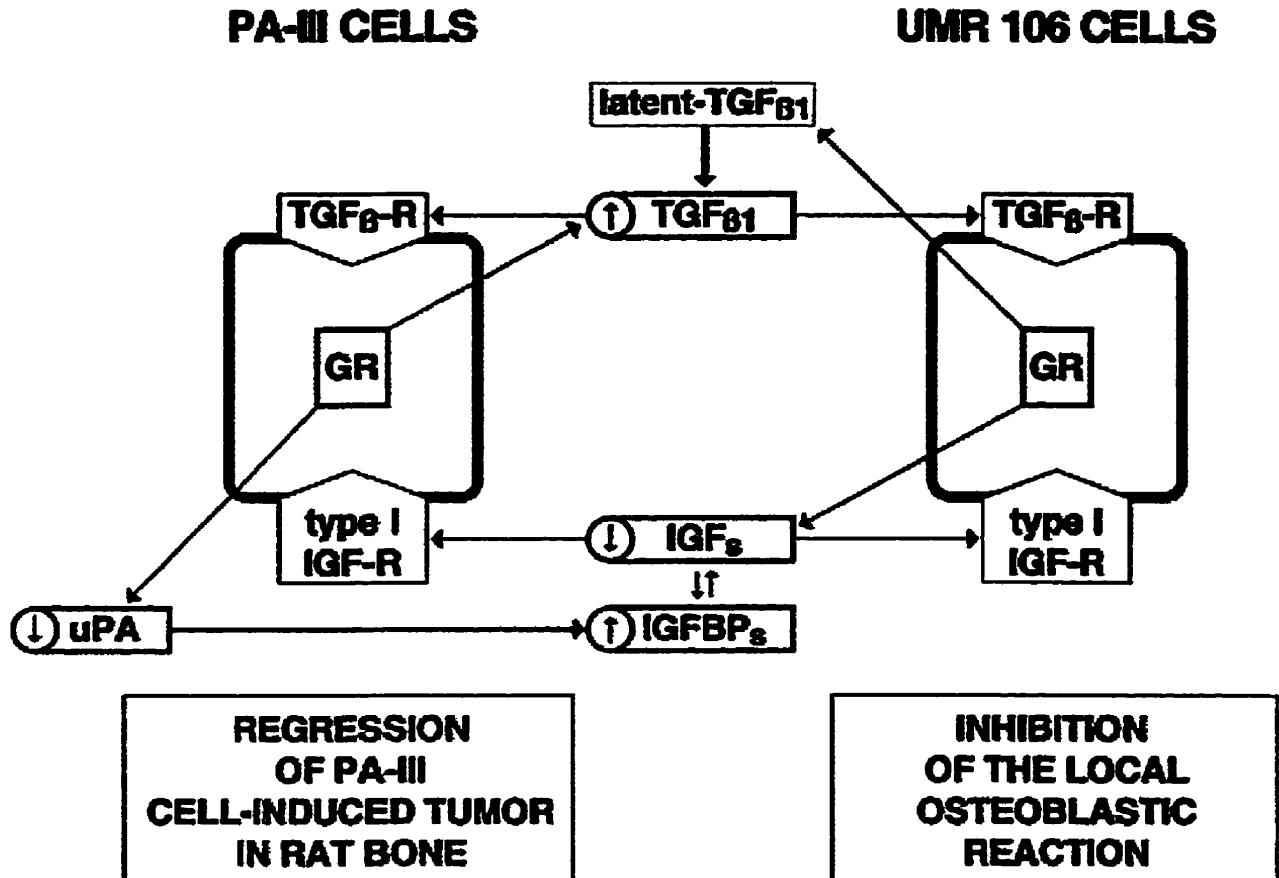


Fig. 6. An attempt to summarize the putative changes in cell-cell interactions produced by high-doses dexamethasone treatment in PA-III cell-induced tumors in rat bone. It is conceivable that glucocorticoids decreases IGFs activity and increases TGF β activity, which in turn can inhibit the growth of PA-III prostate cancer cells and local rat osteoblasts, thereby provoking regression of PA-III cell-induced tumor in rat bone. We postulate that similar changes in cell-cell interactions in osteoblastic metastases are possibly associated with the objective clinical response fortuitously produced by high-doses glucocorticoid therapy in stage D3 hormone refractory prostate cancer patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

Carlos Reyes-Moreno is holding a Student Award from the 'Fonds de la Recherche en Sante du Quebec' (FRSQ-FCAR) and Michael Koutsilieris is a Scholar (Chercheur-Boursier) of the FRSQ. The authors would like to thank Dr. MV Govindan for the transfer of molecular technology and Mr Gilles Frenette for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Davies P, Rushmere NK, 1992, Association of glucocorticoid receptors with prostate nuclear sites for androgen receptors and with androgen response elements. *J Mol Endocrinol*, **5**, 117-127.
2. Koutsilieris M, Grondin F, Lehoux J-G, 1992, The expression of mRNA for glucocorticoid receptor gene and functional glucocorticoid receptors detected in PA-III rat prostate adenocarcinoma cells. *Anticancer Res*, **12**, 899-904.
3. Reyes-Moreno C, Frenette G, Lavergne E, Boulanger J, Govindan MV, Koutsilieris M, 1995, Mediation of Glucocorticoid receptor function by transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) expression in human PC-3 prostate cancer cells. *Prostate*, **26**, 260-269.
4. Evans RM, 1988, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895.
5. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P, 1990, Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (*fos/jun*) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, **60**, 1189-1204.
6. Sanchez I, Goya L, Vallergera AK, Firestone GL, 1993, Glucocorticoids reversibly arrest rat hepatoma cell growth by inducing an early G₁ block in cell cycle progression. *Cell Growth Different*, **4**, 215-225.
7. Johnson BH, Gomi M, Jacowlew SB, Moriwaki K, Thompson EB, 1993, Actions and interactions of glucocorticoids and transforming growth factor β on two related human myeloma cell lines. *Cell Growth Differ*, **4**, 25-30.
8. Syms AJ, Norris J, Smith RG, 1984, Autocrine regulation of growth: I. Glucocorticoid inhibition is overcome by exogenous platelet derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **122**, 68-74.
9. Pollard M, Luckert PH, Scheu J, 1988, Effects of diphosphonate and x-rays on bone lesions induced in rats by prostate cancer cells. *Cancer*, **61**, 2027-2032.
10. Hoover DM, Best KL, McKenney BK, Tamura, RN, Neubauer BL, 1990, Experimental induction of neoplasia in accessory sex organs of male Lobund-Wistar rats. *Cancer Res*, **50**, 142-146, 1990.
11. Koutsilieris M, 1992, PA-III rat prostate adenocarcinoma cells. *In Vivo*, **6**, 199-204.

12. Galasko CSB, 1982, Mechanism of lytic and blastic metastatic disease of bone. *Clin Orth Rel Res*, **12**, 20-25.
13. Koutsilieris M, Rabbani SA, Goltzman D, 1986, Selective mitogens can be extracted from prostatic tissues. *Prostate*, **9**, 109-115.
14. Koutsilieris M, Rabbani SA, Goltzman D, 1987, Effects of prostatic mitogens on rat bone cells and fibroblasts. *J Endocrinol*, **115**, 447-454.
15. Koutsilieris M, Rabbani SA, Bennett HPJ, Goltzman D, 1987, Characteristics of prostate-derived growth factors for cells of the osteoblast phenotype. *J Clin Invest*, **80**, 941-946.
16. Rabbani SA, Desjardins J, Bell AW, Banville D, Mazar A, Henkin J, Goltzman D, 1990, An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **173**, 1058-1062.
17. Koutsilieris M, Frenette G, Lazure C, Lehoux J-G, Govindan MV, Polychronakos C, 1993, Urokinase-type plasminogen activator: a paracrine factor regulating the IGFs bioavailability in PA-III cell-induced osteoblastic metastases. *Anticancer Res*, **13**, 481-486.
18. Koutsilieris M, Polychronakos C, 1992, Proteinolytic activity against IGF-binding proteins involved in the paracrine interactions between prostate adenocarcinoma cells and osteoblasts. *Anticancer Res*, **12**, 905-910.
19. Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JH, 1992, Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology*, **130**, 1401-1412.
20. Yee JA, Yan L, Dominguez JC, Allan EH, Martin TJ, 1993, Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF β) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol*, **157**, 528-534.
21. Bernard JA, Lyons RM, Moses HL, 1990, The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta*, **1032**, 79-87.
22. Koutsilieris M, 1993, Osteoblastic metastasis in advanced prostate cancer. *Anticancer Res*, **13**, 443-450.
23. Koutsilieris M, 1995, Skeletal metastases in advanced prostate cancer: cell biology and therapy. *Crit Rev Hema/Oncol*, **18**, 51-64.

24. Polychronakos C, Jantly U, Lehoux J-G, Koutsilieris M, 1991, Mitogenic effects of insulin and insulin-like growth factors on PA-III rat prostate adenocarcinoma cells: characterization of the receptors involved. *Prostate*, **19**, 313-321.
25. Laemmli UK, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
26. Govindan MV, 1990, Specific region in hormone binding domain is essential for hormone binding and trans-activation by human androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **4**, 417-427.
27. Chen TL, Cone CM, Feldman D, 1983, Glucocorticoid modulation of cell proliferation in cultured osteoblast-like bone cells: differences between rat and mouse. *Endocrinology*, **112**, 1739-1745.
28. Peck W, Gennari C, Raisz L, 1984, Corticosteroids and bone. *Calcif Tissue Int*, **36**, 4-7.
29. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BI, Spelsberg TC, 1989, Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 854-59.
30. Oursler MJ, Riggs L, Spelsberg TC, 1993, Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor- β by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, **133**, 2187-2196.
31. Boulanger J, Reyes-Moreno C, Koutsilieris M, 1995, Mediation of the glucocorticoid receptor (GR) function by the activation of latent transforming growth factor beta 1 in MG-63 osteoblast-like osteosarcoma cells. *Int J Cancer*, **61**, 692-697.
32. Delany AM and Canalis E, 1995, Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology*, **136**, 4776-4781.
33. Koutsilieris M, Faure N, Laroche B, Tolis G, Roberts G, Ackman CFD, 1986, Objective response and disease outcome in 59 patients with stage D2 prostatic carcinoma treated with either buserelin or orchiectomy: disease aggressivity and its association with response and outcome. *Urology*, **27**, 221-227.
34. Koutsilieris M, Laroche B, Thabet M, Fradet Y, 1990, The assessment of disease aggressivity in stage D2 prostate cancer patients. *Anticancer Res*, **10**, 333-336.
35. Koutsilieris M, Dupont A, Gomez J, Cusan L, Suburu R, Diamond P, Labrie F, 1994, Stratification of stage D2 prostate cancer patients by a disease aggressiveness score and its use in

evaluating disease response and outcome to combination hormone therapy (GnRH-A plus flutamide). *Anticancer Res*, **14**, 627-634.

36. Tubiana-Hulin M, 1990, Traitement hormonal des metastases osseuses des cancers. *Rev Rheum*, **57**, 821-827.

37. Hellmann K, Philips RH, Goold M, 1993, High dose dexamethasone and base of brain irradiation for hormone refractory metastatic carcinoma of the prostate. *Clin Exp Metastasis*, **11**, 227-229.

38. Steiner MS, Barrack E, 1992, Transforming growth factor- β 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol*, **6**, 15-25.

39. Wilding G, Zugmeier G, Knabbe C, Flanders K, Gelmann E, 1989, Differential effects of transforming growth factor β on human prostate cancer cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, **62**, 79-87.

40. Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M, 1988, Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell*, **53**, 383-390.

41. Heino J, Massaue J, 1989, Transforming growth factor- β switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol Chem*, **264**, 21806-21811.

42. Yang EY, Moses HL, 1990, Transforming growth factor β 1-induced changes on cell migration, proliferation and angiogenesis in chicken chorioallantoid membrane. *J Cell Biol*, **111**, 731-741.

43. Gehron-Robey P, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kandaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn B, Roberts AB, 1987, Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. *J Cell Biol*, **105**, 457-452.

44. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL, 1994, Transforming growth factor- β gene family members and bone. *Endocr Rev*, **15**, 27-39.

45. Ibbotson KJ, Orcutt CM, Anglin AM, D'Souza SM, 1989, Effects of transforming growth factor β 1 and 2 on a mouse clonal osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *J Bone Miner Res*, **1**, 37-44.

CONCLUSION

Le cancer de la prostate localisé et diagnostiqué, précocement, peut, dans une grande majorité de cas être éradiqué. Cependant, environ 30 à 40% des nouveaux cas diagnostiqués souffrent déjà d'un cancer avancé de la maladie. Le cancer avancé de la prostate se caractérise par la présence de métastases distantes; d'abord au niveau des ganglions et, à un stade très avancé, au niveau des os. Le nombre croissant de métastases osseuses (> 3) constitue un facteur extrêmement peu favorable à la survie des patients. La privation aux androgènes constitue la stratégie thérapeutique standard contre le cancer avancé de la prostate. Les observations cliniques du Dr Culig ont démontré que le AR est exprimé autant dans les tumeurs primaires que dans les tumeurs récidivistes et leurs métastases [300]. Kleinerman a même démontré que le AR était présent dans 38 des 42 métastases osseuses analysées et développées à partir du cancer de la prostate[383]. La progression de la maladie vers un stade réfractaire à l'hormonothérapie, malgré la présence du AR à tous les stades de la maladie, suggère une approche différente pour traiter la maladie.

Plusieurs agents chimiothérapeutiques, tels que l'adriamycine, le mithoxantrone, le cyclophosphamide et la suramine, administrés seuls ou combinés, ont souvent été utilisés contre le cancer avancé de la prostate [335,340-342,359,368]. Cependant, les résultats sont décevants en raison de l'extrême résistance de ces métastases à la chimiothérapie. Les mécanismes impliqués dans la résistance tumorale à la chimiothérapie ne sont pas encore bien élucidés.

Nos résultats ont confirmé l'importance de facteurs de croissance (IGF-I, TGF β 1, etc.) et des protéases tumorales (uPA, etc.) dans les interactions qui favorisent le développement des métastases osseuses du cancer de la prostate. Ces interactions sont aussi responsables de la réaction ostéoblastique subséquente. Dans ce contexte, nous avons démontré pour la première fois que ces mêmes facteurs pourraient être, en partie, directement responsables de la protection contre l'apoptose induite par des agents cytotoxiques, tels que l'adriamycine.

Il est même possible de proposer que les facteurs de croissance et cytokines présents dans l'os seraient aussi impliqués dans la variabilité de réponses à l'hormonothérapie et à la progression de la maladie au niveau des métastases osseuses. Les études *in vivo* de Teicher et ses collègues abondent dans le même sens [359]. En effet, ces expériences ont démontré que

les tumeurs produites par les lignées humaines du cancer de la prostate (PC-3, DU-145 et LNCaP) chez les souris nude ou SCID sont hautement insensibles aux effets cytotoxiques de l'adriamycine, du melphalan et du cyclophosphamide. Dans ces conditions *in vivo*, la résistance observée est associée à de grandes quantités d'expression en TGF β .

Par ailleurs, il a été démontré que les nombreux facteurs de croissance et cytokines présents dans le tissu osseux agissent aussi comme facteurs de survie pour les ostéoblastes en culture, en absence de sérum [351]. Les IGFs, l'insuline et le bFGF, et autres facteurs solubles encore non identifiés, constituent des puissants facteurs de survie pour les ostéoblastes dans ces conditions. Nos analyses par cytométrie en flux ont démontré que les ostéoblastoïdes MG-63 sont intrinsèquement résistants à l'ADR. Après 48 heures de traitement, aucun indice d'apoptose n'a été détecté avec une dose de 100 nM d'ADR, la réponse à l'ADR se traduisant alors par un blocage dans la phase G2/M du cycle cellulaire. Les niveaux d'apoptose induite à une dose de 5 μ M n'était que de 19% après 48h de traitement (données non montrées).

Les facteurs de survie du tissu osseux sont aussi capables de protéger les cellules métastatiques du cancer du sein œstrogéno-négatives contre les effets des agents cytotoxiques. En effet, la réponse à l'ADR par les cellules MDA-MB-231/ER⁻ a récemment été étudiée. L'analyse par cytométrie en flux montre que la lignée MDA-MB-231 répond à l'ADR, dans les mêmes conditions de culture et aux mêmes concentrations en ADR, de façon similaire à la lignée PC-3 en culture classique (tableau II). On observe alors, une augmentation du nombre de cellules en apoptose (<G1) en fonction de la dose (100nM et 5 μ M) et du temps d'exposition (6,24 et 48 heures).

La lignée MDA-MB-231, tout comme la lignée PC-3, est hormono-indépendante. Les cellules MDA-MB-231 sont aussi stimulées par IGF-I (50ng/mL) et par de doses croissantes de CM MG-63, aux mêmes doses que celles utilisées avec PC-3 (figure 1C). Une diminution du nombre de cellules vivantes conjuguée à un plus grand nombre de cellules mortes, explique la variation du rapport V/M (vivantes/mortes) de 25.4 dans la population témoin, à 4.8 en présence de TGF β 1 (figures 1C et 2C). Par contre, le IGF-I, le CM MG-63 et le TGF β 1 se sont avérés capables de bloquer partiellement les effets de l'ADR après 48h de traitement (figure 2C). Ces résultats pourraient expliquer pourquoi cliniquement, les patientes souffrant du cancer du sein œstrogéno-insensible (ER⁻) et portant des métastases osseuses ont un pronostic extrêmement peu favorable à leur survie. La présence de facteurs de survie du tissu osseux pourrait aussi

expliquer pourquoi les tumeurs de ces patientes sont extrêmement insensibles à la chimiothérapie et pourquoi la maladie progresse plus rapidement que chez les patientes souffrant d'un cancer du sein ER⁺ [384,385].

TABLE II : Apoptose (<G1; % du nombre total des cellules) et distribution (%) des cellules MDA-MB-231 dans le cycle cellulaire (X±SD)

	Control				Adriamycin (100 nM)				Adriamycin (5 µM)			
	<G1	G1/G0	S	G2/M	<G1	G1/G0	S	G2/M	<G1	G1/G0	S	G2/M
6 H	1.7±0.3	55±2	35±1	10±2	2.4±0.4	50±1	38±1	12±1	2.5±0.5	52±2	37±1	12±1
24 H	2.6±0.3	58±2	36±2	7±2	2.2±0.4	7±1	22±1	72±1	14.3±2.7	50±2	35±1	15±1
48 H	3.4±1.8	57±2	34±2	9±2	29±3	10±1	18±2	72±2	75±5	58±5	34±6	8±2

Les cellules MDA-MB-231 ont été mises en culture avec du DMEM/F-12 à 5.0% CS.

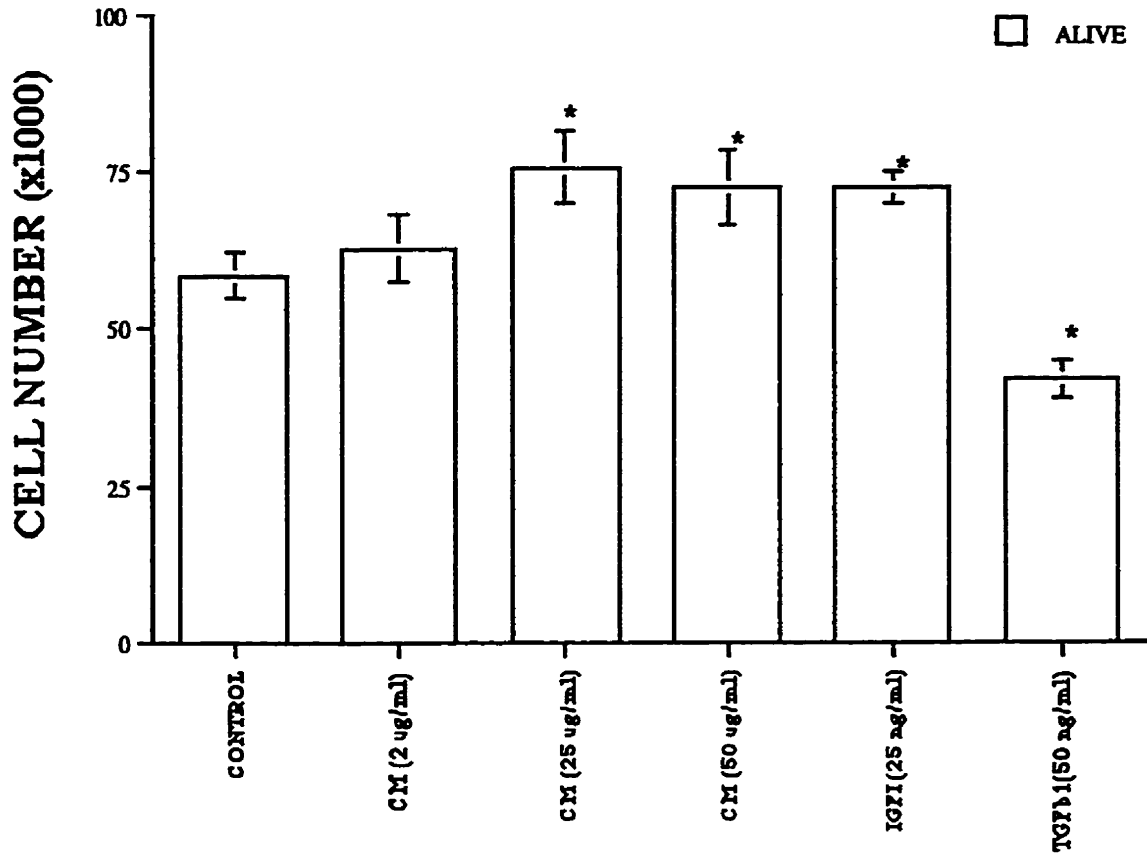


Figure 1C : Effets du milieu conditionné par les cellules MG-63 (CM), du IGF-I et du TGFβ1 sur le nombre des cellules MDA-MB-231 vivantes, après 48 de traitement. * significativement différents du témoin ($P < 0.001$).

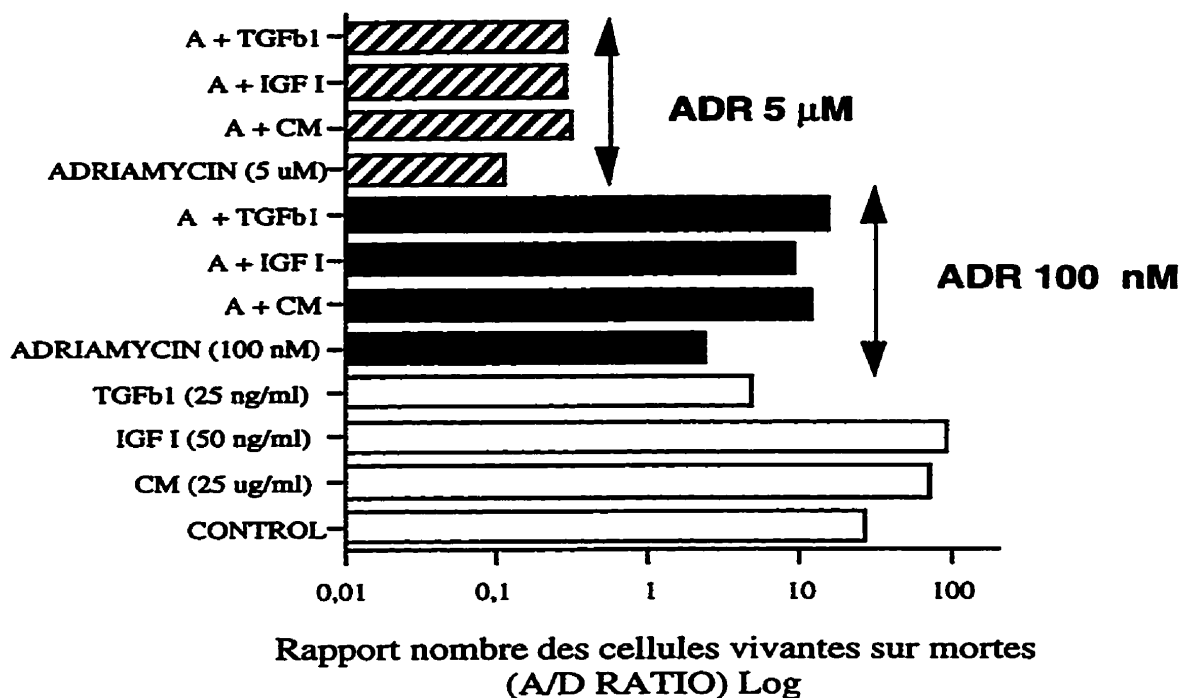


Figure 2C : Les facteurs de survie dérivés des ostéoblastes protègent partiellement les cellules MDA-MB-231 contre les effets cytotoxiques de l'ADR. L'ADR à 100nM et à 5 μM diminue le ratio A/D de 25.5, au niveau du témoin, à 2.3 et 0.11 respectivement. Le CM MG-63, le IGF-I et le TGFβ1 sont capables de bloquer partiellement les effets de l'ADR et d'augmenter le ratio A/D.

Le cancer du sein exprime à l'origine un phénotype hormono-dépendant, non-métastatique et sensible à la privation aux œstrogènes. La progression de la maladie vers un stade avancé se caractérise par un phénotype hormono-indépendant, résistant aux thérapies anti-œstrogéniques et cytotoxiques avec des propriétés de croissance hautement invasives et métastatiques. Cette progression est souvent accompagnée de mutations altérant la fonction du ER ou la croissance aberrante de cellules cancéreuses ER-négatives (ER inactif ou non-exprimé). Il est donc possible que d'autres phénomènes soient aussi impliqués dans la résistance à la chimiothérapie dans les tumeurs ER-négatives. Le modèle cellulaire MDA-MB-231 œstrogéno-indépendant, contrairement à la lignée MCF-7/ER⁺, exprime une protéine p53 mutée et non-fonctionnelle [386], n'exprime pas le phénotype de MDR de résistance multiple aux drogues [387], et produit jusqu'à 5 fois moins de l'oncogène anti-apoptotique bcl-2 en réponse aux œstrogènes [388]. Ces trois facteurs sont donc moins importants dans la résistance à la chimiothérapie des clones ER⁻.

Il a été démontré que les cellules MDA-MB-231, ainsi que les tumeurs primaires ER⁻ peu différenciées, expriment de façon constitutive le facteur de transcription NF-kappaB [389]. Le facteur de transcription NF-kappaB est strictement contrôlé par le ER dans les cellules du cancer du sein ER⁺. De plus, il a été démontré que la présence de NF-kappaB protège les cellules cancéreuses contre l'apoptose induite par le TNF(*tumor necrosis-factor*)-alpha, les radiations ionisantes et la daunorubicine [389,390,391]. Par ailleurs, en absence de sérum dans le milieu de culture, la voie de signalisation anti-apoptotique empruntée par l'insuline chez les cellules CHO(*Chinese Hamster Ovary*)-R surexprimant le récepteur pour l'insuline (IR), l'activation de NF-kappaB constitue une étape essentielle pour abolir le signal d'apoptose [392]. Dans ces conditions, l'action anti-apoptotique de l'insuline dépend entièrement de l'activité tyrosine kinase du IR. La suite implique les voies de signalisation Raf-1-dépendante qui active alors NF-kappaB et la voie PI3-kinase-dépendante. Il est donc possible que les facteurs de survie présents dans le tissu osseux activent le facteur NF-kappaB et s'opposent ainsi aux effets cytotoxiques des agents chimiothérapeutiques. L'activation de NF-kappaB pourrait alors inhiber l'apoptose par un effet combiné de régulation des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et/ou dans le cycle cellulaire, tandis que la voie PI3-kinase-dépendante activée pourrait moduler l'activité des protéines de contrôle de l'apoptose de la famille BCL-2.

En effet, la voie PI-3-kinase semble être la voie empruntée par les facteurs de croissance et les cytokines dans la promotion de la survie cellulaire [393-397]. Les travaux de Datta [393] et del Peso [394] ont démontré que la PI-3-kinase, activée par les facteurs de survie et les cytokines, phosphoryle directement la sérine-thréonine kinase Akt dont la suite de la cascade aboutit à la phosphorylation de la protéine BAD (Bcl-xL/Bcl-2 associated death promotes). La protéine BAD phosphorylée serait alors séquestrée dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe avec la protéine 14-3-3, permettant alors d'abolir l'apoptose et promouvoir la survie cellulaire. Des données récentes attribuent un rôle direct pour la famille des protéines 14-3-3 et la protéine p11, en s'associant avec la protéine BAD ou en interagissant avec les protéines Raf-1 kinase, la protéine kinase C et la PI-3 kinase, de façon à amplifier la cascade conduisant à la phosphorylation de la protéine BAD [398]. De plus, des récents travaux ont déterminé que les protéines de la famille BCL-2 anti-apoptotiques (bcl-2 et bcl-xL) et pro-apoptotiques (BAD et BAX-alpha) constituent les "point-contrôle" suite aux dommages à l'ADN causées par les agents chimiothérapeutiques [399-401]. Ces études suggèrent que ces protéines s'opposent ou induisent l'apoptose en amont de l'activation des caspases ou autres protéases apoptotiques. Ces protéines peuvent favoriser l'apoptose en ouvrant les mégapores mitochondriales qui libèrent alors le cytochrome c ou d'autres agents apoptotiques (la kinase AIF ou Apaf, par exemple) qui

vont activer les caspases et les autres protéases impliquées dans la phase d'exécution du signal apoptotique. L'induction de l'apoptose par BAD et BAX-alpha se produit par liaison de celles-ci, à l'état non-phosphorylé, avec bcl-2 ou bcl-xL.

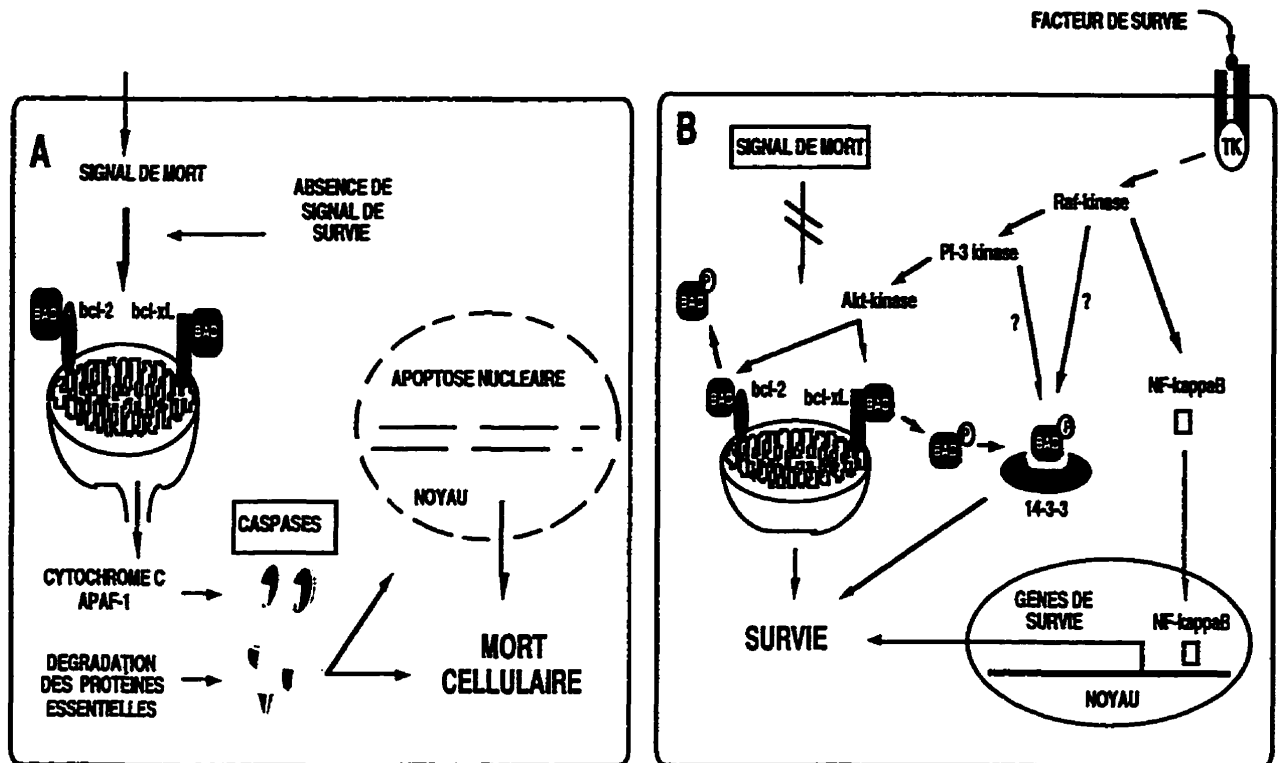


Figure 3C : Voie de signalisation des facteurs de survie et leur action anti-apoptotique. En absence de signaux de survie, les agents cytotoxiques ou pharmacologiques induisent l'apoptose suite à la rupture membranaire des mitochondries et à l'activation des caspases ou autres protéases (A). L'oncogène pro-apoptotique Bad non-phosphorylé interagit avec les protéines anti-apoptotiques ancrées dans la mitochondrie et permet l'ouverture de mégapores. Les facteurs de croissance et les cytokines agissent comme facteurs de survie en empruntant une voie commune dans le relai du signal qui aboutit à la phosphorylation de Bad et à l'opposition du signal apoptotique des agents cytotoxiques (B). L'activation du facteur de transcription NF-kappaB peut aussi favoriser la survie cellulaire en induisant probablement la transcription de gènes de survie (réparation, détoxication, les gènes précoces c-fos et c-myc, etc.).

Ainsi, l'ensemble des résultats expérimentaux exposés ci-haut pourrait définir les mécanismes moléculaires intracellulaires du mode d'action des facteurs de survie, en s'opposant aux effets cytotoxiques des agents pharmacologiques. La compréhension de ces mécanismes comporte un intérêt très particulier dans la mesure où de nouvelles voies thérapeutiques contre le cancer peuvent être développées.

démontré que les GCs peuvent modifier l'expression et/ou la production de plus importantes molécules impliquées dans le développement tumoral et la réaction ostéoblastique subséquente. L'ensemble de ces résultats suggère qu'un effet combiné de diminution en uPA, en IGF-I (probablement PDGF et autres facteurs) et une augmentation en TGF β 1 pourrait conduire à une régression tumorale et à une inhibition de la réaction ostéoblastique (Figure 4C).

À partir de résultats cliniques ou expérimentaux *in vivo*, il est possible de postuler que les effets des GCs *in vivo* pourraient impliquer un effet combiné de diminution en IGF-I et une augmentation en TGF β 1. Chez les personnes souffrant d'asthme, par exemple, un traitement à long terme et à des doses relativement élevées en GCs conduit à un état ostéoporotique [63-65]. Chez les patients GH-déficients, un traitement à long terme avec du GH ou le IGF-I produit, au cours des six premiers mois, une perte de masse osseuse mais un net gain de masse osseuse après douze mois de traitement [47]. De plus, chez les souris transgéniques, la surexpression spécifique de TGF β 2 par les OBs se traduit par une perte progressive de l'os. Cet état ostéoporotique chez les souris semble être associé à une incapacité des OBs à former et minéraliser la MEO et à une augmentation de la résorption osseuse [160].

Les GCs pourraient constituer un agent thérapeutique d'avenir contre le cancer avancé de la prostate ou du sein en interférant avec la fonction de facteurs de progression et de survie de métastases osseuses. Hellman rapportait en 1993 [402] qu'un traitement à hautes doses en GCs, combiné avec une irradiation de la base du crâne, avait produit un effet bénéfique " très important " chez deux patients à un stade terminal du cancer de la prostate. Les métastases osseuses se trouvaient alors au niveau des nerfs crâniens et l'ensemble du squelette. Storlie rapportait en 1995 [403] qu'un seul traitement à faibles doses en GCs (0.75 mg deux fois par jour) peuvent produire une amélioration symptomatique importante chez des patients à un stade métastatique du cancer de la prostate. À titre d'exemple, il a été observé que sur 36 patients traités, 30 montraient une diminution de 50 à 80% du niveau en PSA; sur les 23 patients avec un niveau en PSA réduit de 50% ou plus, 8 montraient une régression tumorale (tel que détecté par une scannographie osseuse), 7 sont restés stables, 5 montraient une certaine progression et 3 n'ont pas subi d'examen radiographique adéquat. Par ailleurs, le dexaméthasone est aussi utilisé en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques pour traiter le cancer avancé du sein. Ces traitements chimiothérapeutiques combinés (cyclophosphamide, vincristine, adriamycine et dexaméthasone) sont grandement plus efficaces avec des chimiosensibilisateurs, tels que la quinine et la verapamil [404]. Les travaux du Dre Guise ont porté sur les effets du dexaméthasone sur la production de PTHrP ainsi que sur le développement et la progression de

métastases osseuses produites par les cellules MDA-MB -231 chez le rat [273]. Il a été déterminé que le dexaméthasone diminue significativement l'expression de l'ARNm du PTHrP et la production de la protéine. L'analyse des images radiographiques assistée par ordinateur a démontré que le dexaméthasone produit une diminution du nombre et de la taille de métastases osseuses et de la production en PTHrP au niveau des femurs avec des lésions ostéolytiques chez le rat.

Nos travaux ont souligné aussi l'importance du TGF β 1 dans la réponse aux GCs par les cellules du cancer de la prostate (PC-3/PA-III) et des ostéoblastes (MG-63/UMR-106). Dans les quatre lignées cellulaires le TGF β 1 inhibe la prolifération. *In vivo*, une exposition chronique au TGF β 2 peut conduire à une perte progressive de l'os, associée à une diminution de formation ostéoblastique de la MEO par les OBs et une augmentation de la résorption osseuse. Les travaux de Erlebacher et Derinck l'ont démontré par l'utilisation de souris transgéniques, dans lesquelles la surexpression de TGF β 2 par les OBs a été ciblée [160]. Ceci suggère qu'une présence continue de TGF β peut produire, à long terme, un effet opposé à celui observé *in vivo* dans de conditions physiologiques normales. L'enigme reste toujours le rôle de TGF β 1 dans la biologie de tumeurs prostatiques, *in vivo*.

Des récentes expériences, *in vitro*, ont déterminé que le TGF β 1 peut inhiber la prolifération des cellules du cancer de la prostate en partie via une augmentation de IGFBP-3 et IGFBP-5 [405], par une inhibition de l'association de la PKC(*protein kinase C*)-alpha à la membrane cytoplasmique interne [406], ou par une induction de l'apoptose à travers un effet direct de IGFBP-3 [358]. Il est intéressant de constater qu'un pré-traitement en IGFBP-3 peut sensibiliser les cellules du cancer du sein aux effets cytotoxiques de la céramide et ce, de façon indépendante aux IGFs [407]. À partir de ces données, il est possible de suggérer que le TGF β 1 pourrait avoir un effet négatif sur la croissance et la survie de cellules du cancer de la prostate. Si tel est le cas, alors comment expliquer les hauts niveaux de production et de sécrétion de TGF β 1 par les carcinomes prostatiques? À ces propos, les études effectués *in vivo*, suggèrent que la surexpression de TGF β 1 peut augmenter le potentiel invasif et métastatique de tumeurs prostatiques [170] ou protéger les tumeurs prostatiques contre l'apoptose induite par les agents cytotoxiques [359].

Reiss a récemment émis l'hypothèse que le TGF β pourrait jouer le rôle de suppresseur de tumeurs dans les stades primaires de plusieurs types de cancers, tels que les cancer du sein, de l'estomac et du colon, dans un grand nombre de lymphomes et autres; tandis que dans les

stades plus avancés, le TGF β agirait comme promoteur de tumeurs [408]. Le TGF β serait en effet le médiateur des agents chimiopréventifs tels que les rétinoïdes et le tamoxifène. Par contre, à un stade du développement et de la progression tumorale, il se produit dans ces types de cancer une résistance à l'effet inhibiteur ou de suppression de TGF β . Cette résistance serait la conséquence de mutations inactivatrices de gènes impliqués dans la signalisation de TGF β incluant les récepteurs de TGF β de type I et type II, ainsi que plusieurs molécules de signalisation, telles que les protéines Smad [166-169,408].

Dans les tumeurs localisées, Perry [409] a démontré que les peptides TGF β 1 et TGF β 2 sont surexprimés. Dans le tissu normal adjacent, le TGF β 1 est plus exprimé au niveau du stroma tandis que le TGF β 2 et le TGF β 3 sont plus prédominants dans le tissu épithélial [409]. Par contre, une analyse du niveau de TGF β 1 dans le sang a démontré qu'il n'y a pas de différence entre les niveaux de patients avec une BPH et les patients avec du cancer de la prostate à tous les stades de la maladie [410].

Une autre étude a démontré que dans le tissu prostatique normal (néonatal, prépubère et chez l'adulte) la forme latente LAP-TGF β 1 et le récepteur du TGF β 1 de type II (RcII) sont hautement exprimés dans le tissu épithélial, comparativement au stroma adjacent [411]. Il a été établi aussi que les carcinomes prostatiques expriment encore plus de LAP-TGF β 1 que les tissus normaux. Par contre, la présence de RcII est à peine détectable dans quelques carcinomes analysés. L'expression de RcII et LAP-TGF β 1 dans le stroma tumoral est identique à celui de stroma du tissu prostatique normal [411].

La lignée androgéno-sensible du cancer de la prostate LNCaP est insensible aux effets inhibiteurs de TGF β 1, probablement en raison d'une inactivation du RcII ou de la présence de protéines qui interfèrent avec la liaison de TGF β 1 à ses récepteurs [412]. Guo et Kiprianou [171] ont récemment procédé à la transfection stable du gène sauvage codant pour le RcII dans les cellules LNCaP. Dans les clones surexprimant RcII, le traitement avec du TGF β 1 induit alors un arrêt dans la phase G1 et une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la production protéique de p21^{Waf1/Cip1} et p27^{Kip1}, deux inhibiteurs de cyclines qui empêchent la progression de la phase G1 vers la phase S.

Il est donc possible que les TGF β puisse jouer un rôle, d'abord comme suppresseur de tumeurs et ensuite, comme promoteur de tumeurs. Au cours de la progression de la maladie la surexpression de TGF β pourrait, par des mécanismes encore à définir, augmenter le caractère

invasif et métastatique du cancer de la prostate soit en supprimant l'immunité cellulaire et humorale, soit en augmentant l'angiogénèse ou la formation de la matrice extracellulaire, ou encore en modulant l'expression de facteurs de croissance par les cellules stromales et augmenter alors la motilité cellulaire [145,146]. Une stratégie visant à réduire la surexpression de TGF β pourrait donc constituer un moyen efficace contre le cancer de la prostate.

La capacité des GCs à modifier l'expression des facteurs de promotion tumorale et de survie cellulaire au niveau des os suggère, selon nos résultats, que les stratégies anticancéreuses futures doivent tenir compte de l'importance de bloquer au maximum ces interactions. Parmi les potentiels facteurs de survie pour les carcinomes prostatiques, et présents dans l'os, on retrouve le IGF-I, le TGF β 1 et l'interleukine IL-6 [413]. En effet, le IL-6 est reconnu pour rescaper les cellules du cancer de la prostate contre l'apoptose induite par le *cis*-platine et l'étoposide. Les travaux de Giuliani et ses collègues ont démontré que les biphosphonates (surtout l'etidronate et l'alendronate) sont capables d'inhiber la production de IL-6 par les OBs [371]. Les biphosphonates sont déjà utilisés dans les traitements chimiothérapeutiques contre le cancer du sein et de la prostate [332,414,415]. Dans une récente revue, les Drs Guise et Mundy abordent le sujet des métastases osseuses, et proposent l'utilisation de biphosphonates contre le cancer du sein et de la prostate [416]. Ces agents seraient capables d'inhiber la résorption osseuse et de limiter ainsi la présence de facteurs de croissance et de cytokines qui stimulent les cellules métastatiques ostéophiles [415]. Si le développement de métastases prostatiques et la réaction ostéoblastique subséquente sont initiés par une résorption osseuse, alors il est possible que ces agents soient très efficaces pour la prévention de tumeurs ayant une croissance androgéno-indépendante et résistante à la chimiothérapie.

À la lumière des récentes données, des connexions de plus en plus évidentes entre la transcription, le cycle cellulaire, les voies de signalisation de facteurs de survie et les régulateurs de l'apoptose commencent à mieux se définir. Tel que nous le proposons, les travaux de Lamm et Christofori [417] ont démontré récemment l'importance de supprimer les facteurs de survie afin de potentialiser le traitement chimiothérapeutique. Ces expériences ont démontré que les tumeurs produites par les cellules "beta" du pancréas, dans les souris transgéniques Rip1Tag2 déficientes en IGF-II, ont un taux d'apoptose extrêmement plus élevé que les tumeurs se développant dans les souris normales. De plus, les lignées établies à partir de tumeurs de souris déficientes en IGF-II sont beaucoup plus sensibles aux signaux apoptotiques que la lignée parentale. La privation en sérum et des agents chimiothérapeutiques tels que la daunomycine, l'étoposide et la vincristine induisent efficacement l'apoptose de ces cellules [417].

Enfin, une stratégie intéressante à explorer serait donc l'utilisation des inhibiteurs des récepteurs à tyrosine kinase ou des inhibiteurs des kinases impliquées dans la voie de signalisation de ces récepteurs. Le CP-358,774 est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase et de l'autophosphorylation du EGF.R à des doses aussi faibles que 2 et 20 nM respectivement. De plus, ces effets inhibiteurs sur le EGF.R déclenchent aussi l'apoptose dans les cellules humaines du cancer du colon (cellules DiFi) [418]. Deux nouveaux inhibiteurs non spécifiques, dérivés du 6-aryl-pyrido-[2,3-d]pyrimidine, ont aussi démontré leur capacité anti-proliférative et anti-migratoire [419,420]: le PD089828 et le PD166285. Ces agents sont capables d'inhiber l'activité tyrosine kinase des FGF.R-1, du PDGF.R-beta, du EGF.R et de la protéine kinase c-Src. L'inhibition de l'autophosphorylation du PDGF.R avec ces deux agents conduit aussi à une inhibition de la phosphorylation des protéines de signalisation tels que la phospholipaseC-gamma (PLC-gamma), la protéine Grb2, la PI-3-kinase et les MAP-kinase de 44 et 42 kDa. Les tyrphostines RG50875 et RG13022 constituent aussi deux puissants inhibiteurs de la prolifération cellulaire [421]. Ces deux inhibiteurs agissent en bloquant la phosphorylation des molécules impliquées dans les voies de signalisation du EGF.R et du PDGF.R dans les cellules des glioblastomes A172 et des gliomes Hs683.

BIBLIOGRAPHIE

1. Landis H, Murray T, Bolden S, et Wingo PA : Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 48:6-29, 1998
2. Institut National du Cancer du Canada : Statistiques canadiennes sur le cancer, 1997, Toronto, Canada, 1997.
3. Institut National du Cancer du Canada : Statistiques canadiennes sur le cancer, 1996, Toronto, Canada, 1996.
4. Pagé M : Le cancer, maladie de la vie. Sillery, Presses de l'Université Laval, 1984, pp 15-33.
5. Jean Y : Histoire de la cancérologie. Dans *Cancérologie expérimentale* (Chap. 1). Québec, Télé-Université, 1993, pp 3-17.
6. Lévy V, et Lévy-Soussan M. : Cancérologie. Paris, Éds. ESTEM et MED-LINE, 1996.
7. Kinzler KW, et Vogelstein B : Gatekeepers et caretakers. *Nature* 386:761-763, 1997.
8. Sherr CJ : Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677, 1997.
9. Levine AJ : p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331, 1997.
10. Mignon A, Rouquet N, et Joulin V : Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : Un enjeu thérapeutique por demain? *Médecine/Science* 14:9-17, 1998.
11. Mignotte B, Zanzami N, Petit P, Vayssières J-L, et Kroemer G : Contrôle mitochondriale de l'apoptose : la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondrie? *Médecine/Science* 14:54-60, 1998.
12. Nagata S : Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365, 1997.
13. Kroemer G, Zamzami N, et Susin SA : Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18:44-51, 1997.
14. Reed J : Double identity for proteins of the bcl-2 family. *Nature* 387:773-776, 1997.
15. Susin SA, Zamzani N, et Castedo M : The central executioner of apoptosis : Multiple connexions between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide -induced apoptosis. *J Exp Med* : 186:25-37, 1997.
16. Magi-Galluzzi C, Mishra R, Fiorentino M, Montironi R, Yao H, Capodiecici P, Wishnow K, Kaplan I, Stork PJ, et Loda M : Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Lab Invest* 76:37-51, 1997.

17. Daémi N, Vallet T, Jacquier M-F, Rémy L : Laminine, intégrines, organisation et comportement invasif des adénocarcinomes. *Médecine/Sciences* 10:1275-1281, 1994.
18. Wolf C, Lefebvre O, Rouyer N, Chenard M-P, Bellocq J-P, Rio M-C, Chambon P, Basset P : Protéases d'origine stromale et progression tumorale. *Médecine/Sciences* 10:507-515, 1994.
19. Grégoire M, et Lieubeau B : The role of fibroblasts in tumor behavior. *Cancer and Metastasis Reviews* 14:339-350, 1995.
20. Folkman J : What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4-6, 1990.
21. Pepper MS : Manipulating angiogenesis : From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:605-619, 1997.
22. Gingras D, et Béliveau R : L'angiogénèse tumorale: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. *Médecine/Sciences* 13:1428-1435, 1997.
23. Vandebunder B, Fafeur V, Wernert N, Stéhelin D : Analyse moléculaire de l'angiogénèse tumorale. *Médecine/Sciences* 10:516-527, 1994.
24. Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DI, Grella D, Castellino FJ, Enghild J, Kwaan HC, Lee F, Kramer RA, Volpert O, Bouck N, et Soff GA : The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10868-10872, 1997.
25. Kandel J, Bossy-Wetzel E, et Radvanyi F : Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66:1095-1104, 1994.
26. Czubayko F, Liaudet-Coopman EDE, Aigne A, Tuveson AT, Berchem GJ, et Wellstein A : A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat Med* 3:1137-1140, 1997.
27. Pluda JM : Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutics strategies. *Seminars in oncology* 24:203-218, 1997.
28. Liotta LA, Kleinerman J, et Saidel GM : Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34:997-1004, 1994.
29. Albelda SM, et Buck CA : Integrines and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4:2868-2880, 1990.
30. Brooks PC, Clark RA, et Cheresh DA : Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264:569-571, 1994.

31. Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT., Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, et Cheresch DA : Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrine avb3. *Cell* 85:683-693, 1996.
32. Fidler IJ et Kripke ML : Biology of cancer metastasis. Dans *Cancer: The outlaw Cell* (2nd ed.), Washintong, Éd. Richard E. LaFond, 1988, pp 159-181.
33. Fisher B, et Fisher ER : The interrelationships of the hematogenous and the lymphatic tumor cell dissemination. *Surg. Gynecol Obstet* 122:791-798, 1966.
34. Seinden MV, Kantoff PW, Krithivas K, Propert K, Bryant M, Halton E, Gaynes L, Kaplan I, Bublely G, De Wolf W et al : Detecton of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 12:2634-2639, 1994.
35. Hart I. R. : "Seed and soil" revisited : Mechanismes of site specific-metastasis. *Cancer Metast Rev* 1:5-16, 1982.
36. Solomayer EF, Diel IJ, Wallwiener D, Bode S, Meyberg G, Sillem M, Gollan C, Kramer MD, Krainick U, Bastert G: Prognostic relevance of urokinase plasminogen activator detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Br J Cancer* 76:812-818, 1997.
37. Grothey A, et McCrea PD : Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line. *J Natl Cancer Inst* 90:547, 1998.
38. Baron R : Anatomy and ultrastructure of bone. Dans *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 1996, pp 3-7.
39. Teitelbaum SL : Squeletal growth and development. Dans *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 1996, pp 7-11.
40. Kaplan FS : Prevention and managment of osteoporosis. Dans *Clinical Symposia, CIBA*, number 1 (Canada); Vol 47, number 1 (USA), 1996, 32 pages.
41. Solari F, et Jurdic P : Nouveaux concepts sur l'origine des ostéoclastes: Relation avec les macrophages normaux et inflammatoires. *Médecine /Science* 13:1285-1293, 1997.
42. Mundy GR : Bone resorbing cells. Dans *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Raven Press, New York, 1996, pp 18-22.
43. Puzas JE : The osteoblast. Dans *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Raven Press, New York 1996, 11-15.
44. Canalis E : Regulation of bone remodeling. Dans *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Raven Press, New York 1996, pp 23-26.
45. Chattopadyay N, Mithal A, ett Brown EM : The calcium-sensing receptor : A window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr Rev* 17:289-307, 1996.

46. Deftos, L : Calcitonin. Dans *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Raven Press, New York 1996, pp 53-55.
47. Ohlsson C, Bengtsson B-A, Olle GPI, Andreassen TT, et Sloomweg MC : Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 19:55-79, 1998.
48. Bolander FK : Introduction and general endocrinology. Dans *Molecular Endocrinologie* (2nd ed), San Diego, Academic Press, 1994, pp 3-100.
49. Greenspan FS : *Basic and Clinical endocrinology* (Third Ed.). East Norwalk, Appleton and Lange Eds, 1991, 786 pp.
50. Tepperman J : *Physiologie endocrine et métabolique*. Paris, Masson, 1976, 263 pp.
51. Simard J, Durocher F, Mébamki F, Turgeon C, Sanchez R, Labrie Y, Couet J, Trudel C, Rhéaume E, Morel Y, Luu-The V, et Labrie F : Molecular biology and genetics of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene family. *Endocrinology* 150:S189-S207, 1996.
52. Labrie F, Luu-The W, Lin S-X, Labrie C, Simard J, Breton R, et Bélanger A : The key role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62:148-158, 1997.
53. Jonat C, Rahmsdorp HJ, Park K-K, Cato ACB, Gebel S, Porta H, et Herrlich P : Antitumor promotion and antiinflammation : Down-modulation of AP-1 (Fos-Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62:1189-1204, 1990.
54. Bamberger C, Schulte H : Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine reviews* 17: 245-261, 1996.
55. Ciocca RD, et Roig LMV : Estrogen receptors in human nontarget tissues : Biological and clinical implications. *Endocr Rev* 16 : 35-62, 1995. Obourn JD, Koszewski NJ, et Notides AC : Hormone- and DNA-binding mechanisms of the recombinant human estrogen receptor. *Biochemistry* 32:6229-6236, 1993.
56. Obourn JD, Koszewski NJ, et Notides AC : Hormone- and DNA-binding mechanisms of the recombinant human estrogen receptor. *Biochemistry* 32:6229-6236, 1993.
57. Lindsey J, Kumar MV, Grossmann ME, Young C, et Tindall DJ : Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm* 49:383-432, 1994.
58. Perry JE, Grossmann ME, et Tindall DJ : Androgen regulation of gene expression. *Prostate(suppl)* 6:79-81, 1996.
59. Ing NH, O'Malley BW : The steroid hormone receptor superfamily: Molecular mechanisms of action (Chapt. 14). Dans *Molecular Endocrinology: Basic concepts and clinical correlations* , Raven Press Ltd. 1995, pp 195-215.
60. Evans R : The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895, 1988.

61. Truss M, Beato M : Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14: 459-479, 1993.
62. Reichel RR, et Jacob ST : Control of the gene expression by lipophilic hormones. *FASEB J* 7:424-436, 1993.
63. Hahn TJ, Halstead LR, Teitelbaum SL, Hahn BH : Altered mineral metabolism in glucocorticoid-induced osteopenia. *J Clin Invest* 64:6550 ,1979.
64. Baylink DJ : Glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Eng J Med* 309 :306-308, 1983.
65. LoCascio V, Bonveci E, Imbimbo B, Ballanti P, Adami S, Milani S, Tartarotti D, PellaRocca C : Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. *Bone Mineral* 8 : 39-51, 1990.
66. Adachi JD, Benson WG, Brown J, Hanley D, Hodsman AB, et Josse R : Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 337 : 383-387, 1997.
67. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM : Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 121 : 1985-1992, 1987.
68. Cheng S-L, Yang JW, Rifas L, Zhang S-F, et Avioli LV : Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro : induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134 : 277-286, 1994.
69. Wong M-M, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, Me Broom R, Aubin JE, Murray TM : Long term effects of physiologic concentration of glucocorticoids on human bone-derived cells. *J. Bone Mineral Res* 5 : 803-813, 1992.
70. Shalhoub V, Conlon D, Tassirani M, Quinn C, Partridge N, Stein GS, Lian JB : Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem* 50 : 425-440, 1992.
71. Malaval L, Gupta AK, Liu F, Delmas PD, et Aubin JE : LIF, but not IL-6, regulates osteoprogenitor differentiation in rat calvaria cell cultures : modulation by DEX. *J.B.M.R.* 13 : 175-184, 1998.
72. Chen TL, Aronow L, et Feldman D : Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. *Endocrinology* 100:6190 , 1977.
73. Canalis E : Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvaria. *Endocrinology* 112 : 931-939, 1983.
74. Chyun YS, Kream BE, et Raisz LG : Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation. *Endocrinology* 114 : 477-480, 1984.

75. Conaway HH, Grigorie D, Lerner UH : Differential effects of glucocorticoids on bone resorption in neonatal mouse calvariae stimulated by peptide and steroid-like hormones. *J Endocrinol* 155:513-521, 1997.
76. Yamamoto I, Potts JT, Segre GV : Glucocorticoids increase parathyroid hormone receptors in rat osteoblastic sarcoma cells (ROS 17/2). *J. Bone Mineral Res* 3 : 707-712, 1988.
77. Chen TL, Hauschka PV, Cabrales S, et Feldman D : The effects of 1,25-Dihydroxyvitamin Dz and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures : Receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses. *Endocrinology* 118 : 250-259, 1986.
78. Delany AM, et Canalis E : Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology* 136 : 4776-4781, 1995.
79. Bennett A, Chen T, Feldman D, hintz RL, Rosenfeld RG : Characterization of insulin-like growth factor I receptors on cultured rat bone cells : regulation of receptor concentration by glucocorticoids. *Endocrinology* 115 : 1577-1583, 1984.
80. Rydziel S et al. : Cortisol represses insulin-like growth factor II receptor transcription in skeletal cell cultures. *Endocrinology* 137 : 4254-4260, 1995.
81. Chen TL, Chang LY, Bates RL, et Perlman A : Dexamethasone and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulation of insulin-like growth factor binding proteins in rat osteoblast-like cell cultures. *Endocrinology* 128 : 73-80, 1991.
82. Centrella M, McCarthy TL, et Canalis E : Glucocorticoid regulation of transforming growth factor β 1 activity and binding in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Mol Cell Biol* 11:4490-4496, 1991.
83. Oursler MJ, Riggs R, et Spelsberg TC : Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor- β by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 133:2187-2196, 1993.
84. Fukumoto S, Allan EH, Zeheb R, Gelehrter TD, et Martin J : Glucocorticoid regulation of plasminogen activator inhibitor-1 messenger ribonucleic acid and protein in normal and malignant rat osteoblasts. *Endocrinology* 130 : 797-804, 1992.
85. Swolin-Eide D, et Ohlsson C : Effects on the expression of the interleukin-6 and interleukin-1 beta in human osteoblast-like cells. *J Endocrinol* 156:107-114, 1998.
86. Centrella M, Rosen V, Wozney JM, Casinghino SR et McCarthy TL : Opposing effects by glucocorticoids and bone morphogenetic protein-2 in fetal rat bone cell cultures. *J Cell Biochem* 67:528-540, 1997.
87. Peck W, Genari C, et Raisz L : Corticosteroids and bone. *Calcif Tissue Int* 36 : 4-7, 1984.

88. Song LN : Effects of retinoic acid and dexamethasone on proliferation, differentiation, and glucocorticoid receptor expression in cultured human osteosarcoma cells. *Oncol Res* 6 : 111-118, 1994.
89. Oursler MJ, Landers JP, Riggs BL, et Spelsberg TC : Estrogen effects on osteoblast and osteoclasts. *Ann Med* 25 : 361-371, 1993.
90. Oursler MJ, Pederson L, Fitzpatrick L, Riggs BL, et Spelsberg TC : Human giant cell tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3227-31, 1994.
91. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC : Avian osteoclasts as estrogen target cells. *PNAS/USA* 88 : 6613-6617, 1991.
92. Ernst M, Parker MG, et Rodan GA : Functional estrogen receptors in osteoblastic cells demonstrated by transfection with a reporter gene containing and estrogen response element. *Mol Endocrinol* 5 : 1597-1606, 1991.
93. Ciocca RD, et Roig LMV : Estrogen receptors in human nontarget tissues : Biological and clinical implications. *Endocr Rev* 16 : 35-62, 1995.
94. Bodine PV, Henderson RA, Green J, Aronow M, Owen T, Stein GS, Lian JB, et Komm BS : Estrogen receptor-alpha is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness of gene expression. *Endocrinology* 4:2048-2057, 1998.
95. Kassem M, Okazaki R, Harris SA, Spelsberg TC, Conover CA, Riggs BL : Estrogen effects on insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor. *Calcif Tissue Int* 62:60-66, 1998.
96. Rickard DJ, Hofbauer LC, Bonde SK, Gori F, Spelsberg TC, Riggs BL : Bone morphogenetic protein-6 production in human osteoblastic cell lines. Selective regulation by estrogen. *J Clin Invest* 101:413-122, 1998.
97. Sarma U, Edwards M, Motoyoshi K, et Flanagan AM : Inhibition of bone resorption by 17beta-estradiol in human bone marrow cultures. *J Cell Physiol* 175:99-108, 1998.
98. Amana EA, Taga M, et Minaguchi H : The effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on type I collagen C-telopeptide and N-telopeptide : The predictive value of biochemical markers of bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 83:333-338, 1998.
99. Robinson JA, Riggs BL, Spelsberg TC, et Oursler MJ : Osteoclast and transforming growth factor- β : Estrogen-mediated isoform-specific regulation of production. *Endocrinology* 137 : 615-621, 1996.
100. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, et Kumegawa M : Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 186:489-495, 1997.

101. Hugues DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, et Boyce BF : Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2:1132-1136, 1996.
102. N Gaumet, Seibel MJ, Coxam V, Davicco MJ, Lebecque P, et Barlet JP : Influence of ovariectomy and estradiol treatment on calcium homeostasis during aging rats. *Arch Physiol Biochem* 105:435-444, 1997.
103. Rozenberg S, Kroll M, Pastijn A, et Vandromme J : Osteoporosis prevention and treatment with sex hormone replacement therapy. *Clin Rheumatol* 14 (suppl): 14-17, 1995.
104. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, et Spelsberg TC : Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 :854-857, 1989.
105. Orwell ES, Stribrska L, Ramsey EE, et Keenan EJ : Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcif Tissue Int* 49 : 182-187, 1991.
106. Carrascosa A, Audi L, Fernandez MA, et Ballabriga A : Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 70 :134-140, 1990.
107. Kapur SP, et Reddi AH : Influence of testosterone and dihydrotestosterone on bone-matrix induced endochondral bone formation. *Calcif Tissue Int* 44 : 108-113, 1989.
108. Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, et Compston JE : The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82 : 3493-3497, 1997.
109. Pilbeam CC, et Raisz LG : Effects of androgens on parathyroid hormone and interleukin-1-stimulated prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvariae. *J Bone Miner Res* 5: 1183-1188, 1990.
110. Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, Baylink D : Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J Clin Endocrinol Metab* 71 : 1322-1329, 1990.
111. Fukayama S, et Tashjian HS : Direct modulation by androgens of the response of human bone cells (SaOS-2) to human parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology* 125 : 1789-1794, 1989.
112. Benz DJ, Haussler MR, Thomas MA, Speelman B, et Komm BS : High-affinity androgen binding and androgenic regulation of $\alpha_1(I)$ -procollagen and transforming growth factor- β steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* 128 : 2723-2730, 1991.
113. Gill RK, Turner RT, Wronski TJ, et Bell NH : Orchiectomy markedly reduces the concentration of the three isoforms of transforming growth factor beta in rat bone, and reduction is prevented by testosterone. *Endocrinology* 139:546-550, 1998

114. Orwoll ES, et Klein RF : Osteoporosis in men. *Endocr Rev* 16 : 87-116, 1995.
115. Linkhart TA, et Keffer MJ : Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II release from cultured neonatal mouse calvaria by parathyroid hormone, transforming growth factor- β , and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 128:1511-1518, 1991.
116. Staal A, Geertsma-Kleinekoort WMC, Van Den Bemd GJCM, Buurman CJ, Birkenhager JC, Pols HAP, et Van Leeuwen JPTM : Regulation of osteocalcin production and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in mouse long bones: interaction with the bone-derived growth factors TGF- β and IGF-I. *J Bone Miner Res* 13:36-43, 1998.
117. Jones JJ, et Clemons DR : Insulin-like growth factors and their binding proteins : Biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34, 1995.
118. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, et Roberts AB : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor type beta (TGF- β) in vitro. *J Cell Biol* 105:457-463, 1987.
119. Oursler MJ : Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 9:443-452, 1994.
120. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, et McCarthy TL : Transforming growth factor- β gene family and bone. *Endocr Rev* 15:27-39, 1994.
121. Bonewald LF, et Mundy GR : Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Ortho Rel Res* 250:261-276, 1990.
122. Chen TL, et Bates R : Recombinant human transforming growth factor β 1 modulates bone remodeling in a mineralizing bone organ culture. *J Bone Miner Res* 8:423-434, 1993.
123. Hock JM, Centrella M, et Canalis E : Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122:254-260, 1988.
124. McCarthy TL, Centrella M, et Canalis E : Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 124::301-309, 1989.
125. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K, et Kumegawa M : Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology* 131:1075-1080, 1992.
126. Humbel RE : Insulin-like growth factors, somatomedins, and multiplication-stimulating activity : Chemistry. Dans *Hormonal proteins and peptides*, Li CH Eds, Academic Press, New York, 1984, pp 56-58.
127. Wong GL, Kotliar D, Schlaeger D, et Brandes SJ : IGF-I production by mouse osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 5:133-140, 1990.

128. Cross M, et Dexter MT : Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 64:271-280, 1991.
129. Mohan S, et Baylink DJ : Isolation and characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced by human bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 6:S141, 1991.
130. Bautista CM, Baylink DJ, et Mohan S : Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone : A potential candidate for fixing IGF-II in human bone. *Biochem Biophys Res Commun* 176:756-763, 1991.
131. Andress DL, et Birnbaum RS : Human osteoblast-derived insulin-like growth factor binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J Biol Chem* 267:22467-22471, 1991.
132. Chen TL, Chang LG, Di Groggorio DA, Perlman AJ, et Huang Y-F : Growth factor modulation of insulin-like growth factor-binding proteins in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* 133:1382-1389, 1993.
133. Kanzaki S, Hilliker S, Baylink DJ, et Mohan S : Evidence that human bone cells in culture produce insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 proteases. *Endocrinology* 134:383-392, 1994.
134. Martin TJ, Allan EH, et Fukumoto S Martin TJ : The plasminogen activator and inhibitor in bone remodelling. *Growth Regul* 3:209-214, 1993.
135. Allan EH, et Martin TJ : The plasminogen activator inhibitor system in bone cell function. *Clin Ortho Rel Res* 313:54-63, 1995.
136. Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, et McMaster JH : Involvement of plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 130:1410-1412, 1992.
137. Czech MP : Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59:235-238, 1989.
138. Frattati AL, et Pessin JE : Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J Biol Chem* 268:7393-7400, 1993.
139. Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CTJ, et Lehoith D : Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268:2655-2661, 1993.
140. Nielsen FC : The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res* 4:257-290, 1992.
141. Oka Y, Rozek LM, et Czech MP : Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates ¹²⁵I-insulin-

- like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. *J Biol Chem* 260:9435-9442, 1985.
142. Guicheux J, Heymann D, Rousselle AV, Gouin F, Pilet P, Yamamda S, et Daculsi G : Growth hormone stimulatory effects on osteoclastic resorption are partly mediated by insulin-like growth factor I : An invitro study. *Bone* 22:25-31, 1998.
 143. Bianda T, Glatz Y, Bouillon R, froesch R, et Schmid C : Effects of short-terme insulin-like growth factor-I (IGF-I) or growth hormone (GH) treatment on bone metabolism and on production of 1,25-dihydroxycholecalciferol in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab* 83:81-87, 1998.
 144. Canalis E, Pash J, Gabbitas B, Rydziel S, et Varghese S : Grotwh factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures. *Endocrinology* 133:33-38, 1993.
 145. Kingsley DM : The TGF β superfamily : New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146, 1994.
 146. Sporn MB, et Roberts AB : The tranforming growth factors- β s. Dans *Peptide growth factors and their receptors I*, Springer-Verlag Eds., Berlin, 1992, pp. 419-472.
 147. Dallas SL, et Shaun P-S : Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor- β (TGF β) complexes in osteoblast-like cells. *Endocrinology* 133:2187-2196, 1994.
 148. Feige J-J, Quirin N, et Souchelnitskiy S : TGF β , un peptide biologique sous contrôle : Formes latentes et mécanismes d'activation. *Médecine/Sciences* 12:929-939, 1996.
 149. Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, et Sporn MB : Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta 1, 2, and 3. *Growth Factors* 3:35-43, 1990.
 150. Oreffo ROC, Mundy GR, Seyedin SM, et Bonewald LF : Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 158:817-823, 1989.
 151. Allan EH, Zeheb R, Gelehrter TD, et al : Transforming growth factor beta inhibits plasminogen activator (PA) activity and stimulates production of urokinase-type PA, PA inhibitor-1 mRNA, and protein in rat osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 149:34-43, 1991.
 152. Harpel JG, Metz CN, Kojima S, et Riffin DB : Control of transforming growth factor- β activity : Latency vs activation. *Prog Growth Factor Res* 4:321-335, 1992.
 153. Yee J, et Yan L : Plasminogen-dependant activation of latent transforming growth factor beta (TGF β) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 157:528-534, 1993.

154. Schultz-Cherry S, Murphy-Ulrich JE : Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- β secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 122:923-932, 1993.
155. Souchelnitskiy S, Chambaz EM, et Feige JJ : Thrombospondin selectively activate one of two latent forms of transforming growth factor- β present in adrenocortical cell-conditioned medium. *Endocrinology* 136:5118-5126, 1995.
156. Ten Dijke P, Franzen P, Yamashita H, Ichijo H, Heldin CH, et Miyazono K. Serine/threonine kinase receptors. *Prog Growth Factor Res* 5:55-72, 1994.
157. Vivien D, Attisano L, Wrana JL, Massagué J : Signaling activity of homologous transforming growth factor-beta receptor kinase complexes. *J Biol Chem* 270:7134-7141, 1995.
158. Stein G, et Lian J : Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine reviews* 14:424-441, 1993
159. Centrella M, McCarthy TL, et Canalis E : Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262:2869-2874, 1987.
160. Erlebacher, et Derinck R : Increased expression of TGF β 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 132:195-210, 1996.
161. Baserga R : Editorial : The path less traveled by. *Endocrinology* 138:2217-2218, 1997.
162. Blenis J : Signal transduction via the MAP Kinases : proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5889-5892, 1993.
163. White MF, et Kahn CR : The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4, 1994.
164. Hill CS, et Treisman R : Transcriptional regulation by extracellular signals : Mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211,1995.
165. Pardee AB : G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608, 1989.
166. Atfi A, Buisine M, Mazars A, et Gespach C : Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem* 272:24731-24734, 1997.
167. Liu X, Sun Y, Constantinescu SN, Karm E, Weinberg RA, et Lodish HF : Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10669-10674, 1997.

168. Massagué J : TGF β signaling: Receptors, transducers and Mad proteins. *Cell* 85:947-950, 1996.
169. Miyazono K : TGF-beta receptors and signaling. *Int J Hematol* 65:97-104, 1997.
170. Barrack ER : TGF beta in prostate cancer : A growth inhibitor that can enhance tumorigenicity. *Prostate* 31:61-70, 1997.
171. Guo Y, et Kiprianou N : Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ* 2:185-193, 1998.
172. Lawler S, Feng XH, Chen RH, Maruoka EM, Turck CW, Griswold-Prenner I, et Derynck R : The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Biol Chem* 272:14850-14859, 1997
173. Hollenberg MD : Examples of homospecific and heterospecific receptor regulation. *Trends Pharmacol Sci* 6:242-245, 1985.
174. Marx J : Two major signal pathways linked. *Science* 262:988-990, 1993.
175. Reinikainen P, Palvimo JJ, et Janne OA : Effects of mitogens on androgen receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 137:4351-4357, 1996.
176. Takahashi Y, Tobe K, Kadowaki H, Katsumata D, Fukushima Y, Yasaki Y, Akanuma Y, et Kadowaki T : Roles of insulin receptor substrate-1 and Shc on insulin-like growth factor I receptor signaling in early passages of cultured human fibroblasts. *Endocrinology* 138:741-750, 1997.
177. Atfi A, Drobetsky E, Boissonneault M, Chapdelaine A, et Chevalier S : Transforming growth factor beta α down-regulate Src family protein tyrosine kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 269:30688-30693, 1994.
178. Kolodziejczyk SM, et Hall BK : Signal transduction and TGF-beta superfamily receptors *Biochem Cell Biol* 74:299-314, 1996.
179. Krymskaya VP, Hoffman R, Eszterhas A, Ciocca V, et Panettieri RA Jr : TGF-beta 1 modulates EGF-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 273:L1220-L1227, 1997.
180. Martin GR, et Sank AC : Extracellular matrix, cells, and growth factors. Dans *Peptide growth factors and their receptors II* (Chapitre 34), Springer-Verlag, Berlin, 1991, pp. 463-477.
181. Gerhon RP, Shen LWF, Young MF, et Termine JD : The biochemistry of bone. Dans *Osteoporosis: Etiology, diagnosis, and mangement*, Riggs Bl et Melton LJ III Eds., Raven Press, New York, pp 95-109, 1988.

182. Rifas L, Fausto A, Scott MJ, Avioli LV, et Welgus HG : Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis. *Endocrinology* 134:213-221, 1994.
183. Partridge NC, Jeffrey JJ, Ehrlich LS, et al : Hormonal regulation of the production of collagenase and a collagenase inhibitor by rat osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology* 120:1956-1962, 1987.
184. Thompson BM, Atkinson SJ, McGarrity AM, et al : Type-1 collagen degradation by mouse calvarial osteoblasts stimulated with 1,25dihydroxyvitamin D3 : Evidence for a plasminogen-plasmin-metalloproteinases activation cascade. *Biochim Biophys Acta* 1014:125-1323, 1989.
185. Hamilton JA, Lingelbach SR, Partridge NC, Martin TJ : Regulation of plasminogen activator production by resorbing hormones in normal and malignant osteoblasts. *Endocrinology* 116:2186-2191, 1985.
186. Rabanni SA, Gladu J, Mazar AP, Henkin J, et Goltzman D : Induction in human osteoblastic cells (SaOS2) of the early response genes for jun and myc by the amino terminal fragment (ATF) of urokinase. *J Cell Physiol* 172:137-145, 1997.
187. Pfeilshifter J, Bonewald L, et Mundy GR : Role of growth factors in cartilage and bone metabolism. Dans *Peptide growth factors and their receptors II* (Chapitre 34), Springer-Verlag, Berlin, 1992, pp.371-400.
188. Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P : Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA Stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1105-1108, 1988.
189. Berretoni EA, et Carter JR : Mechanisms of cancer metastasis to bone. *J Bone Joint Surg* 68A:303-312, 1986.
190. Koutsilieris M : Skeletal metastases in advanced prostate cancer: Cell biology and therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 18:51-64, 1995.
191. Galasko CSB : Mechanisms of lytic and blastic metastatic disease of bone. *Clin Orthopaed Rel Res* 12:20, 1982.
192. Stoll BA : Natural history, prognosis and staging of bone metastases. Dans *Bone metastasis: monitoring and treatment*, New York, Stoll B. A. et Parbhoo S. éds., 1983, pp 65-78.
193. Suzuki T, Shimizu T, Kurokawa K, Jimbo H, Sato J, et Yamanaka H : Pattern of prostate cancer matastasis to the vertebral column. *Prostate* 25: 141-146, 1994
194. Nishiyima Y, Uchida K, Koiso K, et Nemoto R : Clinical significance of the vertebral vein in prostatic cancer matastasis. Dans *Prostate cancer and bone metastasis*. Karr J. P. et Yamanaka H. éds., Plenum Press, New York, 1992, pp 93-100.

195. Sandberg AA : Cytogenetic and molecular genetic aspects of human prostate cancer: primary and metastatic. Dans *Prostate cancer and bone metastasis*. Karr J. P. et Yamanaka H. éds., Plenum Press, New York, 1992, pp 45-76.
196. Macintosh CA, Stower M, Reid N, Maitland NJ : Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypique heterogeneity. *Cancer Res* 58:23-28, 1998.
197. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr AH, Zhang J, Thurnher M, Bartsch G, et Klocker H : Regulation of prostatic growth and function by peptides growth factors. *Prostate* 28:392-405, 1996.
198. Peehl DM : Cellular biology of prostate growth factors. *Prostate (suppl)* 6:74-78, 1996.
199. Lee C : Role of androgen in prostate growth and regression: stromal-epitheliale interaction. *Prostate (suppl)* 6:52-56, 1996.
200. Cunha GR : Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer (suppl)* 74:1030-1044, 1994.
201. Furuya Y, et Isaacs JT : Differential gene regulation programmed death (apoptosis) versus proliferation of prostatic glandular cells induced by androgen manipulations. *Endocrinology* 133:2660-2666, 1993.
202. Denmeade SR, Xiaohui SL, et Isaacs JT : Role of prograded (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 28:251-265, 1996.
203. Chevalier S, McKercher G, et Chapdelaine A : Hyperplasie bénigne de la prostate: hormones steroïdiennes et facteurs de croissance. *Médecine/Science* 9:542-546, 1993.
204. Di Sant'agnese PA : Neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma. *Cancer (suppl)* 75:1850-1859, 1995.
205. Bonkhoff H, Wernert N, Dhom G, et Remberger K : Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, neoplastic human prostate. *Prostate* 19:91-98, 1991.
206. Ittman M, Mansukhani A : Expression of fibroblast growth factors (FGFs) and FGF receptors in human prostate. *J Urol* 157:351-356, 1997.
207. Steiner MS, et Barrack ER : Transforming growth factor-b1 overproduction in prostate cancer : effects on growth in vivo and in vitro. *Mol Endo* 6:15-25, 1992.
208. Ritchie CK, Andrews LR, Thomas KG, Tindall DJ, et Fitzpatrick LA : The effects of growth factors associated with osteoblasts on prostate carcinoma proliferation and chemotaxis: implications for the developpment of metastatic disease. *Endocrinology* 138:1145-1150, 1997.
209. Rajan R, Vanderslice R, Kapur S, Lynch J, Thompson R, et Djakiew D : Epidermal growth factor (EGF) promotes chemomigration of a human prostate tumor cell line, and

- EGF immunoreactive proteins are present at sites of metastasis in the stroma of lymph nodes and medullary bone. *Prostate* 28:1-9, 1996.
210. Kostenuik PJ, Sanchez-Sweatman O, Orr FW, et Singh G : Bone cell matrix promotes the adhesion of human prostatic carcinoma cells via the $\alpha 2\beta 1$ integrin. *Clin Exp Metastasis* 14:19-26, 1996.
 211. Kostenuik PJ, Orr FW, et Singh G : TGF β stimulates the $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated adhesion of PC-3 prostatic carcinoma cells to type I collagen. *Proc Am Assoc Cancer Res* 36:62-66, 1995.
 212. Giunciulo D, Cai T, Filanti C, Manduca P, et Albini A : Effect of osteoblast supernatants on cancer cell migration and invasion. *Cancer Lett* 97:69-74, 1995.
 213. Lang SH, Miler WR, et Habib FK : Stimulation of human prostate cancer cell lines by factors present in human osteoblast-like cells but not in bone marrow. *Prostate* 27:287-293, 1995.
 214. Manishen WJ, Sivananthan K, et Orr FW : Resorbing bone stimulates tumor cell growth: A role for the host microenvironment in bone metastasis. *Am J Pathol* 123:39-45, 1985.
 215. Chackal-Roy M, Niemeyer C, Moore M, et Zetter BR : Stimulation of human prostatic carcinoma cell growth in vivo by factors present in human bone marrow. *J Clin Invest* 84:53-50, 1989.
 216. Rossi MC, et Zetter BR : Selective stimulation of prostatic carcinoma cell proliferation by transferrin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:6197-6201, 1992.
 217. Zetter BR, Chackal-Roy M, et Smith B : The cellular basis for prostate cancer metastasis. Dans *Prostate cancer and bone metastasis*. Karr J. P. et Yamanaka H. éds., Plenum Press, New York, 1992, pp 39-43.
 218. Lang SH, Miler WR, Duncan W, et Habib FK : Production and response of human prostate cancer cell lines to granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *Int J Cancer* 59:235-241, 1994.
 219. Gleave M, Hsieh J-T, Gao C, von Eschenbach AC, et Chung LWK : Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res* 51:3756-3761, 1991.
 220. Janvier R, Sourla A, Koutsilieris M, et Doillon C : Stromal fibroblasts are required for PC-3 human prostate cancer cells in a three-dimensional co-culture system. *Anticancer Res* 17:1551-1558, 1997.
 221. Hepburn JP, Griffiths K, et Harper E : Angiogenic factors expressed by human prostatic cell lines: effect on endothelial cell growth in vitro. *Prostate* 33:123-132, 1997.
 222. Jacobs SC, et Lawson RK : Mitogenic factor in human prostate extracts. *Urology* 16:488-491, 1980.

223. Koutsilieris M, Rabbani SA, et Goltzman D : Selective osteoblast mitogens can be extracted from prostatic tissue. *Prostate* 9:109-115, 1986.
224. Koutsilieris M, Rabbani SA, et Goltzman D : Effects of human prostatic mitogens on rat bone cells and fibroblasts. *J Endocr* 115:447-454, 1987.
225. Perkel VS, Mohan S, Herring SJ, Baylink DJ, et Linkhart TA : Human prostatic cancer cells, PC-3, elaborate mitogenic activity which selectively stimulates human bone cells. *Cancer Res* 50:6902-6907, 1990.
226. Rabbani SA, Desjardins J, Bell AW, Banville D, Mazar A, Henkin J, et Goltzman D : An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostatic cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Comm* 173:1058-1064, 1990.
227. Killian CS, Corral DA, Kawinski E, et Constantine R : Mitogenic response of osteoblast cells to prostatic-specific antigen suggests an activation of latent TGF β and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 192:940-947, 1993.
228. Owen TA, Aronow M, Shalboub V, Barone LM, Wilming L, Tassirini MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, et Stein GS : Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143:420-430, 1990.
229. Goltzman D : Mechanism of the development of osteoblastic metastases. *Cancer (Suppl)* 80:1581-1587, 1997.
230. Martinez J, Silva S, et Santibanez JF : Prostate-derived soluble factors block osteoblast differentiation in culture. *J Cell Biochem* 61:18-25, 1996.
231. Santibanez JF, Silva S, et Martinez J : Soluble factors produced by PC-3 prostate cells decrease collagen content and mineralisation rate in fetal rat osteoblasts in culture. *British J Cancer* 74:418-422, 1996.
232. Kimura G, Sugisaki Y, Masugi Y, et Nakazawa N : Calcification in human osteoblasts cultured in medium conditioned by prostatic cancer cell line PC-3 and prostatic acid phosphatase. *Urol Int* 48:25-30, 1992.
233. Festuccia C, Teti A, Bianco P, Guerra F, Vicentini C, Tennina R, Villanova I, Sciortino G, et Bologna M : Human prostatic tumors cells in culture produce growth and differentiation factors active on osteoblasts: a new biological and clinical parameter for prostatic carcinoma. *Oncol Res* 9:419-431, 1997.
234. Rabbani SA, et Xing RH : Role of urokinase (uPA) and its receptor (uPAR) in invasion and metastasis of hormone-dependant malignancies. *Int J Oncol* 12:911-920, 1998.
235. Dubé JY : La kallibréine hK2 peut-elle favoriser la progression des tumeurs cancéreuses de la prostate. *Médecine/Science* 14:111-113, 1998.

236. Hortobagyi GN, Theriault RL, Porter L, Blynd D, Lipton A, et Sinnoff C : Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. *N Engl J Med* 335:1785-1781, 1996.
237. Theriault RL, et Hortobagyi GN : Bone metastasis in breast cancer. *Anti-Cancer Drugs* 3:455-462, 1992.
238. Larra F : Cancers du Sein. Dans *Manuel de cancérologie* (nouvelle éd.) Paris, Doin Éd., 1989, pp. 155-166.
239. Walker RA, Jones JI, Chappell S, Walsh T, et Shaw JA : Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metastasis Rev* 16:5-27, 1997
240. Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgardsdottir R, Gudlaundsdottir S, Sigurdsson S, Steinarsdottir M, Jonasson JG, Ananthawat-Jonsson K, et Eyfjord JE : BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res* 58:859-862 1998.
241. Knoop A, Andreassen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV, Simonsen AC, Andersen J, et Overgaard J : Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 77:932-940, 1998.
242. Gallacchi P, Schoumacher F, Eppenberger-Castori S, Von Landerberg EM, Kueng W, Eppenderberg U, et Mueller H : Increased expression of estrogen-receptor exon-5-deletion variant in relapse tissues of human breast cancer. *Int J Cancer* 79:44-48, 1998.
243. Yeates C, Hunt SM, Balleine RL, et Clarke CL : Characterization of a truncated progesterone receptor protein in breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:460-467, 1998.
244. Hortobagyi GN : Management of breast cancer: Status and future trends. *Semin Oncol* 22:101-107, 1995.
245. Callahan R : Somatic mutations that contribute to breast cancer. *Biochem Soc Symp* 63:211-221, 1998.
246. Slingsh B, Ittman MM, et Krolewski JJ : Sporadic breast cancer exhibit loss of heterozygosity on chromosome segment 10q23 close to the Cowden disease locus. *Genes Chromosomes Cancer*, 21:166-171.
247. Ellissen LW, et Haber DA : Hereditary breast cancer. *Annu Rev Med* 49:425-436, 1998.
248. Beuzard M, et Bursaux E : Le cancer du sein à l'ère des gènes de prédisposition. *Médecine/Science* 14:128-131, 1998.
249. Moustafa AS, et Nicolson GL : Breast cancer metastasis-associated genes : Prognostic significance and therapeutic implications. *Oncol Res* 9:505-525, 1997.

250. Sourvinos G, et Spandidos DA : Decreased BRCA1 expression levels may arrest the cell cycle through activation of p53 checkpoint in human sporadic breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 245:75-80, 1998.
251. Bertwistle D, et Ashworth A : Fonctions of the BRCA1 and BRCA2 genes. *Curr Opin Genet Dev* 8:14-20, 1998.
252. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, et Bissel MJ : Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast : importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 76 :69-125, 1996.
253. Sledge GW Jr : Implications of the new biology for therapy in breast cancer. *Semin Oncol* 23:76-81, 1996.
254. Kondakapa SB, Fridman R, et Reddy KB : Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 70:722-726, 1997.
255. Farina AR, Coppa A, Tiberio A, Tacconelli A, Turco A, Colletta G, Gullino A, et Mackay AR : Transforming growth factor-beta1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity. *Int J Cancer* 75:721-130, 1998.
256. Hildenbrand R, Jansen C, Wolf G, Bohme B, Berger S, von Minckwitz G, Horlin A, Kauffman M, et Stutte HJ : Transforming growth factor-beta stimulates urokinase expression in tumor-associated macrophages of the breast. *Lab Invest* 78:59-71, 1998.
257. Maemura M, et Dickson RB : Are cellular adhesion molecules involved in the metastasis of breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 32:239-260, 1994.
258. Yoneda T, Sasaki A, et Mundy GR : Osteolytic bone metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 32 : 73-84, 1994.
259. Tondravi M, Quiroz M, Wang M, Teitelbaum SL : Increased rate of skeletal metastasis by human breast cancer cells expressing low levels of alpha3 beta1 integrin. *J Bone Miner Res* 11(suppl 1):S98, 1996.
260. Mallet L : Les cancers du sein, formes typiques des métastases osseuses. Dans *Métastases osseuses et tumeurs malignes des os*, Paris, Éd. S.P.E.I., 1963, pp 15-17.
261. Yoneda T : Arterial microvascularization and breast cancer colonization in bone. *Historiopathol* 12 : 1145-1149, 1997.
262. Eilon G, et Mundy GR : Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro. *Nature* 276 : 726-728, 1978.
263. De Bruyn PPH : Structural substrates of bone marrow function. *Semin Hematol* 18 : 179-193, 1981.

264. Broosk B, Bundred NJ, Howell A, Lang SH, et Testa NG : Investigation of mammary epithelial cell-bone marrow stroma interactions using primary human cell culture as a model of metastasis. *Int J Cancer* 73 : 690-696, 1997.
265. Mundy GR : Mechanisms of bone metastasis. *Cancer (suppl)* 80 : 1546-1556, 1997.
266. Thalmeier K, Meissner P, Reisbach G, Hultner L, Mortensen BT, Brechtel A, Oostendorp RAJ, et Dörmer P : Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell line. *Exp Haematol* 24 : 1-10, 1996.
267. Athanasou NA, et Quinn JMW : Human tumor-associated macrophages are capable of bone resorption. *By J Cancer* 65 : 523-526, 1992.
268. Quinn JMW, et Athanasou NA : Tumor infiltrating macrophages are capable of bone resorption. *J Cell Sci* 101 : 681-686, 1992.
269. Taube T, Elomaa I, Blomqvist C, Beneton MNC, et Kanis JA : Histomorphometric evidence for osteoclast-mediated bone resorption in metastatic breast cancer. *bone* 15 : 161-166, 1994.
270. Morinaga Y, Fujita N, Ohishi K, et Tsuruo T : Stimulation of interleukin-11 production from osteoblastlike cells by transforming growth factor- β and tumor cell factors. *Int J Cancer* 71 : 422-428, 1997.
271. Mundy GR : Mechanisms of osteolytic bone destruction. *bone* 12 (suppl) : 1-6, 1991.
272. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce FB, Yoneda T, et Mundy GR : Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98 : 1544-1549, 1996.
273. Guise TA : Parathyroid hormone-related protein and bone metastases. *Cancer (Suppl)* 80:1572-1580, 1997.
274. Manolagas SC : Role of cytokines in bone resorption. *bone* 17 :63-67, 1995.
275. Powell GJ, Southby J, Danks JA, Stillwell RG, Hayman JA, Henderson MA, Bennett RC, et Martin TJ : Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer. *Cancer Res* 50 : 7710-7716, 1990.
276. Bundred NJ, Walker RA, Ratcliffe WA, Warwick J, Morrison JM, et Ratcliffe JG : Parathyroid hormone related protein and skeletal morbidity in breast cancer. *Eur J Cancer* 28 : 690-692, 1992.
277. Zakalik D, Diep D, Hooks MA, Nissensor CA, et Strewler GJ : Transforming growth factor beta increases stability of parathyroid hormone related protein messenger RNA. *J Bone Miner Res* 7 (suppl) abstr : 104, 1992.

278. Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R et al : Biphosphorate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res* 55 : 3551-7,1995.
279. Yin JJ, Chirgwin JM, Taylor SD, Dallas J, Massague J, Mondy GK, et al : Dominant negative blockade of the transforming growth factor β (TGF β) type II receptor decreases breast cancer-mediated osteolysis. *J Bone Miner Res* 11 : (suppl) : 180, 1996.
280. Yoneda T, Williams P, Dunstan C, Charez J, Miewolna M, et Mundy GR : Growth of metastatic cancer cells in bone is enhanced by bone-derived insulin-like growth factors. *J Bone Miner Res* 10 (suppl. 1) p269a : 196a(abstr), 1995.
281. Huggins C, et Hodges CV : The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1 : 293-297, 1941.
282. Labrie F, Dupont A, et Bélanger A : Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer. Dans *Important advances in oncology*, Devita VT, Hellman S, Rosenberg S. Eds., Philadelphia, 1985, pp. 193-217.
283. Klijn JGM, de Voogt HJ, Studer UE, Schroder FH, Sylvester R, et de PauW M : Short term versus long-term addition of cyproterone acetate to buserelin therapy in comparaison with orchiectomy in the treatment of metastatic prostate cancer. *Cancer* 72 : 3858-3869, 1993.
284. Labrie F, Cusan L, Gonez J-L, Diamond P, Suburu R, Lemay M, Tetu B, Fradet Y, Bélanger A, et Candas B : Neoadjuvant hormonal therapy : the canadian experience. *Urology* 4 (suppl 3A) : 56-64, 1997.
285. Janknegt RA, Abbou CC, Batoletti R, Bernstein-Hann L, Bracken B, Brisset JM, DaSilva FC, Chisholm G, Crawford ED, et Debruyne FM : Orchiectomy and nilutamide or placebo as treatment of metastatic prostatic cancer in a multinational double-blind randomized trial. *J Urol* 149 : 77-82, 1993.
286. Smith DC : Secondary hormonal therapie. *Semin Urol Onco* 2 15 : 3-12, 1997.
287. Smail M, et Gomella LG : Current treatment of advanced prostate cancer. *Tech Urol* 3 : 16-24, 1997.
288. Konety BR, et Getzenberg RH : Novel therapies for advanced prostate cancer. *Semin Urol Oncol* 15 : 33-42, 1997.
289. Roth BJ : New therapeutic agents for hormone-refractory prostate cancer. *Semin Oncol* 23 : 49-55, 1996.
290. Boulikas T : Gene therapy of prostate cancer : p53, suicidal genes, and other targets. *Anticancer Res* 17 : 1471-1506, 1997.
291. Kolvenbag, GJ, Blackledge GR, et Gotting-Smith K : Bicalutamide (Casodex) in the treatment of prostate cancer : history of clinical development. *Prostate* 34 : 61-72, 1998.

292. Labrie F, Bélanger A, Cusan L, et al : History of LHRH agonist and combination therapy in prostate cancer. *Endocrine Related Cancer* 3 : 243-278, 1996.
293. Taplin M-E, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, et Balk JP : Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independant prostate cancer. *N Engl J Med* 332 : 1393-1398, 1995.
294. Gottlieb B, Trifiro M, Lumbroso R, Pinsky L : The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acid Res* 25 : 158-167, 1997.
295. Hakimi JM, Rondinelli RH, Schoenberg MP, et Barrack ER : Androgen-receptor gene structure and function in prostate cancer. *World J Urol* 14 : 329-337, 1996.
296. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PV : the CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 3320-3323, 1997.
297. Newmark JR, Hardy DO, Tonb DC, Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB, Brown TR, Barrack ER : Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89 : 6319-6323.
298. Ruizeveld de Winter JA, Janssen PJ, Sleddens HM, Verleun-Mooijman MC, Trapman J, Brinkmann AO, Santerse AB, Schroder FH, van der Kwast TH : Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol* 1994, 144 : 735-746.
299. Koivisto P, Kolmer M, Visakorpi T, et Kallioniemi O-P : Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer. *Am J Pathol* 152 : 1-9, 1998.
300. Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, Peterziel Heike, Cato ACB, Bartsch G, et Klocker H : Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *Prostate*, 35 :63-70 1998.
301. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvänen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, Kallioniemi O-P : Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1995, 55 : 142-147.
302. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Hyytinen E, Tammela T, Trapman J, Isola J, Visakorpi T, Kallioniemi O-P : Androgen receptor gene amplification : a possible molecular mechanism for failure of androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Cancer Res* 1997, 57 : 314-319.
303. Yeh S, Chang C : Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA₇₀, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93 :5517-5521.

304. Kallio PJ, Poukka H, Moilanen A, Janne OA, Palvimo JJ : Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol Endocrinol* 1995, 9 : 10197-1028.
305. Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R : Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 1987, 238 : 1386-1392.
306. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM : c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 1995, 82 :721-732.
307. Palvimo JJ, Reinikainen P, Ikonen T, Kallio PJ, Moilanen A, Janne OA : Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor. *J Biol Chem* 1996, 271 :24151-24156.
308. Labrie F, Belanger A, Dupont A, Luu-The V, Simard J, Labrie C : Science behind total androgen blockade : from gene to combination therapy. *Clin Invest Med* 1993, 16 :475-492.
309. Caubet J-F, Tosteson TD, Dong EW, Naylor EM, Whiting GW, Ernstoff MS, et Ross SD : Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer : a meta-analysis of published randomized controlled trials using nonsteroidal antiandrogens. *Urology* 49 :71-78, 1997.
310. Mashal RD, Lester S, Corless C, Richie JP, Chandra R, Propert KJ, Dutta A : Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer. *Cancer Res* 1996, 56 : 4159-4163.
311. Lu S, Tsai SY, et Tsai MJ : Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth : Androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res* 57:4511-4516, 1997.
312. Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, Aaronson SA : Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 1984, 309 : 464-466.
313. Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Finkel G, Lundy J, Hand P, Thor A, Schlom J : Expression of ras oncogene p21 in prostate cancer. *N Engl J Med* 1986, 314 : 133-137.
314. Muir GH, Butta A, Shearer RJ, Fisher C, Dearnaley DP, Flanders KC, Sporn MB, Colletta AA : Induction of transforming growth factor beta in hormonally treated human prostate cancer. *Br J Cancer* 1994, 69 : 130-134.
315. Sherwood ER, Lee C : Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate. *World J Urol* 13 :290-296, 1995.
316. Story MT : Regulation of prostate growth by fibroblast growth factors. *World J Urol* 13 :297-305, 1995.

317. Nazareth LV, Weigel NL : Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem* 271 : 19900-19907, 1996.
318. Culig Z, Hobisch A, Cronaver MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, et Klocker H : 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, 1994.
319. Chen X, Okada H, Goton A, Arakawa S, et Kamidono S : Neuroendocrin cells in the prostatic carcinomas after neoadjuvant hormonal therapie. *Kobe J Med Sci* 43 : 71-81, 1997.
320. Koivisto P, Visakorpi T, Rantala I, et Isola J : Increased cell proliferation activity and decreased cell death are associated with the emergence of hormone refractory recurrent prostate cancer. *J Pathol* 183 : 51-56, 1997.
321. Westin P, Stattin P, Damber J-E, et Bergh A : Castration therapy induces apoptosis in a minority and decreases cell proliferation in a minority of human prostatic tumors. *Am J Pathol* 146 : 1368-1375, 1995.
322. Colombel M, Symmans F, Gil S, et al : Detection of the apoptosis suppressing oncoprotein bcl-2, in hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol* 143 : 390-400, 1993.
323. Apakama I, Robinson MC, Walter NM, Charlton RG, Royds JA, Fuller CE, Neal DE, et Hamdy FC : bcl-2 over expression combined with p53 protein accumulation correlates with hormone-refractory prostate cancer. *By J Cancer* 74 : 1258-1262, 1996.
324. Tu H, Jacobs SC, Borkowski A, et Kyprianov N : Incidence of apoptosis and cell proliferation in prostate cancer : relationship with TGF β , and bcl-2 expression. *Int J Cancer* 69 : 357-363, 1996.
325. Bonkhoff H, Fixemer T, Remberger K : Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissuc and precursors of prostate cancer. *Prostate* 34 : 251-258, 1998.
326. Mettlin CJ, et Murphy G : The national prostate cancer database report on prostate cancer. *Cancer* 74 : 1640-1648, 1994.
327. Janjan NA : Radiation for bone metastases : conventional techniques and the role of systemic radiopharmaceuticals. *Cancer* 80 (suppl 8) : 1628-1645, 1997.
328. Gaze MN, Kelly CG, Kerr GR, Cull A, Cowie VJ, Gregor A, Howard GC, et Rodger A : Pain relief and quality of life following radiotherapy for bone metastases : a randomised trial of two fractionation schedules. *Radiother Oncol* 45 : 109-116, 1997.
329. Pons F, Herranz R, Garcia A, Vidal-Sicart S, Conill C, Grau JJ, Alcover J, Fuster D, Setoain J : Strontium-89 for palliation of pain from bone metastases in patients with prostate and breast cancer. *Eur J Nucl Med* 24 : 1210-1214, 1997.

330. Baumrucker S : Palliation of painful bone metastases : Strontium-89, *Am J Hosp Palliat Care* 15 : 113-115, 1998.
331. Serafini AN, Houston SJ, Resche I, et al : Palliation of pain associated with metastatic bone cancer using samarium-153 lexidronam : a double-blind placebo-controlled clinical trial. *J Clin Oncol* 16 : 1574-1581, 1998.
332. Adami S : Bisphosphonates in prostate carcinoma. *Cancer* 80 (suppl 8) : 1674-1679, 1997.
333. Fernandez-Conde M, Alcover J, Aaron JE, Ordi J, et Carretero P : Skeletal response to clodronate in prostate cancer with bone metastases. *Am J Clin Oncol* 20 : 471-476, 1997.
334. Gallois L, Fiallo M, Garnier-Suillerot A : Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles : Circular dichroism study, *Biochim Biophys Acta*, 1370 : 31-40, 1998.
335. Henderson D, et Hurley LH : Molecular struggle for transcription control. *Nature Med* 1 : 525-527, 1995
336. Belpomme D : Diversité des mécanismes de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses. *Médecine/Sciences* 7 : 465-72, 1991.
337. Alaoui-Jamali M, et Mitra S : Les mécanismes de réparation de l'ADN : Des cibles potentielles en pharmacologie du cancer. *Méd/Sci* 12 : 766-73, 1996.
338. Ling V : Multidrug resistance : Molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemo Pharmacol* 40:s3-s8, 1997.
339. Siegmund MJ, Kreuzler C, Steidler A, Nebe T, Kohmann KU, et Alken P : Multidrug resistance in androgen-independent growing rat prostate carcinoma cells is mediated by P-glycoprotein. *Urol Res* 25:35-41, 1997.
340. Siegmund MJ, Stendler A, Kreuzler C, Kohrmann KU, Alken P : Enhanced in vitro cytotoxicity of idarubicin compared to epirubicin and doxorubicin in rat prostate carcinoma cells. *Eur Urol* 31:365-370.
341. Replogle-Schwab TS, Schwab ED, et Pienta KJ : Development of doxorubicin resistant rat prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 17 : 4535-4538, 1997.
342. Theyer G, Schirmbock M, Thalhammer T, Sherwood ER, Baumgartner G, et Hamilton G : Role of the MDR-1 encoded multiple drug resistance phenotype in prostate cancer cell lines. *J Urol* 150 : 1544-1547, 1993.
343. Mottaz AE, Markwalder R, Fey MF, Klima I, Merz VW, Thalmann GN, Ball RK, et Studer UE : Abnormal p53 expression is rare in clinically localized human prostate cancer : comparison between immunohistochemical and molecular detection of p53 mutations. *Prostate* 31 : 209-215, 1997.

344. Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Gaddipati JA, Weghorst CM, Buzard GS, Moul JW, et Srivastava S : Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 154 : 414-421, 1995.
345. Aprikian AG, Sarkis AS, Fair WR, Zhang ZF, Fuks Z, Cordon-Cardo C : Immunohistochemical determination of p53 protein nuclear accumulation in prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 151 : 1276-1280, 1994.
346. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, vos Eschenbach AC, et Conti CJ : p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85 : 1657-1689, 1993.
347. McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Conti C, von Eschembach, Brisbay S, et Logothetis CL : Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J Urol* 157:569-574, 1997.
348. Berchem GJ, Bosseler M, Sugars LY, Voeller HJ, Zeitlin S, et Gelman EP : Androgen induce resistance to bcl-2-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 55:735-738,1995.
349. Raffo AJ, Perlman H, Chen M-W, Pay ML, Stritman JS, et Buttyam R : Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 55:4438-4445,1995.
350. Beham A, Marin MC, Fernandez A, Herrman J, Brisbay S, Tari AM, Lopez-Berestein G, Lozano G, Sarkis M, et McDonnell TJ : Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* 15:2767-2772,1997.
351. Hill PA, Tumber A, et Meikle MC : Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 138:3849-3858,1997.
352. Guy YS, Jin GF, Houston CW, Thompson JC, et Townsend CM Jr : Insulin-like growth factor-I promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells. *J Cell Physiol* 175:141-148,1998.
353. Dunn SE, Hardman RA, Kari FW, Barrett JC : HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced diverse anticancer drugs. *Cancer Res* 57:2687-2693,1997.
354. Xu F, Gardner A, Tu Y, Michl P, Prager D, et Lichtenstein A : Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors. *Br J Haematol* 97:429-440,1997.
355. Parrizas M, et Leroith D : Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-XL gene product. *Endocrinology* 138:1355-1358,1997.

356. Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D : Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 372:154-161,1997.
357. Hsing AY, Kadomatsu K, Bonhamm MJ, et Danielpour D : Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta 1 in nontumorigenic rat prostate epithelial cell lines. *Cancer Res* 56:5146-5149,1996.
358. Rajah R, Valendinis B, Cohen P : Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independant mechanism. *J Biol Chem* 272:12181-12188,1997.
359. Teicher BA, Kakeji Y, Ara G, Herbst RS, et Northey D : Prostate carcinoma response to cytotoxic therapy : In vivo resistance. *In vivo* 11:453-462,1997.
360. Lalani EN, Laniado ME, et Abel PD : Molecular and cellular biology of prostate cancer. *Cancer Met Rev* 16:29-66,1997.
361. Webber MK, Bello D, et Quader S : Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cells lines: characteristics and applications part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate* 30:58-64, 1997.
362. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, et Paulson DF : Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU-145). *Int J Cancer* 21:274-281, 1978.
363. Kaighn ME, Narayan S, Ohnuki Y, Lechner JF, et Jones LW : Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16-23, 1979.
364. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, et Murphy GP : LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43:1809-1818, 1983.
365. Berns EMJJ, de Boer W, et Mulder E : Androgen-dependent growth regulation of and release of specific protein(s) by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCaP. *Prostate* 9:247-259, 1986.
366. Langelier EG, van Uffelen CJC, Blankenstein MA, van Steenbrugge GJ, et Mulder E : Effect of culture conditions on androgen sensitivity of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Prostate* 23:213-223, 1993.
367. Carruba G, Leake RE, Rinaldi F, Sorci C, Pavone-Macaluso M, et Castagnetta LAM : Steroid-growth factor interaction in human prostate cancer. 1. Short-term effects of transforming growth factors on growth of human prostate cancer cells. *Steroids* 59:412-420, 1994.
368. Borner MM, Myers CE, Sartor O, Sei Y, Toko T, Trepel JB, and Schneider E: Drug-induced apoptosis is not necessarily dependent on macromolecule synthesis or

- proliferation in the p53 negative human prostate cancer cell line PC-3. *Cancer Res* 55: 2122-2128, 1995.
369. Koutsilieris M, Sourla A, Pelletier G, and Doillon C: Three-dimensional type I collagen gel system for the study of osteoblastic metastases produced by metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res* 9: 1823-1832, 1994.
 370. Chaudhary LR, Avioli LV : Identification and activation of mitogen-activated protein(MAP kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells : attenuation of MAP kinase activation by cAMP, parathyroid hormone and forskolin. *Mol Cell Biochem* 178:59-68,1998.
 371. Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G: Biphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 27:38-41,1998.
 372. Jakob F, Siggedkoa H, Homann D, Kohrle J, Adamski J, Schutze N: Local stradiol metabolism in osteoblast and osteoblast-like cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:167-174, 1997.
 373. Taichman RS, Reilly MJ et Emerson SG: Human osteosarcomas inhibit hematopoietic colony formation: Partial reversal by antibody to transforming growth factor-beta 1. *Bone* 21:353-361, 1997.
 374. Pollard M et Luckert PH: Effects of dichloromethylene diphosphate on the osteolytic and osteoplastic effects of rat prostate adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 75:949-954,1985.
 375. Pollard M, Luckert PH, et Schew J: Effects of diphosphonate and X-rays on bone lesions induced in rats by prostate cancer cells. *Cancer* 61:2027-2032,1988.
 376. Geldof AA et Rao BR: Prostatic tumor (R3327) skeletal metastasis. *Prostate* 16:1303-1306,1990.
 377. Isaacs JT, Yu GW, Goffey DS: The characterization of a newly identified prostatic adenocarcinoma system: the MATLyLu tumor. *Invest Urol* 19:20-23,1981.
 378. Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Firegold JJ, Angelopoulou R, Rosen JM, et Grennberg NM: Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res* 56:4096-4102, 1996.
 379. Thalmann GN, Anezinis PE, Chang S, Zhaw H, Kim EE, Hopwood VL, Pathak S, von Eschenbach AC, et Chung LWK: Androgen independant cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cance Res* 54:2577-2581,1994.
 380. Chaudhary LR, Avioli LV: Activation of c-Jun NH2-terminal kinases by interleukin-6 beta in normal human osteoblastic and rat UMR-106 cells. *J Cell Biochem* 69:87-93,1998.

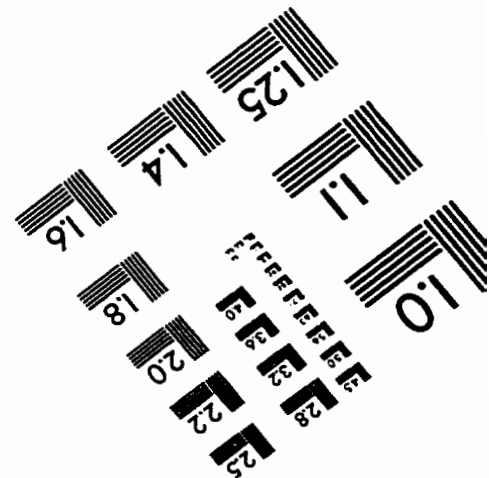
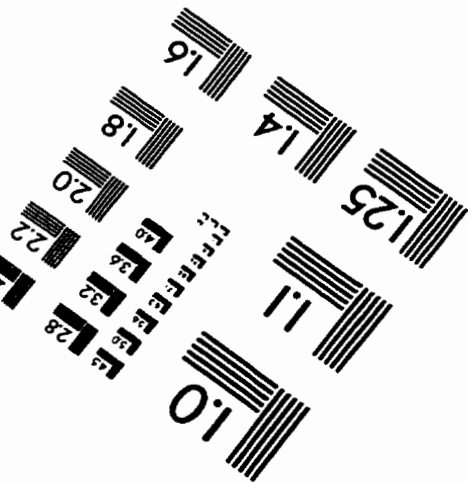
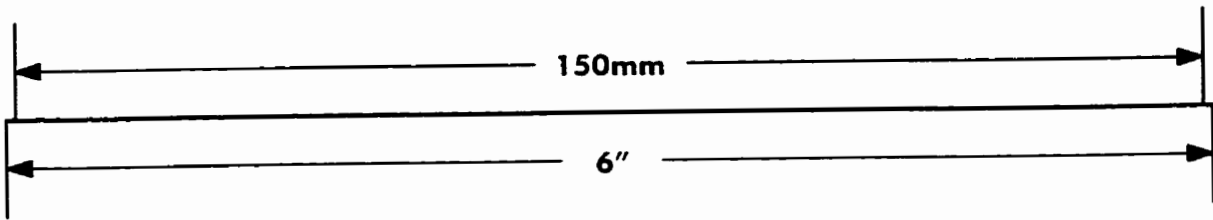
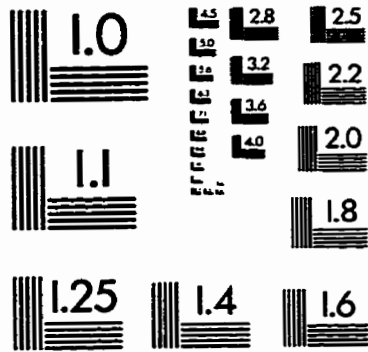
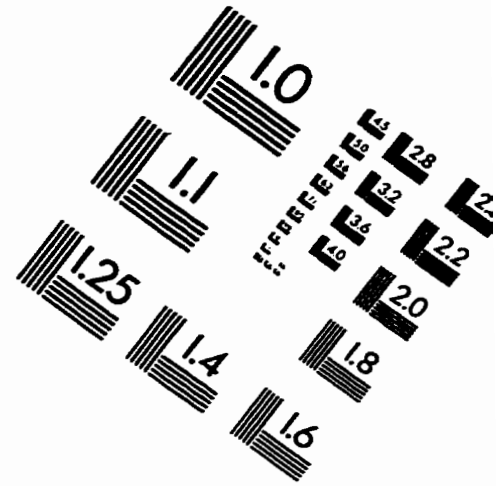
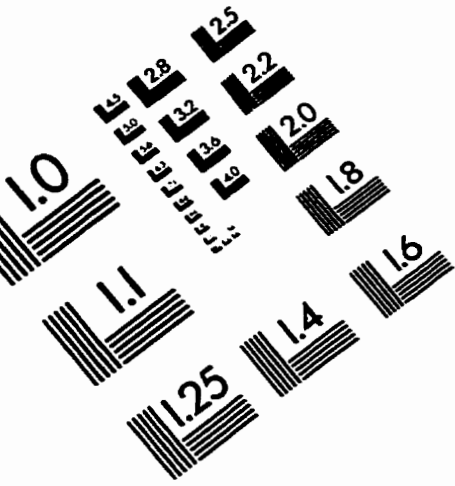
381. Qutob S, Dixon SJ, et Wilson JX: Insulin stimulates vitamin C recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells. *Endocrinology* 139:51-56,1998.
382. Staal A, van den Bend GJ, Birkenhages JC, Pols HA, et Van Lecuwen JP: Consequences of vitamin D receptor regulation for the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced 24-hydroxylase activity in osteoblast-like cells: initiation of the C₂₄-oxidation pathway. *Bone* 20:237-243,1997.
383. Kleinerman DI, Troncoso P, Pistors LL, Navore NM, Hsieh J-T, Logotheris CJ, von Eschenbach AC, Sleddens HFBM, van der Kwast TH, Brinkmann AO, Schroeder FH, Trapman J: Expression and structure of the androgen receptor in bone metastases of hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 155:626A(abstract),1996.
384. Coleman RE, Rubens RD: The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 55:61-66,1987.
385. Diel IJ, Kauffman M, Goesner R, Costa SD, Kaul S, et Bastert G: Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: A prognostic factof for distant metastasis. *J Clin Oncol* 10:1534-1539,1992.
386. Neilsen LL, Dell J, Maxwell E, Armstrong L, Maneval D, Catino JJ: Efficacy of p53 adenovirus-mediated gene therapy against human breast cancer xenografts. *Cancer Gen Ther* 4:129-138,1997.
387. De Vincenzo R, Scambia G, Ferlini C, Distefano M, Filippini R, Riva A, Bombardelli E, Pocar D, Gelmi ML, Benedetti PP, et Mancuso S: Antiproliferative activity of colchicine analogues on MDR-positive and MDR-negative human cancer cell lines. *Anticancer Drug Des* 13:19-33,1998.
388. Kandouz M, Siromachkova M, Jacob D, Chretien MB, Therwath A, et Gompel A: Antagonism between estradiol and progestin on bcl-2 expression in breast-cancer cells. *Int J Cancer* 68:120-125,1996.
389. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, et Sledge GW Jr: Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormono-independant growth. *Mol Cell Biol* 17:3629-3629,1997.
390. Wang C-Y, Mayo MW, et Baldwin AS Jr. : TNF- and cancer therapy-induced apoptosis : Potentiation by inhibition of NF-kB. *Science* 274:784-787, 1996.
391. Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, et Soneshin GE : Inhibition of NF-kB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 15:4682-4690, 1996.
392. Bertrand F, Atfi A, Cadoret A, l'Allemain G, Robin H, Lascols O, Capeau J, et Cherqui G: A role for nuclear factor kappaB in the antiapoptotic function of insulin. *J Biol Chem* 273:2931-2938,1998.

393. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et Greenberg ME: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241,1997.
394. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, et Nunez G : Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689, 1997.
395. Songyang Z, Baltimore D, Cantley LC, Kaplan DR, et Franke TF: Interleukin-3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11345-11350,1997.
396. Hausler P, Pappoff G, Eramo A, Reif K, Cantrell DA, et Ruberti G : Protection of CD-95-mediated apoptosis by activation of phosphatidylinositide 3-kinase and protein kinase and protein kinase B. *Eur J Immunol* 28:57-69, 1998.
397. Berra E, Diaz-Meco MT, et Moscat J : The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 273:10792-10797, 1998.
398. Hsu SY, Kaipia A, Zhu L, et Hsuch AJ : Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and p11. *Mol Endocrinol* 11:1858-1867, 1997.
399. Schmitt E, Sane AT, Steyeart A, Cimoli G, et Bertrand R : The Bcl-xL and Bax-alpha control points: Modulation of apoptosis induced by cancer chemotherapy and relation to TPCK-sensitive protease and caspase activation. *Cell Biol* 75:301-314, 1997.
400. Kharbanda S, Pandey P, Schoeheid L, Israels S, Rocinske R, Yoshida K, Barthi A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, et Kufe D : Role for bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6939-6942, 1997.
401. Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M, Marchetti P, Macho A, Kofler R, et Kroemer G : Bcl-2 and Bcl-xL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 57:62-67, 1997.
402. Hellman K, Phillips RH, et Goold M : High dose dexamethasone and base brain irradiation for hormone refractory metastatic carcinoma of the prostate. *Clin Exp Metastasis* 11 :227-229,1993.
403. Storlie JA, Buckner JC, Wiseman GA, Busch PA, Hartmann LC, et Richardson RL : Prostate specific antigen levels and clinical response to low dose dexamethasone for hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *Cancer* 76 :96-100,1995.
404. Taylor CW, Dalton WS, Mosley K, Dorr RT, et Salmon SE : Combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, adriamycin, and dexamethasone (CVAD) plus oral quinine and verapamil in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 42 :7-14,1997.

405. Hwa V, Oh Y, et Rosenfeld RG : Insulin-like growth factor binding protein-3 and -5 are regulated by transforming growth factor-beta and retinoic acid in the human prostate adenocarcinoma, cell line PC-3. *Endocrine* 6:235-242, 1997.
406. Lamm ML, Long DD, Goodwin SM, et Lee C : Transforming growth factor-beta 1 inhibits membrane association of protein kinase C alpha in a human prostate cancer cell line, PC-3. *Endocrinology* 138:4657-4664, 1997.
407. Gill ZP, Perks CM, Newcomb PV, et Holly JM : Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3) predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGF-dependent manner. *J Biol Chem* 272:12181-12188, 1997.
408. Reiss M : Transforming growth factor-b and cancer : A love-hate relationship? :447-457, 1997.
409. Perry KT, Anthony CT, et Steiner MS : Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in normal and malignant human prostate. *Prostate* 33:133-140, 1997.
410. Wolf JM, Fandel T, Borchers H, Brehmer B Jr, et Jakse G : Transforming growth factor-beta1 serum concentration in patients with prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia. *Br J Urol* 81:403-405, 1998.
411. Gerdes MJ, Larsen M, McBride L, Dang TD, LU B, et Rowley DR : Localization of transforming growth factor-beta1 and type II receptor in developping normal human prostate and carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem* 46:379-388, 1998.
412. Piek E, Franzen P, Heldin CH, et ten Dijke P : Characterization of a 60-KDa cell surface-associated transforming growth factor-beta binding protein that can interfere with transforming growth factor-beta receptor binding. *J Cell Physiol* 173:447-459, 1997.
413. Borsellino N, Belldegrun A, et Bonavida B: Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* 55: 4633-4639, 1995.
414. Lipton A : Bisphosphonates and breast carcinoma. *Cancer* 80(suppl):1674-1679, 1997.
415. Fleisch H : Bisphosphonates : Mechanismes of action. *Endocr Rev* 19:80-100, 1998.
416. Guise TA, et Mundy GR : Cancer and bone. *Endocr Rev* 19:18-54, 1998.
417. Lamm GM, et Christofori G : Impairment of survival factor function potentiates chemotherapy-induced apoptosis in tumors cells. *Cancer Res* 58:801-807, 1998.
418. Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, Arnold L, Boman B, Cunningham A, DiOrio c, Doty J, Morin MJ, Moyer MP, et al. : Inducton of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 57:4838-4848, 1997.

419. Dahring TK, Lu GH, Hamby JM, Batley BL, Kraker AJ, et Pannek RL : Inhibition of growth factor-mediated tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle by PD 089828, a new synthetic protein kinase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 281:1446-1456, 1997.
420. Panek RL, Lu GH, Klutchko SR, Batley BL, Dahring TK, Hamby JM, Hallak H, Doherty AM, et Keiser JA : In vitro pharmacological characterization of PD 166285, a new nanomolar potent and broadly active protein kinase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1433-1444, 1997.
421. Oude Weernink PA, Verheul E, Kerkhof E, van Veelen CW, Rijsken G : Inhibitors of protein tyrosine phosphorylation reduced the proliferation of two human glioma cell lines. *Neurosurgery*, 38:108-113, 1997.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
 1653 East Main Street
 Rochester, NY 14609 USA
 Phone: 716/482-0300
 Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved