

UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Année 2009

N° d'ordre : 4389

THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET
TECHNOLOGIES**

Discipline : Biologie-Santé

**Localisation et fonction du récepteur adrénérgique α_{1A} au sein de cavéoles
des cellules cancéreuses prostatiques humaines**

Thèse dirigée par le Docteur Christian SLOMIANNY

présentée et soutenue publiquement par

Maria KATSOGIANNOU

le 26 juin 2009

devant le jury composé de :

Président :	Pr. X. Le Bourhis, Professeur d'Université, Lille
Rapporteurs :	Dr. C. Vandier, Maître de Conférence, Tours Dr. J. Céraline, Maître de Conférence-Praticien Hospitalier, Strasbourg
Examineurs :	Pr. M. Roudbaraki, Professeur d'Université, Lille Dr. C. Lamaze, Directeur de Recherche INSERM, Paris Dr. C. Slomianny, Chargé de Recherche INSERM, Lille

Thèse réalisée au sein du Laboratoire INSERM U800
Villeneuve d'Ascq – Lille

**Localisation et fonction du récepteur adrénérgique α_{1A} au sein de cavéoles
des cellules cancéreuses prostatiques humaines**

Le cancer de la prostate est un réel problème de santé publique, essentiellement dû à une rechute des patients par échappement hormonal après traitement. Lors de sa progression, le cancer de la prostate, initialement androgéno-dépendant, évolue vers un état androgéno-indépendant supposant que des facteurs autres que les androgènes régulent la croissance et la survie des cellules cancéreuses.

Il existe des évidences de l'implication des neurotransmetteurs et leurs récepteurs couplés aux protéines G dans le cancer de la prostate. De plus, la cavéoline-1, constituant majeur des cavéoles membranaires, a été associée à la progression maligne du cancer de la prostate. La localisation privilégiée des récepteurs couplés aux protéines G au sein des cavéoles favoriserait la transmission des signaux aboutissant à l'échappement hormonal des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes.

Je me suis alors intéressée à la localisation et au rôle du récepteur adrénérgique α_{1A} dans les cellules prostatiques androgéno-indépendantes DU145. J'ai tenté de mettre en évidence l'implication des cavéoles dans une fonction de survie et/ou de croissance du récepteur. Nos résultats démontrent que le récepteur adrénérgique α_{1A} peut être associé à la cavéoline-1, au sein de cavéoles dans les cellules androgéno-indépendantes. Nous avons aussi mis en évidence que la stimulation du récepteur participe à la protection de ces cellules vis-à-vis de stimuli apoptotiques et ce *via* les cavéoles. Enfin, le profil d'expression du récepteur α_{1A} et de la cavéoline-1 suggère qu'il y ait une corrélation positive avec l'état pathologique de la prostate.

Mots clés : rafts lipidiques, cavéoles, cavéoline-1, récepteur adrénérgique α_{1A} , cancer de la prostate

**Localisation and function of the α_{1A} -adrenoceptor in caveolae
of human prostate cancer cells**

Prostate cancer has become a real public health issue, mainly due to patients' relapse by hormone-refractory disease after treatment. During its progression, initially androgen-dependent prostate cancer evolves in an androgen-independent state supposing that factors others than androgens regulate growth and survival of cancer cells.

There is growing evidence concerning the involvement of neurotransmitters and their G-protein coupled receptors in prostate cancer. Moreover, overexpression of a major caveolae constituent, caveolin-1 has been associated with aggressive prostate cancer. Privileged localisation of G-protein coupled receptors in caveolae could enhance signalling pathways leading to hormone-refractory mechanisms in androgen-independent prostate cancer cells.

I was therefore interested in determining the localisation and functional role of the α_{1A} -adrenoceptor in the DU145 androgen-independent prostate cells. I attempted to demonstrate the involvement of caveolae in a growth/survival function of this receptor. Our results showed that the α_{1A} -adrenoceptor can be associated with caveolin-1 in caveolae of these androgen-independent cells. We also demonstrated that α_{1A} -adrenoceptor stimulation mediated through caveolae contributes to the protection of these cells from apoptotic stimuli. Finally, the expression of α_{1A} -adrenoceptor and caveolin-1 seems to be positively correlated with prostate pathological state.

Key words: lipid rafts, caveolae, caveolin-1, α_{1A} -adrenoceptor, prostate cancer

A ma famille et à Florian,

"I haven't failed, I've found 10 000 ways that don't work"

Thomas Alva Edison (1847-1931)

"I'm not afraid of storms for I'm learning to sail my ship"

Eschyle (525-456 av. J.-C)

« Κάθε φορά που δεν έβρισκε εξόδους για τα όνειρα του, μια απόκοσμη φωνή μέσα του τον παρότρυνε ακατάλυπτα: "Τι κάθεσαι λοιπόν; Άντε, φύγε...Ναί, έτσι μόνος...σαν μονήρης αθλητής που γυμνάζεται ανάμεσα γης και ουρανού, πασχίζοντας να ακαλύψει μια νέα άσκηση για να του δώσει έμπνευση και πάθος για δημιουργία..."».

« Chaque fois qu'il ne trouvait pas d'issue pour ses rêves, une voix lointaine en lui le motivait sans cesse : « Qu'est-ce que tu fais assis là ? Vas-y, pars...oui, tout seul...comme un athlète qui s'entraîne seul entre la terre et le ciel, se forçant à découvrir un nouvel exercice qui lui donnera de l'inspiration et de la passion pour créer... »».

Nikos Tsingos (Αρχάγγελοι του ενστίγκτου, Archanges de l'instinct)

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture critique de ce manuscrit et pour leur présence lors de ma soutenance :

Ma reconnaissance sincère s'adresse aux Docteurs Christophe Vandier et Jocelyn Céraline qui ont bien voulu être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'aux Professeurs Morad Roudbaraki et Xuefen Le Bourhis qui ont gentiment accepté de l'examiner.

Je suis profondément reconnaissante envers le Docteur Christophe Lamaze d'avoir examiné ce manuscrit et surtout de sa confiance, ses conseils précieux et son aide inestimable pour l'aboutissement de ce travail.

Je remercie le Professeur Natalia Prevarskaya de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et le Docteur Christian Slomianny de m'avoir initiée dans la recherche.

Ensuite, je tiens à remercier les personnes extérieures au laboratoire sans qui certains aspects des travaux n'auraient pas été abordés :

Anne Athias (Lipidomique-Institut Fédératif de Recherche (IFR) 100, Dijon) pour sa disponibilité et son excellente collaboration pour les dosages lipidiques.

Nathalie Jouy (IFR 114, Lille) pour son aide, son optimisme et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter à chacun de mes déplacements pour les expériences de cycle cellulaire.

De plus, je tiens à présenter mes remerciements les plus sincères (même si des fois un simple merci ne suffit pas) aux membres du laboratoire qui m'ont apporté leur aide, leurs conseils et leurs encouragements quotidiens : Pascal, Florian, Charbel, Etienne, Michèle, Philippe, Morad, Thierry, Gabriel, Alex. Je suis contente et fière d'avoir fait partie de la AT ! Enfin, je suis particulièrement reconnaissante envers le Dr. Jean-Claude Michalski et envers Jean-Jacques Hauser de m'avoir soutenue et d'avoir toujours été à mon écoute.

Tables des matières

Glossaire et abréviations	p17
Introduction	p21
<u>I) La prostate et ses pathologies</u>	p23
I.1) Anatomie	p23
I.2) Histologie	p25
I.2.1) Architecture de l'épithélium glandulaire	p25
I.2.2) Stroma	p26
I.2.3) Innervation prostatique	p27
I.3) Rôles physiologiques et régulation hormonale de la prostate	p28
I.3.1) Rôle sécrétoire	p28
I.3.2) Rôle mécanique	p28
I.3.3) La régulation hormonale de la prostate	p29
I.4) Les pathologies de la prostate	p30
I.4.1) La prostatite : infection aiguë ou chronique de la prostate	p30
I.4.2) L'adénome ou hyperplasie bénigne de la prostate	p31
I.4.3) Le cancer de la prostate	p32
I.4.4) Système d'évaluation du degré de cancérisation de la prostate	p33
I.5) Traitements et échappement hormonal	p34
I.5.1) Les traitements	p34
I.5.2) L'échappement hormonal	p35

I.6) Régulation de la croissance physiopathologique de la prostate : le double rôle du calcium	p37
I.6.1) Vue d'ensemble de la signalisation calcique	p37
I.6.2) La prolifération cellulaire	p38
I.6.3) Le stress réticulaire et la mort cellulaire programmée	p39
<u>II) Les microdomaines lipidiques membranaires au sein de l'organisation de la membrane plasmique</u>	p41
II.1) Définitions et compositions des microdomaines lipidiques	p41
II.1.1) Définition structurale	p41
II.1.2) Définition biochimique	p42
II.1.3) Composition lipidique	p43
II.1.4) Composition protéique	p43
II.2) Les cavéoles	p44
II.2.1) Morphologie et composition moléculaire	p44
II.2.2) La famille des cavéolines	p45
II.2.3) Propriétés structurales de la cavéoline et biogenèse des cavéoles	p46
II.3) Importance fonctionnelle des cavéoles	p49
II.3.1) Trafic vésiculaire	p50
II.3.2) L'homéostasie du cholestérol	p51
II.3.3) La signalisation cellulaire	p52
II.4) La vie sans cavéoles : Implication des cavéolines dans les pathologies humaines	p54
II.4.1) Le rôle ambigu de la cav-1 dans le cancer	p54
II.4.2) La cav-1 et le cancer de la prostate	p56
<u>III) Les Récepteurs adrénergiques</u>	p59
III.1) Les récepteurs α_1 -adrénergiques : clonage, épissage alternatif et structure	p60

III.1.1) Classification moléculaire des α_1 -AR	p60
III.1.2) Régulation génique du α_{1A} -AR	p60
III.1.3) Structure des α_{1A} -AR	p60
III.1.4) Régulation fonctionnelle des α_1 -AR	p61
III.1.5) α_1 -AR : les aspects cliniques	p62
III.2) Les différentes voies de signalisation et fonctions liées aux α_1 -AR	p62
III.2.1) La voie calcique	p62
III.2.2) Les voies de croissance cellulaire	p63
III.3) Récepteurs adrénérgiques et prostate humaine	p64
III.3.1) Récepteurs β -adrénérgiques	p65
III.3.2) α_{1A} -AR, hyperplasie et croissance de la prostate	p65
III.3.3) Quelle est la place du α_{1A} -AR dans le cancer de la prostate ?	p66
Problématique et Objectifs	p67
Matériels et Méthodes	p71
<u>I) Culture Cellulaire</u>	p73
I.1) Lignées cellulaires	p73
I.2) Conditions de culture et traitements	p73
<u>II) Transfections</u>	p74
II.1) Transfections transitoires par nucléofection	p75
II.2) Etablissement de lignées stables	p75
<u>III) Immunodétection</u>	p76
III.1) Extraction des protéines	p76
III.2) Western-blot	p77
III.3) Purification des DRM	p77
III.4) Dot-blot	p79

III.5) Immunofluorescence	p79
III.6) Biotinylation des protéines de surface	p80
<u>IV) Microscopie</u>	p81
IV.1) Microscopie confocale	p81
IV.2) Microscopie électronique à Transmission	p82
IV.2.1) Morphologie Ultrastructurale	p82
IV.2.2) Membranes arrachées	p83
IV.2.3) Immunolocalisation Ultrastructurale	p85
IV.3) Imagerie Calcique	p85
IV.3.1) La sonde Fura-2/AM	p85
IV.3.2) Caractéristiques spectrales du Fura-2/AM	p86
IV.3.3) Charge des cellules avec le Fura-2/AM	p87
IV.3.4) L'équipement optique	p87
<u>V) Mesure de la viabilité cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire</u>	p87
V.1) Test de viabilité	p87
V.2) Test d'apoptose : coloration au Hoechst	p88
V.3) Cycle Cellulaire	p88
<u>VI) Analyse des données</u>	p89
Résultats	p91
Résultats préalables	p93
Article	p101
Discussion et Perspectives	p145
Conclusion générale	p161
Publications et communications personnelles	p165
Bibliographie	p169

GLOSSAIRE ET ABREVIATIONS

α_{1A}-AR :	Alpha 1A récepteur adrénergique (adrénorécepteur)
5α-DHT :	5 α -Dihydrotestostérone
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ADP :	Adénosine diphosphate
AIF :	Apoptosis-induced factor
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adénosine Triphosphate
BCA :	Acide Bicinchoninique
Bcl-2 :	B-Cell Lymphoma-2
CaM :	Calmoduline
Cav-1 :	Cavéoline-1
C-MAD :	C-terminal attachment domain
C-ter :	Carboxy-terminal
CSD :	Caveolin scaffolding domain
CTB :	Sous-unité B de la Choléra Toxine
DAG :	Diacylglycérol
DHEA :	Déhydroépiandrostérone
DIG :	Detergent-insoluble glycosphingolipids
DRM :	Detergent Resistant Membranes
DTT :	Dithiothréitol
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGTA :	Ethylene Glycol Tetraacetic acid
ERK :	Extracellular-Activated Kinase
FITC :	Fluoresceine Isothiocyanate
GFP :	Green Fluorescent Protein
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique

GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
HBP :	Hyperplasie Bénigne de la Prostate
HBSS :	Hank's Balanced Salt Solution
HDL :	High density lipoprotein
hPCE :	Human prostate cancer epithelial cells
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IP3 :	Inositol trisphosphate
IP3R :	Récepteur IP3
kD :	Kilo Dalton
LH :	Luteinizing Hormone
LH-RH :	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LNCaP :	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LPC :	Lysophosphatidylcholine
MAPK :	Mitogen Activated Protein Kinase
MDR :	Multidrug resistance
NFAT :	Nuclear Factor of Activated T-cell
NGF :	Nerve Growth Factor
N-MAD :	N-terminal attachment domain
NSE :	Neuron-specific Enolase
N-ter :	Aminoterminal
PAP :	Prostatic acid phosphatase
Pb :	paire de bases
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PC-3 :	Human, Caucasian, prostate, adenocarcinoma, grade IV
PCNA :	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PHE :	Phényléphrine
PIP2 :	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA :	Protéine Kinase AMPc-dépendante
PKC :	Protéine Kinase C
PLA₂ :	Phospholipase A ₂
PLC :	Phospholipase C
PLD :	Phospholipase D

PMCA :	Plasma Membrane Calcium ATPase
PRA :	Prazosin
PSA :	Prostate Specific Antigen
RCPG :	Récepteur membranaire couplé aux petites protéines G
RE :	Réticulum Endoplasmique
RIPA :	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
ROC :	Receptor-Operated Channel
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR :	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
RYR :	Ryanodine Receptor
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE :	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERCA :	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase
shRNA :	Short hairpined RNA
siARN :	Small interfering RNA
SMOC :	Second-messenger-Operated Channel
SOC :	Store-Operated Channel
TG :	Thapsigargine
TGF-β :	Transforming Growth Factor β
TM :	Transmembranaire
TNM :	Tumour-lymph node-Metastasis
TNT :	Tris/NaCl/Tween-20
TRAIL :	Tumour necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRP :	Transient Receptor Potential
TRPC :	TRP Canonical
v-src :	Rous sarcoma virus

INTRODUCTION

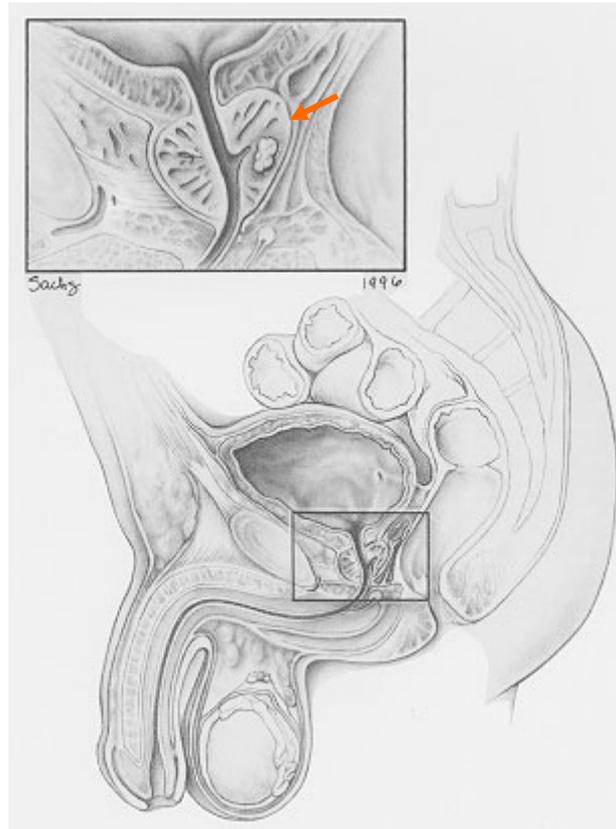
I. La prostate et ses pathologies

La prostate est un organe sexuel secondaire de l'appareil génital masculin, de nature glandulaire et fibromusculaire, localisé sous la vessie. Sa fonction physiologique est double : à la fois glandulaire exocrine et mécanique. La prostate est sujette au développement de trois pathologies : l'hyperplasie bénigne, le cancer et dans une moindre mesure la prostatite.

I.1) Anatomie

La prostate est une glande principalement exocrine multilobée entourant le canal éjaculateur et l'urètre (Figure 1A). Elle est recouverte d'une capsule fibreuse et a la forme d'une châtaigne, pesant environ 20 grammes chez le jeune adulte. Elle intervient dans le processus éjaculatoire en sécrétant environ 30% du liquide séminal et participe ainsi à la viabilité et à la motilité des spermatozoïdes [Paz *et al.*, 1977]. La prostate intervient également lors du processus mictionnel, principalement par l'intermédiaire des sphincters intraprostatiques situés autour de l'urètre. A la naissance et pendant l'enfance, le tissu prostatique consiste en un simple système de canaux dispersés dans un abondant stroma fibromusculaire. C'est à partir de la puberté et jusqu'à l'âge de 25 à 30 ans que la croissance conjuguée du stroma fibromusculaire et des glandes aboutit à l'aspect de la prostate adulte. Selon le modèle anatomique proposé par McNeal, la prostate se compose de 3 zones distinctes (Figure 1B) : **(1) une zone périphérique** qui constitue 70% du tissu glandulaire, comprenant les parties postérieure, latérale et apicale de l'organe et constituant le siège privilégié du développement des cancers prostatiques ; **(2) une zone centrale**, entourant l'urètre et représentant 25% de la glande prostatique, qui comprend la zone de connexion des vésicules séminales à la prostate ; **(3) une zone pré-prostatique ou zone de transition** constituée d'une fine couche de tissu glandulaire située de part et d'autre de l'urètre dans la partie centrale de la prostate. Cette zone ne représente que 5% de la glande et elle est sujette de façon privilégiée au développement des hyperplasies bénignes prostatiques et plus rarement des adénocarcinomes [McNeal, 1968].

A



B

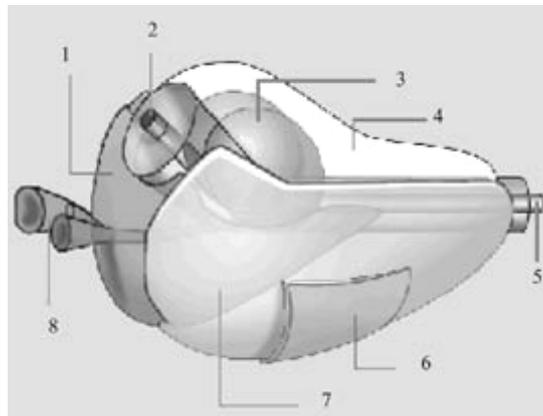


Figure 1. Anatomie de la prostate

- A. Représentation schématique d'une coupe de bassin chez l'homme ; indiquée par la flèche orange sur l'agrandissement : la prostate (source : www.ustoo.org)
- B. Schéma de la prostate (1) **zone centrale** ; (2,5) **urètre** ; (3) **zone de transition** ; (4) **zone fibromusculaire** ; (6) **capsule** ; (7) **zone périphérique** ; (8) **conduit déférent** (source : nld.by/e/current/stat13.htm)

I.2) Histologie

I.2.1) Architecture de l'épithélium glandulaire

Ce compartiment représente 60% du tissu prostatique. Il est constitué d'un système de canaux ramifiés terminés par des acini. Ces derniers comprennent des cellules épithéliales basales, luminales sécrétrices et neuroendocrines (Figure 2).

Les cellules épithéliales basales constituent le compartiment de réserve de l'épithélium prostatique, entre les cellules sécrétrices et la membrane basale [Robinson *et al.*, 1998 ; English *et al.*, 1987 ; Verhagen *et al.*, 1988]. Ce sont des cellules non différenciées sans activité sécrétrice. Les cellules basales ont un grand pouvoir prolifératif et un faible indice apoptotique. Elles donnent des cellules dites « de transition » qui répondent aux androgènes et qui génèrent à leur tour des cellules basales, des cellules luminales sécrétrices et très probablement des cellules neuroendocrines [Xue *et al.*, 1998]. Les techniques immunohistochimiques révèlent des marqueurs spécifiques dans les cellules basales, en particulier les cytokératines 5 et 14 [Okada *et al.*, 1992].

Les cellules luminales sécrétrices délimitent la lumière des acini et expriment les cytokératines 8 et 18 [Sherwood *et al.*, 1991]. Contenant de nombreux lysosomes, ces cellules présentent une activité importante de synthèse et de sécrétion des constituants du plasma séminal. Parmi ceux-ci sont retrouvés : l'antigène glycoprotéique spécifique de la prostate ou PSA (*Prostate Specific Antigen*), des phosphatases spécifiques (*Prostatic Acid Phosphatase* ou PAP) et d'autres enzymes, ainsi que des polyamines et des composés minéraux [Mann, 1963]. Le récepteur aux androgènes présent détermine leur survie, croissance et capacité sécrétrice [Arnold *et al.*, 2002].

Les cellules neuroendocrines (NE) sont présentes dans la prostate à la naissance mais disparaissent rapidement de la zone périphérique pour réapparaître à la puberté et voir leur nombre augmenter jusqu'à un niveau stable entre 25 et 54 ans [Cohen *et al.*, 1993 ; Battaglia *et al.*, 1994]. Les cellules NE prostatiques sont non-proliférantes [Huang *et al.*, 2006] et dépourvues du récepteur aux androgènes d'où leur *androgéno-indépendance* [Krijnen *et al.*, 1993]. Elles possèdent des prolongements cytoplasmiques apicaux qui s'étendent vers la lumière de l'acinus [Abrahamsson, 1996] et sont caractérisées par la présence de granules de sécrétion à coeur dense renfermant des substances semblables aux neurohormones : calcitonine (CT) [Chien *et al.*, 2001], neurotensine (NT) [Amorino *et al.*, 2007], VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*) mais aussi des monoamines (sérotonine ou 5-HT pour 5-hydroxytryptamine) [Amorino *et al.*, 2004 ; di Sant'Agnese, 1992 ; Rojas-Corona *et al.*,

1987]. De plus, elles possèdent les caractéristiques du système APUD (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*) spécifiques aux cellules NE [Di Sant'agnese, 1991 ; Pearse, 1969] et expriment des marqueurs neuroendocriniens couramment utilisés pour caractériser les cellules NE tels que la synaptophysine, la NSE (*Neuron Specific Enolase*) [Bang *et al.*, 1994 ; Schmechel *et al.*, 1980] et des protéines de type granine telles que la chromogranine A ou B [Karlsson, 2001 ; Schmid *et al.*, 1994]. Il est fortement suggéré qu'il existe une association entre des niveaux élevés de marqueurs comme la chromogranine A et la NSE dans les cellules NE ou dans le sang et le pronostic défavorable du cancer de la prostate, la progression tumorale et l'androgéno-indépendance [Abrahamsson, 1999].

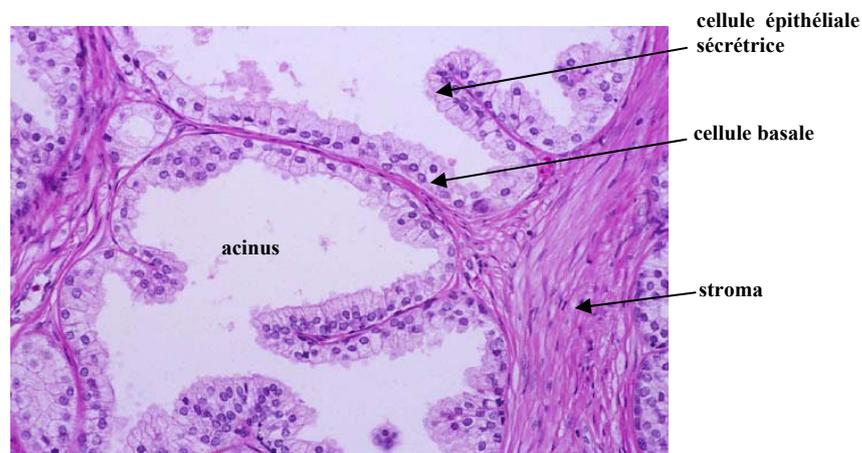


Figure 2. Architecture de l'épithélium et du stroma prostatique

Coupe histologique d'un acinus prostatique normal composé de l'épithélium et du stroma fibromusculaire (*d'après : pathology.mc.duke.edu/research/PTH225.html*).

I.2.2) Stroma

Il est principalement composé de fibroblastes mais également de cellules musculaires lisses (responsables, par leur contraction, de l'évacuation du liquide prostatique), de nerfs et vaisseaux sanguins [Farnsworth, 1999]. Outre leur rôle de soutien physique pour l'épithélium glandulaire, les cellules stromales contribuent aussi au microenvironnement endocrine et paracrine des cellules épithéliales adjacentes par la sécrétion de facteurs tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le FGFb (*Fibroblast Growth Factor basic*) [Marengo *et al.*, 1994] et d'hormones comme la prolactine [Untergasser *et al.*, 2000], la PTHrP (*ParaThyroid Hormone related-Protein*) [Blomme *et al.*, 1998] et l'adrénaline [Smith *et al.*, 2000] (pour revue, [Wong *et al.*, 2000]). Ces facteurs paracrines peuvent diffuser du compartiment stromal vers les cellules épithéliales régulant ainsi l'équilibre de leur croissance et leur état de

différenciation. Le « dialogue » entre ces deux compartiments est aussi important dans la prostate normale que dans la prostate cancéreuse. Lors de la cancérogenèse, un changement se produit dans la composition du stroma qui induit l'interruption du dialogue stroma-épithélium perturbant ainsi la régulation de la fonction et de la croissance des cellules épithéliales [Cunha *et al.*, 2003].

I.2.3) Innervation prostatique

Il est considéré que la croissance du tissu prostatique est principalement contrôlée par des régulations endocrines. L'abondance des récepteurs α -adrénergiques et muscariniques ainsi que la richesse en fibres nerveuses dans la majorité des acini des zones centrale et périphérique suggère que le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) pourrait jouer un rôle dans la maturation et les fonctions sécrétoires de la prostate [Higgins *et al.*, 1989]. D'ailleurs, la dénervation de la prostate induirait la perte de sa fonctionnalité et de son intégrité structurale [McVary *et al.*, 1998]. Les cellules musculaires lisses prostatiques sont riches en récepteurs α et β catécholaminergiques (système sympathique) impliqués respectivement dans la contraction et la relaxation musculaire, pouvant également jouer un rôle dans la croissance. Le réseau cholinergique du système parasympathique alimente l'épithélium ainsi que le stroma (Figure 3) ce qui suggère un rôle dans la modulation de la fonction sécrétoire ainsi que dans le tonus musculaire [Ventura *et al.*, 2002 ; Pennefather *et al.*, 2000].

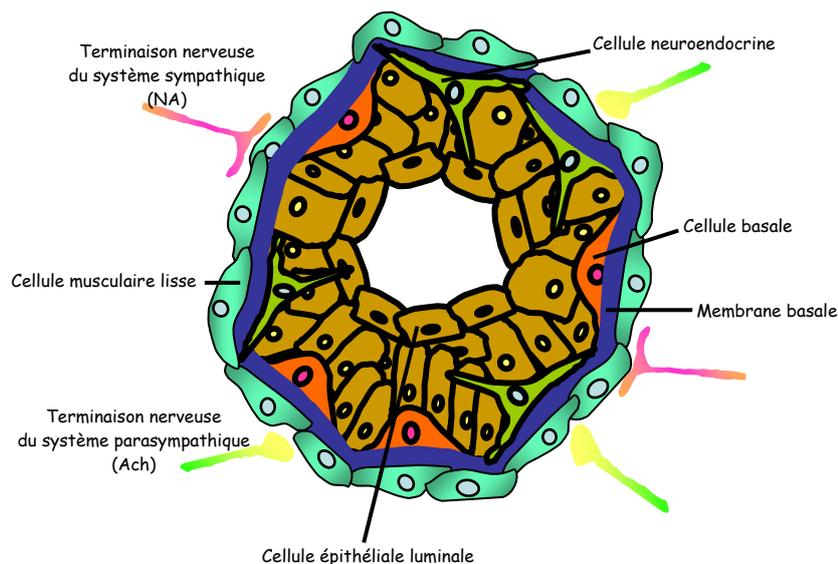


Figure 3. Innervation de l'épithélium prostatique

Représentation schématique d'un acinus prostatique composé des différents types cellulaires. Cet acinus est bordé par la membrane basale qui est elle-même entourée de cellules stromales musculaires lisses innervées par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. NA : noradrénaline. Ach : acétylcholine.

I.3) Rôles physiologiques et régulation hormonale de la prostate

La prostate joue un double rôle : à la fois en tant qu'acteur majeur de l'appareil génital masculin mais aussi du système urinaire, ce qui explique des symptômes sur ces deux plans lorsqu'elle se dérègle.

I.3.1) Rôle sécrétoire

La fonction sécrétoire de la prostate est dépendante de la stimulation directe des cellules épithéliales prostatiques par les androgènes. Les produits de sécrétion prostatique composent une grande partie du liquide séminal. Légèrement alcalin, ce liquide comprend des ions (citrate principalement, magnésium, zinc jouant probablement un rôle anti-infectieux, sodium et chlore), du cholestérol, des phospholipides, des enzymes (phosphatases acides, protéases, α -glucosidase neutre, fibrinolysine et fibrinogénase), des amines biogènes (spermine et spermidine) ou encore l'antigène glycoprotéique spécifique de la prostate (PSA) [Arver *et al.*, 1982 ; Elzanaty *et al.*, 2002 ; Mann, 1963]. La sécrétion du liquide spermatique s'intensifie en période pré-éjaculatoire pour constituer une partie du plasma séminal représentant le milieu optimal pour la survie et la motilité des spermatozoïdes. Certains de ces produits, dont le PSA, la spermine ou encore le citrate sont des produits de sécrétion considérés comme des marqueurs du cancer de la prostate ou sont susceptibles de le devenir [Serkova *et al.*, 2008].

I.3.2) Rôle mécanique

L'urètre, dans sa portion prostatique, est entouré de deux sphincters : un sphincter supérieur lisse et un sphincter inférieur strié. Ces sphincters confèrent à la prostate son double rôle mécanique dans les processus mictionnels et éjaculatoires. La continence urinaire et le stockage des urines sont assurés par cet appareil sphinctérien, en association avec la vessie [McNeal, 1972]. Le sphincter lisse assure la continence involontaire permettant le remplissage du réservoir vésical *via* le système sympathique. L'évacuation des urines s'effectue grâce à l'association du sphincter lisse *via* le système parasympathique et du sphincter strié qui assure la continence volontaire. De plus, les sphincters et les fibres musculaires lisses de la prostate interviennent dans les fonctions de reproduction lors de l'éjaculation [Hermabessiere *et al.*, 1999]. Pendant la phase d'émission, les fibres musculaires lisses du stroma de la prostate, des vésicules séminales, des canaux déférents et éjaculateurs se contractent et expulsent le sperme dans la partie prostatique de l'urètre. Le sphincter lisse

reste contracté pour empêcher l'éjaculation rétrograde dans la vessie alors que le sphincter strié se relâche.

I.3.3) La régulation hormonale de la prostate

Il est fermement établi que les androgènes régulent la croissance normale et les activités fonctionnelles de la prostate humaine [Huggins *et al.*, 2002 ; Feldman *et al.*, 2001]. Le principal androgène circulant est la testostérone. Synthétisée par les cellules de Leydig des testicules puis sécrétée dans le sang, la testostérone circule liée ou non à la globuline ou SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*), sa protéine de transport, jusqu'à atteindre les organes cibles comme la prostate. La sécrétion de testostérone est régulée par la LH (*Luteinizing Hormone*) libérée au niveau de l'hypophyse après stimulation par la LHRH (*Luteinizing Hormone Releasing Hormone*) libérée par l'hypothalamus (Figure 4). Arrivée dans les cellules épithéliales intermédiaires, épithéliales luminales matures ou musculaires lisses, la testostérone est réduite par la 5 α -réductase en sa forme active : la 5 α -dihydrotestostérone (5 α -DHT) qui peut alors exercer son action sur les protéines cibles. Environ 10% de l'apport en androgènes de la prostate provient des glandes surrénales, sous forme de *déhydroépiandrostérone* (DHEA) et constituant une deuxième voie possible de production de DHT (Figure 4).

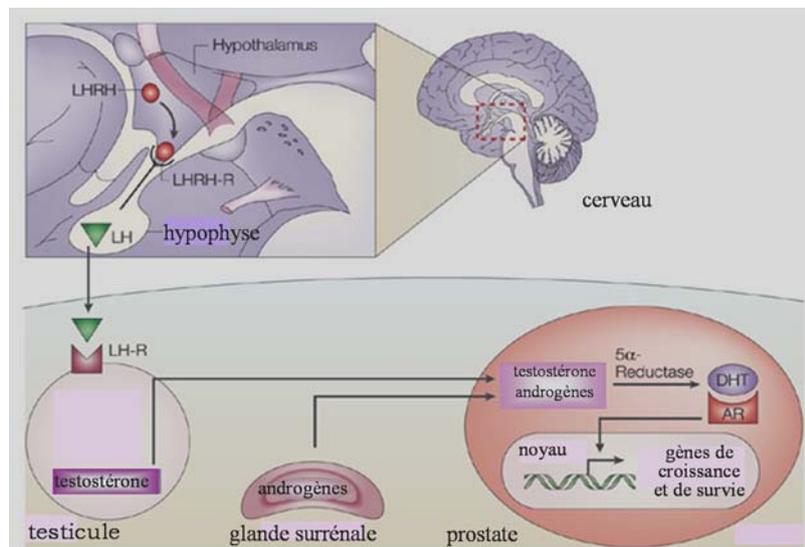


Figure 4. La régulation hormonale de la prostate

Représentation schématique de l'axe hypothalamus-hypophyse-testicule et de la régulation hormonale de la prostate par les androgènes surrénaliens et la testostérone (*d'après : www.nature.com*)

Au niveau cellulaire, les androgènes agissent par le biais du récepteur aux androgènes qui régule l'expression de certains gènes et contrôlent la différenciation des cellules luminales intermédiaires en cellules épithéliales luminales matures [Berger *et al.*, 2004]. De plus, ils limitent la prolifération des cellules saines mais stimulent celle des cellules cancéreuses [Nantermet *et al.*, 2004 ; Zegarra-Moro *et al.*, 2002]. En outre, les androgènes contrôlent l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) [Amirghofran *et al.*, 2004 ; Kyprianou *et al.*, 1988], de la PAP et de la PSA [Israeli *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 2004]. Ces effets génomiques sont donc régulés par le récepteur aux androgènes qui joue un rôle essentiel dans le génotype et le phénotype des cellules androgéno-dépendantes.

La régulation de l'expression génique implique la translocation du récepteur aux androgènes dans le noyau, un processus pouvant durer 30 à 60 minutes [Cato *et al.*, 2002]. D'autres fonctions de régulation par les androgènes se manifestent au bout de quelques secondes à quelques minutes. Ces périodes étant trop courtes pour être dues à des effets génomiques, elles sont définies comme des effets non-génomiques [Orsini, 1982]. Ces effets sont très nombreux : impliquant entre autres l'activation de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), de l'Adenylate Cyclase (AC), de la Protéine Kinase C (PKC) et des protéines G [Cato *et al.*, 2002]. Ces actions rapides peuvent se transmettre soit par l'intermédiaire des récepteurs aux androgènes eux-mêmes soit par d'autres récepteurs aux stéroïdes. A ce propos, l'effet non-génomique le plus fréquemment reporté consiste en l'activation de récepteurs membranaires de type Récepteur Couplé aux Protéines G (RCPG) [Estrada *et al.*, 2006 ; Cato *et al.*, 2002]. Plusieurs données suggèrent que les signaux non-génomiques dans la prostate humaine pourraient être initiés au sein de microdomaines lipidiques membranaires ou « rafts » lipidiques [Freeman *et al.*, 2005].

I.4) Les pathologies de la prostate

Les troubles de la prostate apparaissent pour la plupart avec l'âge. Parmi les plus fréquents sont : la prostatite, l'adénome et l'adénocarcinome.

I.4.1) La prostatite : infection aiguë ou chronique de la prostate

Les prostatites sont des infections aiguës ou chroniques d'origine bactérienne [Bruyere *et al.*, 2008 ; Stern *et al.*, 2000]. Elles sont localisées le plus souvent dans la zone périphérique de la prostate. Elles ont une prévalence de 9% dans l'ensemble de la population adulte masculine et concernent majoritairement le sujet jeune. Ces inflammations sont la

conséquence d'une infection urinaire ou parfois d'une contamination sexuelle. Elles sont accompagnées de fièvre, de signes d'obstruction urinaire et de douleurs périnéales. La prostatite aiguë peut se compliquer essentiellement d'une septicémie par passage du germe dans la circulation sanguine. D'autres complications classiques sont la rétention d'urine, le développement d'un abcès de la prostate ou encore l'infection testiculaire. La prostatite chronique est parfois consécutive à plusieurs poussées de prostatite aiguë mais peut s'installer progressivement sans cause retrouvée.

I.4.2) L'adénome ou hyperplasie bénigne de la prostate

Cette pathologie concerne 30% des hommes de plus de 50 ans [Partin *et al.*, 1991]. La prostate a tendance à prendre du volume quand l'homme approche la quarantaine et continue à grossir avec l'âge. Cette croissance se nomme *hyperplasie bénigne de la prostate* (HBP) (Figure 5) [Lee *et al.*, 2004]. Sa cause est méconnue mais il se peut que ce phénomène soit lié aux changements hormonaux associés au vieillissement (pour revue, [Nandeesh, 2008]). Elle provoque, le plus souvent, l'apparition d'un tissu fibreux et glandulaire dans la zone transitionnelle de la prostate, entraînant progressivement le grossissement et/ou la rigidité de la glande. Cette transformation est accompagnée de symptômes obstructifs caractérisés par une dysurie (difficulté d'uriner) et des symptômes irritatifs. La symptomatologie fonctionnelle se stabilise souvent soit spontanément soit sous traitement médical. Dans certains cas, des complications peuvent apparaître telles que des infections urinaires, une hématurie ou la formation de calculs vésicaux.

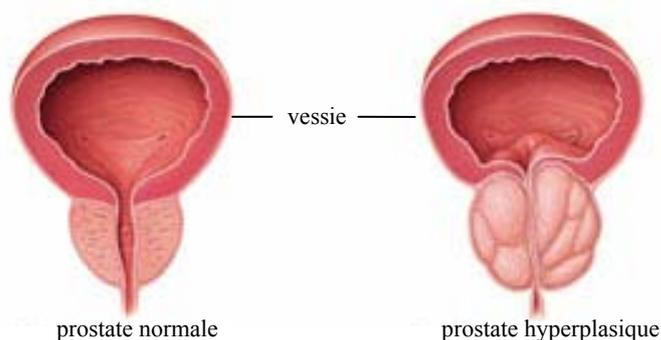


Figure 5. L'hyperplasie bénigne de la prostate

La prostate grossit et comprime l'urètre tout en faisant pression sur la vessie. Cela gêne la miction et engendre un besoin fréquent d'uriner (*d'après : www.roboticoncology-fr.com*).

I.4.3) Le cancer de la prostate

Avec 50 000 nouveaux cas diagnostiqués et 10 000 décès répertoriés chaque année en France, le cancer de la prostate représente la deuxième cause de mortalité par cancer [Greenlee *et al.*, 2000]. L'augmentation de cas de cancer et de la mortalité due à cette maladie reflète l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays développés. Le carcinome de la prostate survient chez l'homme de plus de 50 ans et son incidence augmente avec l'âge. La plupart des cancers se développent surtout dans la zone périphérique postérieure de la prostate, environ 15% dans la zone transitionnelle et 5% dans la zone centrale. Le cancer de la prostate se développe souvent très lentement et reste au début localisé. Lorsque le cancer évolue, il peut s'étendre en dehors de la prostate et envahir directement les tissus et organes situés à proximité ou à distance (os, ganglions). Les facteurs de risque du développement de ce cancer sont l'âge, les antécédents familiaux, les régimes alimentaires riches en graisses et l'état physique général [Richard, 1994 ; Fournier *et al.*, 2004 ; Clinton *et al.*, 1998]. Ainsi, 95% des cas surviennent entre 57 et 88 ans avec un risque 2 à 5 fois plus important si le père ou un des frères est atteint. De plus, l'incidence du cancer de la prostate varie d'un continent à l'autre et d'une population à l'autre. Il est par exemple beaucoup plus fréquent dans les populations noires américaines que dans les populations caucasiennes et asiatiques. Il est probable que ces différences portent sur le mode de vie et plus spécifiquement sur l'alimentation. Un régime riche en graisses animales et pauvre en fibres constitue un facteur de risque important [Giovannucci *et al.*, 1993]. D'ailleurs, il a été démontré que les niveaux de cholestérol sont impliqués dans la croissance tumorale des cellules cancéreuses prostatiques dont les mécanismes de survie s'effectuent *via* des altérations de la composition en lipides des zones spécialisées de la membrane plasmique connues sous le nom de microdomaines lipidiques [Zhuang *et al.*, 2005 ; Oh *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2006].

Le cancer de la prostate, adénocarcinome sous l'influence des hormones sexuelles mâles, reste asymptomatique pendant longtemps. Lorsque les premiers symptômes apparaissent, il est généralement de stade avancé et peut s'être déjà étendu aux organes adjacents. Parmi ces symptômes sont retrouvés les troubles de miction et les douleurs osseuses.

I.4.4) Systèmes d'évaluation du degré de cancérisation de la prostate

a) Le score de Gleason

Cette première méthode d'évaluation est basée sur le degré de la perte architecturale du tissu glandulaire (forme, taille et différenciation). Les deux plus grandes zones de cancer

sont repérées dans les prélèvements et à chacune est attribué un grade de 1 à 5 (du moins au plus agressif). Les deux grades sont alors additionnés pour déterminer le **score de Gleason** du patient.

b) Le système TNM (Tumor, Node, Metastasis)

Une autre classification très utilisée est le système TNM [Schroder *et al.*, 1992] qui décrit l'extension de la tumeur primitive (stades T1 à T4). Les différents stades T1 (a, b, c : pour décrire le cancer avec plus de précision) caractérisent de petites tumeurs impalpables et difficilement détectables par échographie. Les tumeurs de stade T2 sont plus étendues mais sont toujours confinées à la capsule épithéliale. Le stade T3 représente des tumeurs, détectables par palpation, ayant dépassé la barrière de la lame basale et se propageant dans la prostate et dans les vésicules séminales. Enfin, le dernier stade (T4) définit la propagation de la tumeur dans les organes avoisinants tels que la vessie ou plus lointains tels que le cerveau ou les os. A ces caractéristiques sont rajoutées l'absence ou la présence de ganglions avoisinants envahis (respectivement stade N0 ou N1) et l'absence ou la présence de métastases (respectivement stade M0 ou M1).

La classification TNM peut être combinée au score de Gleason pour donner le groupement des stades (ou stade global), exprimé en chiffres romains de I à IV (du moins au plus avancé) (Figure 6). Ainsi, un cancer de stade I, confiné à la prostate, est caractérisé par un faible score de Gleason (moins de 5% du tissu est cancéreux). Le cancer de stade II, toujours localisé à la prostate, est caractérisé par un score de Gleason intermédiaire ou élevé (plus de 5% du tissu est cancéreux). Le cancer de stade III s'est propagé à l'extérieur de la prostate aux organes à proximité (score de Gleason entre 2 et 10) et celui de stade IV (score de Gleason entre 2 et 10) est caractérisé par des métastases au niveau d'organes lointains.

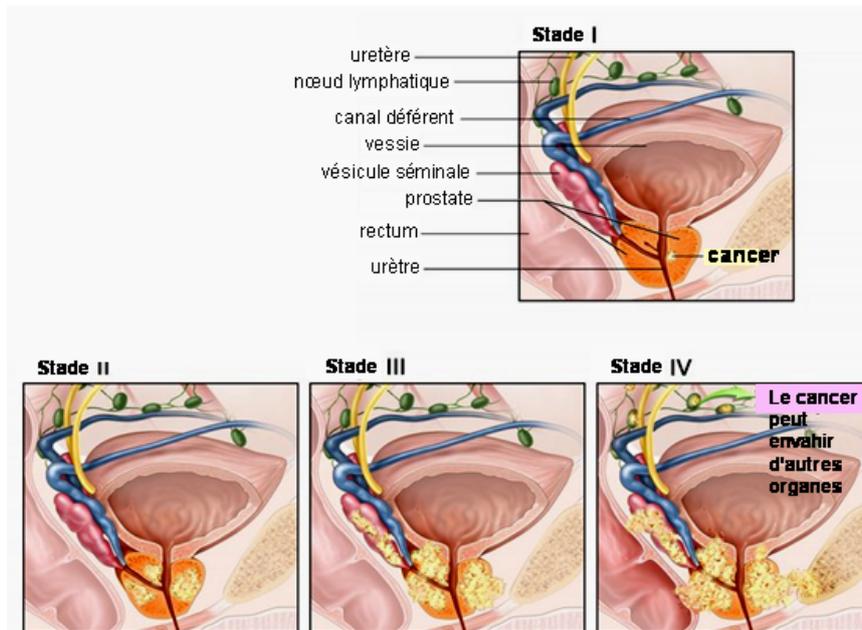


Figure 6. Les stades du cancer de la prostate

Le groupement des stades (ou stade global), exprimé de I à IV, a pour but de déterminer le pronostic de survie ou de guérison. Aux stades I et II, le cancer est confiné à la prostate et ne s'est pas propagé aux ganglions lymphatiques ou à d'autres parties du corps. Au stade III, le cancer a commencé à se propager à l'extérieur de la prostate, à proximité, dans les vésicules séminales ou ganglions lymphatiques. Le cancer de stade IV se propage aux tissus ou aux ganglions lymphatiques dans la région pelvienne ou d'autres parties éloignées du corps (d'après : www.yourcancertoday.com).

I.5) Traitements et échappement hormonal

I.5.1) Les traitements

Les traitements de l'HBP et de l'adénocarcinome de la prostate dépendent de plusieurs facteurs dont les principaux sont : l'importance des symptômes et l'âge des patients, ainsi que de la localisation du cancer (présence ou non de métastases). Les choix thérapeutiques sont fonction de l'objectif en terme de survie globale et de qualité de vie, sans oublier la toxicité propre aux traitements. En cas d'hyperplasie, la résection endoscopique est utilisée dans 80% des cas. Cette technique consiste à introduire un résecteur dans l'urètre grâce auquel l'adénome est enlevé par « rabotage » de la partie obstruant le canal, tout en laissant en place la « capsule prostatique » constituée par la glande normale refoulée en périphérie par l'adénome. La prostatectomie radicale est une technique chirurgicale qui permet d'enlever la totalité de la prostate et qui est utilisée dans les traitements de l'hyperplasie et du cancer [Jewett *et al.*, 2003]. La radiothérapie externe est préconisée pour traiter les patients dont le

cancer s'est propagé trop largement dans la région pelvienne pour être retiré par chirurgie, mais qui ne présente pas d'évidence de propagation aux ganglions lymphatiques [Ash, 2005]. En cas de stade avancé, la radiothérapie peut aider à réduire les tumeurs et soulager la douleur. Si le cancer de la prostate a été diagnostiqué à un stade avancé ou s'il réapparaît après une thérapie localisée comme la chirurgie ou la radiothérapie, un traitement additionnel d'hormonothérapie est habituellement entrepris. Le but de l'hormonothérapie est de réduire les niveaux d'androgènes circulants en bloquant leur production ou leur action [Theodore, 2004], (pour revue [McLeod, 2003]). Ce blocage peut s'effectuer de différentes façons. L'administration de médicaments (anti-androgènes) bloquent le fonctionnement et empêchent l'action des androgènes au niveau des organes cibles en se liant à leurs récepteurs de façon compétitive (pour revue [Suzuki *et al.*, 2008]). Leur utilisation provoque la mort programmée (apoptose) des cellules androgéno-dépendantes dans la majorité des cancers de la prostate. L'hormonothérapie peut aussi consister à administrer des analogues de la LHRH provoquant une désensibilisation hypophysaire avec diminution de la production de gonadotrophines, FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) et LH, aboutissant à un effondrement du taux d'hormones sexuelles circulantes [Schally, 2005 ; Tolis *et al.*, 1982] comme le ferait une castration chirurgicale (ou orchidectomie). Enfin, les inhibiteurs de la 5- α réductase empêchent la transformation de la testostérone en DHT au niveau prostatique [Andriole *et al.*, 2004 ; Thorpe *et al.*, 2007]. Leur utilisation permet de réduire le volume de la prostate, d'améliorer le débit mictionnel et de diminuer les symptômes. Dans le cas de l'hyperplasie, le traitement consiste en l'utilisation d'inhibiteurs de la 5- α réductase et d'antagonistes α -adrénergiques [Hedlund *et al.*, 1999]. Ces α -bloquants inhibent l'effet des catécholamines sur les récepteurs α_1 -adrénergiques et entraînent la relaxation de la musculature lisse au niveau de la prostate et du col de la vessie [Price *et al.*, 1999].

I.5.2) L'échappement hormonal

Les cancers précoces sont à l'origine hormono-dépendants : la croissance et la survie des cellules cancéreuses dépendent des androgènes. L'utilisation de composés ayant la particularité de bloquer la synthèse de testostérone permet dans un premier temps une stabilisation de la croissance tumorale voire une régression. Cependant, le cancer évolue irrémédiablement vers une hormono-résistance appelée aussi échappement hormonal. Ainsi, certaines cellules cancéreuses deviennent hormono-sensibles, proliférant en présence d'androgènes mais ne mourant pas lors de l'ablation des androgènes. Puis, elles acquièrent un caractère hormono-indépendant et continuent à croître en l'absence d'androgènes (pour revue,

[Arnold *et al.*, 2002]). A partir de ces cellules, se développe une tumeur résistante à la privation hormonale et à la chimiothérapie. L'échappement hormonal peut être expliqué par des altérations génétiques, par exemple du récepteur aux androgènes, de l'oncoprotéine p53 ou de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [Ceraline *et al.*, 2004 ; Feldman *et al.*, 2001 ; Heidenberg *et al.*, 1995 ; Furuya *et al.*, 1996 ; Rothermund *et al.*, 2002], (pour revue, [Devlin *et al.*, 2008]). De plus, il est décrit qu'il s'accompagne souvent d'une évolution de la sécrétion paracrine vers la sécrétion autocrine. Ainsi, des facteurs de croissance tels que l'EGF et l'IGF-1 participent à la transformation maligne des cellules en stimulant le récepteur aux androgènes de manière ligand-indépendante [Fong *et al.*, 1992 ; Wong *et al.*, 2000]. L'échappement hormonal se caractérise également par une différenciation neuroendocrine en association avec un défaut d'apoptose des cellules cancéreuses ce qui constitue un mauvais pronostic clinique pour le patient [Cabrespine *et al.*, 2004].

a) Différenciation neuroendocrine

Comme il a été exposé précédemment, les cellules neuroendocrines sont des cellules régulatrices intra-épithéliales [Abrahamsson, 1999]. Elles ne possèdent pas de récepteur aux androgènes et sont donc androgéno-indépendantes pour leur croissance [Krijnen *et al.*, 1993]. Ceci pourrait expliquer en partie le phénomène d'échappement hormonal en association avec le défaut d'apoptose abordé ci-après. Plusieurs phénomènes pourraient être à l'origine de la différenciation neuroendocrine [Cabrespine *et al.*, 2004 ; Yuan *et al.*, 2007]. Les traitements anti-androgéniques ne feraient que sélectionner des cellules neuroendocrines androgéno-indépendantes aux dépens des cellules androgéno-dépendantes [Ismail *et al.*, 2002]. Les cellules neuroendocrines tumorales, présentant un dysfonctionnement de sécrétion (défaut ou hyper sécrétion) pourraient, par une stimulation paracrine anormale des cellules saines, les rendre ainsi tumorales. Il est également suggéré que l'acquisition des caractéristiques neuroendocrines s'effectue au cours de la progression tumorale. Ainsi, suite à une transformation maligne, une cellule épithéliale ou basale développerait des caractéristiques neuroendocrines et serait alors régulée par des mécanismes androgéno-indépendants [Yuan *et al.*, 2006].

b) Résistance à l'apoptose

La résistance à l'apoptose est une des caractéristiques les plus remarquables des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes [McDonnell *et al.*, 1992]. L'apoptose implique un réseau dynamique et complexe de nombreux gènes et protéines dont la moindre altération

peut conduire à son dysfonctionnement. Les cellules cancéreuses acquièrent une capacité accrue de survie face à des stimuli apoptotiques [Hanahan *et al.*, 2000 ; Green *et al.*, 2002], généralement liée à des mutations ou des expressions anormales de certains gènes spécifiques précédemment mentionnés (cf. §I.5.2). De plus, la capacité de ces cellules à s'adapter à leur microenvironnement extracellulaire est due à des altérations dans les interactions épithélium/stroma, les réponses au stress, les voies des facteurs de croissance et les réponses inflammatoires [McKenzie *et al.*, 2006]. Ces modifications permettent au plus hostile des microenvironnements de promouvoir plutôt que d'inhiber la survie des cellules cancéreuses et de favoriser ainsi l'apparition de phénotypes agressifs. Actuellement, une grande majorité d'agents thérapeutiques pour le traitement du cancer prostatique androgéno-indépendant cible les voies intrinsèques pour induire l'apoptose de ces cellules typiquement résistantes.

Les recherches actuelles se focalisent pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires, extrêmement complexes et étroitement liés entre eux, qui interviennent dans l'échappement hormonal. Plusieurs études récentes, dont celles menées par notre laboratoire, indiquent incontestablement que les altérations de l'homéostasie calcique jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose et de la prolifération, deux processus très fortement impliqués dans l'oncogenèse prostatique [Munaron *et al.*, 2004 ; Capiod *et al.*, 2007 ; Vanoverberghe *et al.*, 2004 ; Kyprianou *et al.*, 1996 ; Zhou *et al.*, 2004]. En effet, la prise en charge du calcium (Ca^{2+}) par la cellule cancéreuse est modifiée et adaptée à ses nouvelles caractéristiques de prolifération soutenue et de survie accrue par rapport aux cellules saines [Roderick *et al.*, 2008 ; Prevarskaya *et al.*, 2004]. Afin de mieux comprendre comment un seul et même ion peut réguler des fonctions cellulaires opposées telles que la prolifération et l'apoptose, il faut définir les notions essentielles sur le calcium et l'homéostasie calcique cellulaire.

I.6) Régulation de la croissance physiopathologique de la prostate : le double rôle du calcium

I.6.1) Vue d'ensemble de la signalisation calcique

L'évolution a choisi les ions Ca^{2+} en tant qu'éléments primordiaux de la signalisation cellulaire. Les milliers de composants cellulaires se liant au Ca^{2+} permettent la formation de systèmes uniques de signalisation calcique [Berridge *et al.*, 2003]. Caractérisés par des propriétés spatiotemporelles distinctes, ces différents signaux calciques affectent tous les

aspects de la vie et de la mort cellulaire (Figure 7). Le réglage flexible mais très minutieux des paramètres de cinétique, d'amplitude et de localisation de ces signaux calciques permettent leur décodage précis par la cellule en des fonctions cellulaires différentes, basculant ainsi vers la prolifération ou l'apoptose en passant par l'exocytose et la contraction selon le type cellulaire [Berridge *et al.*, 1998].

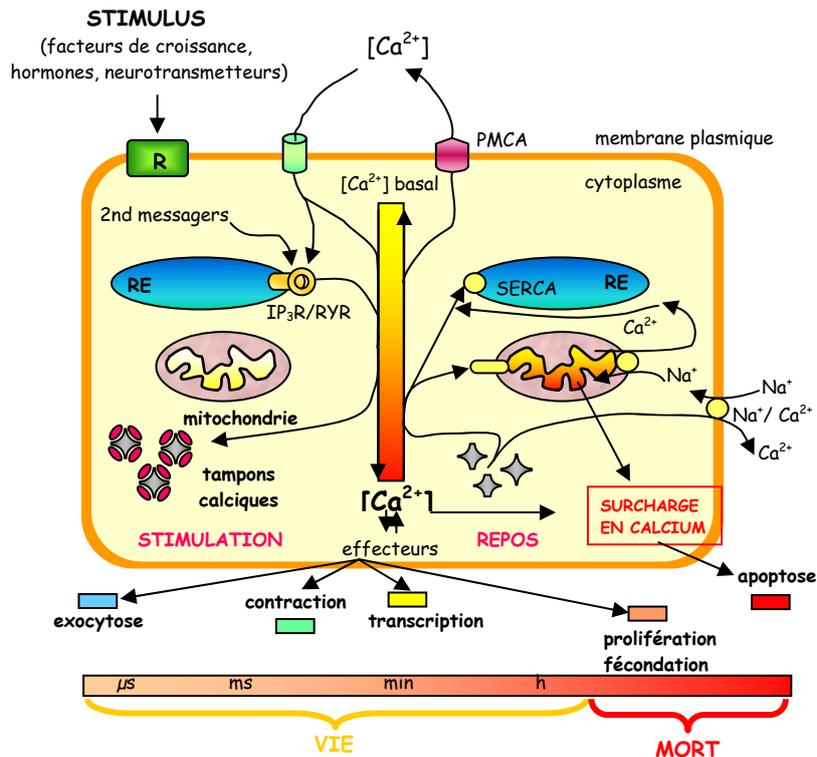


Figure 7. La dynamique de l'équilibre des signaux calciques

Représentation schématique des éléments cellulaires participant à la signalisation calcique (PMCA, pompe calcique membranaire ; canaux membranaires ; SERCA, pompe calcique ATPase réticulaire ; échangeurs ; chélateurs calciques). Les effets physiologiques s'effectuent en fonction des propriétés de cinétique, d'amplitude et de localisation de la signature calcique. μs = microseconde ; ms = milliseconde ; min = minute ; h = heure (Inspiré de [Berridge *et al.*, 2003]).

I.6.2) La prolifération cellulaire

Les facteurs mitogènes tels que les facteurs de croissance (par exemple EGF) [Pennock *et al.*, 2003] et VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [Byrne *et al.*, 2005]), les hormones, les neuropeptides ou les agonistes des RCPG [Lowe *et al.*, 2002] régulent une multitude de processus physiologiques cellulaires dont la prolifération [Munaron *et al.*, 2004]. En réponse à des stimuli mitogéniques, la cellule génère des signaux calciques ayant une signature caractéristique. Il est clairement établi que ces signaux calciques sont indispensables pendant certaines phases du cycle cellulaire [Pande *et al.*, 1996 ; Kahl *et al.*, 2003]. Le Ca^{2+}

fonctionne en amont de la machinerie du cycle cellulaire en régulant l'expression, l'activité et/ou la localisation de certains facteurs de transcription (ex : FOS, JUN, MYC, NFAT) qui, à leur tour, contrôlent l'expression de cyclines telles que la cycline D1 [See *et al.*, 2004]. Le Ca^{2+} peut aussi agir sur les cyclines, les Kinases Dépendantes du Cycle (CDK) pour réguler l'assemblage et l'activation des complexes CDK [Kahl *et al.*, 2004].

Au niveau cellulaire, le Ca^{2+} provient de deux sources : une externe (milieu extracellulaire) et une interne (stocks intracellulaires dont le Réticulum Endoplasmique ou RE est sans doute le plus important et le plus dynamique). Des travaux ont démontré que la concentration du Ca^{2+} réticulaire régule la croissance cellulaire et la progression dans le cycle cellulaire [Short *et al.*, 1993]. Des études récentes montrent que l'influx calcique est impliqué dans la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques [Shah *et al.*, 1994 ; Thebault *et al.*, 2003 ; Thebault *et al.*, 2006]. De plus, le maintien d'un niveau suffisant de Ca^{2+} au sein du RE est critique pour les fonctions cellulaires physiologiques. Il a été décrit que la prolifération cellulaire est finement régulée par le contenu en Ca^{2+} du RE et par l'expression des pompes SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) [Waldron *et al.*, 1994 ; Humez *et al.*, 2004 ; Crepin *et al.*, 2007]. Ainsi, une déplétion massive des stocks calciques réticulaires induirait l'arrêt de la croissance cellulaire [Vanoverberghe *et al.*, 2003].

I.6.3) Le stress réticulaire et la mort cellulaire programmée

Des concentrations cytoplasmiques élevées et soutenues de Ca^{2+} peuvent conduire à l'apoptose, terme désignant le phénomène de mort cellulaire programmée. L'apoptose est enclenchée par des voies de signalisation extrinsèques (*via* des récepteurs) ou intrinsèques (*via* les mitochondries) induisant des événements protéolytiques (notamment par les caspases) (pour revue [Chowdhury *et al.*, 2008]) et/ou nucléolytiques dans un ordre bien précis [Kerr *et al.*, 1972]. Une déplétion des stocks calciques réticulaires pourrait stimuler l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques [Skryma *et al.*, 2000]. Ainsi, la déplétion du RE ou les altérations dans ses systèmes de transport calcique (ex : inhibition des pompes SERCA par des agents pharmacologiques tels que la thapsigargine, empêchant la recapture du Ca^{2+} dans le RE) induisent un *stress réticulaire* [Rao *et al.*, 2004] directement lié à l'activation des caspases [Orrenius *et al.*, 2003 ; Breckenridge *et al.*, 2003].

Le maintien de l'homéostasie tissulaire, dans les conditions physiologiques, repose sur un équilibre constant entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Des altérations des voies

de signalisation calcique impliquées dans ces 2 processus peuvent ainsi conduire au développement de certaines pathologies prostatiques [Capiod *et al.*, 2007].

La clé du rôle pléiotropique du Ca^{2+} est l'organisation spatiotemporelle complexe des signaux qu'il engendre, évoqués par des agonistes extracellulaires, permettant le recrutement sélectif d'effecteurs intracellulaires et l'initiation de fonctions spécifiques. L'architecture cellulaire apporte un cadre déterminant pour la localisation subcellulaire et le rôle fonctionnel de chacun de ces acteurs ainsi que pour leur « dialogue ». Depuis quelques années, l'existence et l'importance fonctionnelle de « *microdomaines calciques* » constituent une évidence, soutenue par des études biochimiques et morphologiques (pour revue [Rizzuto *et al.*, 2006]), [Ambudkar, 2004 ; Berridge *et al.*, 2003]. Nombreuses sont les données identifiant la localisation de telles structures au niveau de la membrane plasmique représentées par les *cavéoles* qui sont enrichies en protéines de la signalisation calcique [Fujimoto, 1993 ; Isshiki *et al.*, 2003 ; Isshiki *et al.*, 1999 ; Fujimoto *et al.*, 1992]. La protéine constitutive des cavéoles, la cavéoline-1 (cav-1), jouerait un rôle dans l'assemblage des complexes protéiques [Okamoto *et al.*, 1998 ; Brazer *et al.*, 2003 ; Lockwich *et al.*, 2000].

De façon très intéressante, un lien entre la cav-1 et la progression maligne du cancer de la prostate a été récemment établi [Mouraviev *et al.*, 2002 ; Freeman *et al.*, 2005 ; Karam *et al.*, 2007 ; Tahir *et al.*, 2001]. La colocalisation des protéines de signalisation (récepteurs, enzymes, canaux ioniques notamment) avec la cav-1 suggère que certains signaux de croissance, de survie cellulaire et d'autres processus physiopathologiques seraient transmis par l'intermédiaire des cavéoles [Lu *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2003 ; Isshiki *et al.*, 2003]. Toute altération de la localisation et de l'activité de ces protéines serait fortement liée à la composition lipidique et à l'organisation des cavéoles et pourrait être à l'origine de diverses pathologies telles que le cancer [Goetz *et al.*, 2008 ; Thomas *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2006 ; Escriba, 2006 ; Freeman *et al.*, 2004].

II. Les microdomaines lipidiques au sein de l'organisation de la membrane plasmique

Le modèle membranaire de mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson en 1972 suggérait une organisation fluide bidimensionnelle des lipides membranaires au sein de laquelle les protéines intégrales seraient dissoutes de façon aléatoire [Singer *et al.*, 1972]. Alors que l'hétérogénéité spatiale et temporelle des lipides était peu explicitement évoquée, elle n'était pas pour autant complètement ignorée. L'existence de petits domaines au sein de la bicouche fluide était soupçonnée sans qu'un lien soit établi avec des fonctions biologiques.

Depuis la proposition de ce modèle membranaire, plusieurs études ont permis de réexaminer l'architecture de la membrane plasmique [Jain *et al.*, 1977 ; Thompson *et al.*, 1985 ; Jacobson *et al.*, 1995]. De ce fait, elles ont apporté une image beaucoup plus complexe de l'organisation de la surface cellulaire, en particulier avec la naissance du concept des microdomaines lipidiques membranaires, généralement désignés par le terme consacré de radeaux lipidiques ou « rafts » lipidiques.

II.1) Définitions et compositions des microdomaines lipidiques

II.1.1) Définition structurale

L'hypothèse la plus citée pour la structure des « rafts » membranaires est celle proposée par K. Simons [Simons *et al.*, 1997], mais d'autres points de vue existent [Anderson *et al.*, 2002 ; Maxfield, 2002 ; Mayor *et al.*, 2004]. Selon la définition de K. Simons, ce sont des régions spécialisées de la membrane plasmique résultant de l'assemblage latéral préférentiel de sphingolipides et de cholestérol (Figure 8). Ces assemblages se forment sur le feuillet extracellulaire de la membrane, leur présence du côté cytoplasmique étant encore mal définie. La difficulté de les mettre en évidence et de prouver leur existence dans les membranes biologiques crée une confusion significative de leur définition. L'observation *in situ* est rendue difficile par leur perpétuelle dynamique. Le fait qu'il en existe plusieurs types différents [Maxfield, 2002] rajoute davantage de difficulté dans leur description et la compréhension de leurs propriétés. Les outils de microscopie et de biophysique apportent des preuves en faveur de leur existence [Brown *et al.*, 1992 ; Jacobson *et al.*, 1999]. Des méthodes indirectes permettent d'estimer leur taille entre 20 et 500 nm mais ces dimensions sont toujours en discussion [Pike, 2003]. Dans les conditions de repos, les « rafts » pourraient

alors mesurer moins de 50 nm et suite à une activation cellulaire, ils pourraient se rassembler pour former des plus grandes entités pouvant mesurer jusqu'à 500 nm permettant ainsi l'interaction entre des protéines qui pourraient devenir fonctionnellement associées [Simons *et al.*, 2002 ; Pike, 2003].

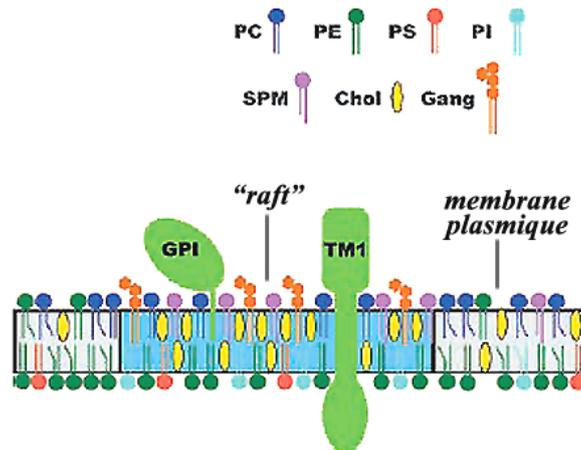


Figure 8. Modèle d'organisation des « rafts lipidiques »

Les « rafts » (partie de la membrane plasmique en bleu foncé) ont une organisation et une composition lipidique différentes du reste de la membrane plasmique. Les « rafts » contiennent des protéines à ancrage GPI (glycosylphosphatidylinositol) et des protéines transmembranaires (TM1). PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PS, phosphatidylsérine ; PI, phosphatidylinositol ; SPM, sphingomyéline ; Chol, cholestérol ; Gang, gangliosides (d'après [Pike, 2003]).

II.1.2) Définition biochimique

Des techniques biochimiques ont permis de purifier les « rafts » lipidiques et de les définir avec diverses terminologies : « Detergent Resistant Membranes » ou DRM, « Detergent-Insoluble Glycolipid/glycosphingolipid-enriched complexes/membranes » ou DIG. Leur purification repose essentiellement sur leur propriété d'insolubilité dans des détergents non ioniques tels que le Triton X-100 à basse température. A cause de leur contenu élevé en lipides, ces DRM flottent à des densités faibles lors d'une centrifugation sur gradient isopycnique (de densité) [Simons *et al.*, 1997]. Pendant longtemps, l'existence des DRM était considérée comme le reflet des « rafts » lipidiques présents dans les membranes biologiques. Les discussions sur la réalité de la relation DRM/« rafts » biologiques continuent jusqu'à ce jour [Munro, 2003 ; Nichols, 2005 ; Shaw, 2006]. Elle reste pour autant une des méthodes les plus utilisées pour définir le contenu des « rafts » lipidiques. Ces études biochimiques ne peuvent évidemment pas donner d'informations sur l'organisation physique de composants des « rafts » mais elles définissent la caractéristique biochimique indirecte de ces structures.

Leur corrélation avec les résultats d'autres techniques (par exemple biophysiques) contribue à la compréhension de l'organisation des multiples composants présents sur la surface cellulaire.

II.1.3) Composition lipidique

Diverses préparations de « rafts » lipidiques ont été analysées selon différentes méthodologies ce qui a permis de déterminer leur composition lipidique de façon la plus précise possible [Pike, 2003]. En général, ces études montrent que les DRM sont riches en cholestérol et glycosphingolipides et sont souvent pauvres en glycérophospholipides. La sphingomyéline et divers glycolipides tels que les gangliosides et les sulfatides y sont également présents en grande quantité. Les chaînes latérales des phospholipides présents sont riches en acides gras saturés permettant l'assemblage très compact des lipides et du cholestérol au sein des DRM à l'origine des domaines ordonnés moins fluides (connus sous le terme de « ordered domains ») que le reste de la membrane plasmique. Les DRM sont particulièrement pauvres en lipides typiquement trouvés au niveau du feuillet interne de la membrane tels que des phospholipides anioniques et la phosphatidyléthanolamine [Pike, 2003]. Récemment, des travaux effectués sur des modèles de membrane ont démontré que selon la composition en lipides, la taille des domaines varie [Yuan *et al.*, 2002 ; de Almeida *et al.*, 2005]. Les modifications de la composition des « rafts » en sphingomyéline et cholestérol induiraient des modifications des propriétés biophysiques des microdomaines membranaires et interviendraient ainsi dans la régulation de diverses voies de signalisation telles que celle de récepteurs couplés aux protéines G [Wang *et al.*, 2005] ou encore la voie de signalisation Akt [Zhuang *et al.*, 2005 ; Oh *et al.*, 2007].

II.1.4) Composition protéique

Les analyses protéomiques des DRM ont apporté une grande liste de molécules potentiellement associées aux « rafts » : la flotilline, la cavéoline, des protéines à ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) se liant au feuillet externe de la bicouche lipidique, des protéines transmembranaires, des récepteurs couplés aux protéines G (par exemple les récepteurs α et β adrénergiques), des protéines G hétérotrimériques, des tyrosine kinases, des kinases se liant au feuillet cytoplasmique par des chaînes acylées comme celles de la famille Src, des MAPK, la PKC [Simons *et al.*, 1997] pour en nommer certaines. Les mécanismes par lesquels ces diverses protéines s'associent aux « rafts » semblent être variables (revue [Pike,

2003]). Par exemple, la cavéoline est une protéine membranaire intrinsèque dont la capacité de se lier au cholestérol résulte en la formation des cavéoles [Murata *et al.*, 1995]. La flotilline forme des oligomères qui s'ancrent à la membrane plasmique grâce à leurs sites de myristoylation et palmitoylation [Neumann-Giesen *et al.*, 2004 ; Langhorst *et al.*, 2005]. Les protéines à ancrage GPI ou les kinases de la famille Src, quant à elles, se lient à la membrane plasmique grâce à des modifications lipidiques diverses [Shenoy-Scaria *et al.*, 1994 ; Shaul *et al.*, 1996]. Pour les protéines transmembranaires, la longueur de leur domaine transmembranaire peut être à l'origine de leur association avec des domaines enrichis en cholestérol [Bretscher *et al.*, 1993].

Il est suggéré que tous les « rafts » ne possèdent pas le même contenu en lipides et en protéines et qu'il peut exister plusieurs types de microdomaines au sein d'une même cellule, repartis séparément au niveau de la membrane plasmique. La fonction de ces microdomaines est de servir de radeaux pour le transport sélectif de membranes ou de « stations relais » pour la signalisation cellulaire [Simons *et al.*, 1997 ; Zurzolo *et al.*, 2003].

II.2) Les cavéoles

Au milieu du 20^{ème} siècle, la microscopie électronique a dévoilé de nouveaux éléments de l'architecture cellulaire. Les cavéoles forment des « puits » au niveau de la surface de certaines cellules, en particulier les cellules endothéliales [Yamada, 1955], puis dans le muscle pendant les années 60 à 80 [Ishikawa, 1968]. Initialement nommés *caveolae intracellularis* [Yamada, 1955], ils sont restés une exclusivité de la microscopie électronique pendant les 40 ans qui ont suivi leur découverte. Avec le développement de l'aspect moléculaire de la biologie cellulaire sont apparues de nouvelles notions sur la structure et la fonction des cavéoles. Leurs nombreux rôles dans la physiologie cellulaire ainsi que leurs modifications lors de certaines maladies ont rendu nécessaire l'étude plus approfondie du fonctionnement des cavéoles [Cohen *et al.*, 2004 ; Quest *et al.*, 2008].

II.2.1) Morphologie et composition moléculaire

Les cavéoles sont définies en microscopie électronique comme des invaginations membranaires « lisses » (par opposition au terme de puits « enrobés » de clathrine) de 50 à 100 nm (Figure 9A). Elles peuvent être présentes sous formes de vésicules cytoplasmiques détachées de la membrane plasmique (Figure 9B, flèches bleues) [Razani *et al.*, 2002]. Les cavéoles sont présentes au niveau de nombreux tissus et types cellulaires en quantité variable,

très probablement selon la fonctionnalité des cellules. Certaines cellules telles que les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et striées, les adipocytes et les cellules endothéliales comportent une quantité particulièrement importante de cavéoles [Razani *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2008]. Bien que les cavéoles et les « rafts » aient des compositions lipidiques et des propriétés biochimiques similaires [Smart *et al.*, 1999], la présence de la protéine cavéoline dans les cavéoles les distinguent des autres microdomaines membranaires [Brown *et al.*, 1998 ; Simons *et al.*, 2000]. La purification par des détergents non ioniques a permis l'identification d'une grande quantité de lipides et de protéines enrichies au sein des cavéoles [Anderson, 1998 ; Smart *et al.*, 1999].

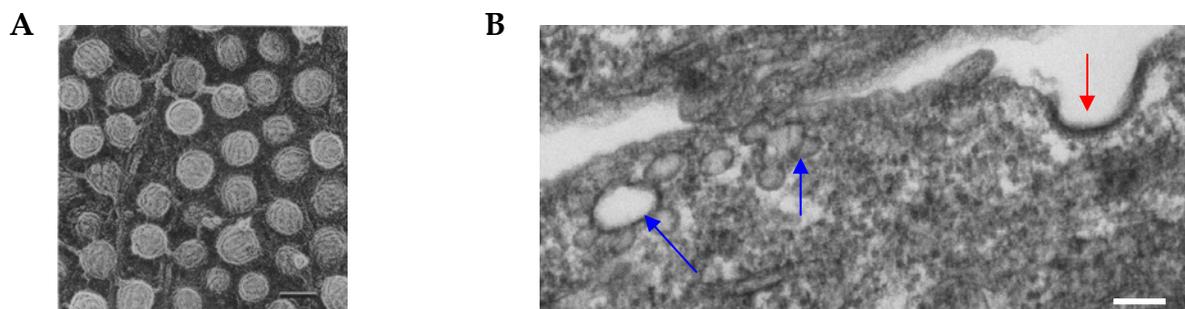


Figure 9. Les cavéoles : définition morphologique

- A. Image par cryofracture et cryodécapage du « manteau » strié qui décore la face interne de la surface membranaire de chaque cavéole de fibroblaste humain (barre = 50 nm ; source : [Anderson, 1993]).
- B. Les formes alternatives de l'invagination membranaire (flèche rouge) : vésicules traditionnelles et agrégats (flèches bleues) (barre = 100 nm).

II.2.2) La famille des cavéolines

Décrite pour la première fois à la fin des années 80 dans les fibroblastes de poussin comme un substrat de l'oncogène viral *Rous sarcoma* (v-src) phosphorylé sur tyrosine suite à une transformation cellulaire [Glenney, 1989], la cavéoline-1 (cav-1), protéine de 21 à 25 kD, a été identifiée plus tard comme une composante du réseau trans-Golgien [Kurzchalia *et al.*, 1992 ; Kurzchalia *et al.*, 1994]. Elle a été enfin identifiée comme une protéine majeure du « manteau » des cavéoles membranaires [Rothberg *et al.*, 1992]. La caractérisation d'une plus petite isoforme de cav-1 (cav-1 β) a suivi la découverte de la cav-1 α [Scherer *et al.*, 1995], puis ont été clonées et séquencées les cav-2 [Scherer *et al.*, 1996] et -3 [Tang *et al.*, 1996].

Les cav-1 et -3 présentent une forte similarité alors que l'isoforme 2 est la plus divergente des trois protéines. Le point commun retrouvé dans la majorité des espèces

étudiées, entre les trois cavéolines, est le motif d'acides aminés « FEDVIAEP » [Tang *et al.*, 1996]. Connue comme le « motif de signature de la cavéoline », son importance structurale et fonctionnelle reste inconnue. Les trois isoformes sont considérées comme des marqueurs des cavéoles et les tissus exprimant la cav-1, -2 et/ou -3 sont riches en cavéoles. De façon intéressante, le profil d'expression des cav-1 et -2 est assez différent de celui de la cav-3. En effet, les premières sont souvent exprimées dans le même type de cellules (adipocytes, cellules endothéliales, fibroblastes) alors que la cav-3 n'est présente que dans les cellules musculaires [Okamoto *et al.*, 1998], les astrocytes ainsi que dans les chondrocytes [Nishiyama *et al.*, 1999 ; Schwab *et al.*, 1999].

Il existe cependant des cellules dépourvues de cavéoline qui présentent des structures morphologiquement similaires aux cavéoles [Anderson, 1998 ; Kurzchalia *et al.*, 1999]. En effet, les cavéolines ne sont pas les seules protéines pouvant former des vésicules « lisses ». D'autres protéines, telles que la flotilline, peuvent induire la formation de vésicules lisses [Anderson, 1998 ; Volonte *et al.*, 1999]. Pour expliquer ces observations, il est nécessaire de mieux comprendre les propriétés structurales de la cavéoline pour la formation des cavéoles.

II.2.3) Propriétés structurales de la cavéoline et biogenèse des cavéoles

L'analyse moléculaire de la structure et de la localisation membranaire des cavéolines (faite sur l'archétype des cavéolines, la cav-1) a fait émerger deux nouvelles notions : la cav-1 est une protéine transmembranaire non conventionnelle et elle existe sous forme de complexe oligomérique ordonné, composé de 14 à 16 monomères (Figure 10A). Elle joue un rôle principal dans la formation des invaginations membranaires que sont les cavéoles. Après sa synthèse dans le RE, la cav-1 est transportée dans le Golgi où elle forme des oligomères et se concentre au sein de microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides [Parton *et al.*, 2006 ; Smart *et al.*, 1999]. Les oligomères de cav-1 ainsi acheminés jusqu'à la surface cellulaire formeront des cavéoles. De la membrane plasmique, les cavéoles peuvent être recyclées dans les compartiments intracellulaires tels que le RE et les cavéosomes (endosomes comportant la cav-1) (voir § II.3.1b).

a) Localisation membranaire de la cavéoline.

La cav-1 s'insère dans la membrane plasmique sans la traverser de part en part [Sargiacomo *et al.*, 1995]. L'analyse de la séquence peptidique de la cav-1 indique une seule région hydrophobe de 32 acides aminés (résidus 102-134) qui n'est pas suffisamment longue

pour former une boucle complète à travers la bicouche lipidique. Cette séquence sert de « peptide signal » pour l'insertion de la cav-1 dans la membrane plasmique par translocation classique à partir du RE. Il est maintenant bien établi que les domaines N-terminal, important pour la configuration de boucle en forme d'épingle à cheveux [Monier *et al.*, 1995] et C-terminal de la cav-1 sont cytoplasmiques (Figure 10B). Des analyses supplémentaires de mutation et/ou délétion ont démontré l'importance de certains résidus des domaines N- et C-terminaux pour l'attachement à la membrane plasmique (Figure 10B) : N-MAD (*N-terminal attachment domain*) dirige spécifiquement la cav-1 dans les membranes cavéolaires et C-MAD (*C-terminal attachment domain*) dirige sa localisation dans le trans-Golgi. La palmitoylation du domaine C-terminal n'est pas nécessaire pour la localisation cavéolaire ou l'attachement à la membrane mais elle stabilise l'ensemble de la structure de cette protéine au niveau de la membrane [Monier *et al.*, 1996].

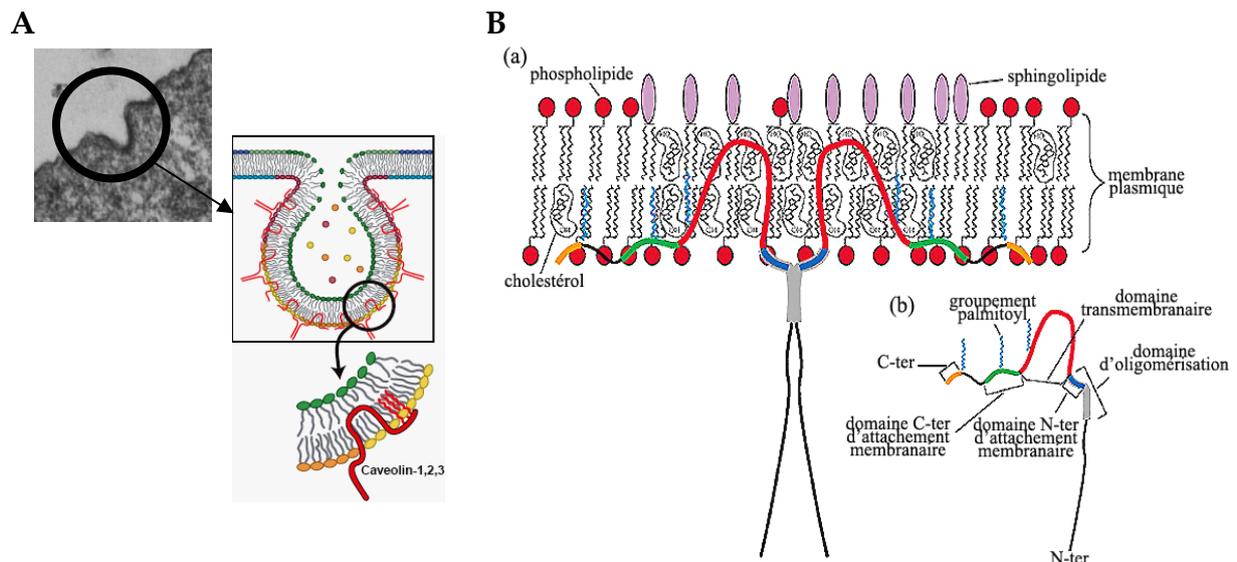


Figure 10. La cavéoline : structure et localisation membranaire

- A. Les trois formes de cavéoline (-1, -2 et -3) ont une structure en épingle à cheveux. L'oligomérisation de la cavéoline forme les invaginations membranaires caractéristiques que sont les cavéoles (*source : image personnelle et [Parton, 2001]*).
- B. (a) La cavéoline est localisée sous forme d'un ensemble d'oligomères au sein de la bicouche lipidique membranaire enrichie en sphingolipides et cholestérol, et cela (b) grâce à ses domaines N et C terminaux (N-ter et C-ter) très conservés. Le domaine N-ter d'attachement membranaire correspondrait au domaine d'échafaudage (CSD) (*d'après : genobiology.com*).

b) Oligomérisation de la cavéoline.

Il est décrit que des hétéro-oligomères de cav-1 et -3 sont formés grâce à l'interaction de leurs domaines d'oligomérisation, alors que cav-1 interagirait avec cav-2 par le domaine

transmembranaire (Figure 11A) (pour revue [Razani *et al.*, 2002]). Les mécanismes de formation du réseau d'oligomères de cavéoline sont moins bien définis. Il semblerait que le domaine C-ter de la cav-1 soit responsable des interactions homotypiques d'oligomères de cav-1. En effet, la cavéoline présente un domaine dit d'échafaudage (« Caveolin Scaffolding Domain », CSD) d'environ 20 acides aminés au niveau C-ter (Figure 10B et 11B). A part son rôle dans l'oligomérisation de la cavéoline, ce domaine serait essentiel pour l'attachement de la cavéoline à la membrane [Couet *et al.*, 2001]. En plus, comme son nom l'indique, il a un rôle d'échafaudage à travers lequel se réaliserait toute interaction avec des protéines partenaires comme les récepteurs couplés aux protéines G, les protéines G, les tyrosines kinases de la famille Src, et bien d'autres (pour revue [Razani *et al.*, 2002]).

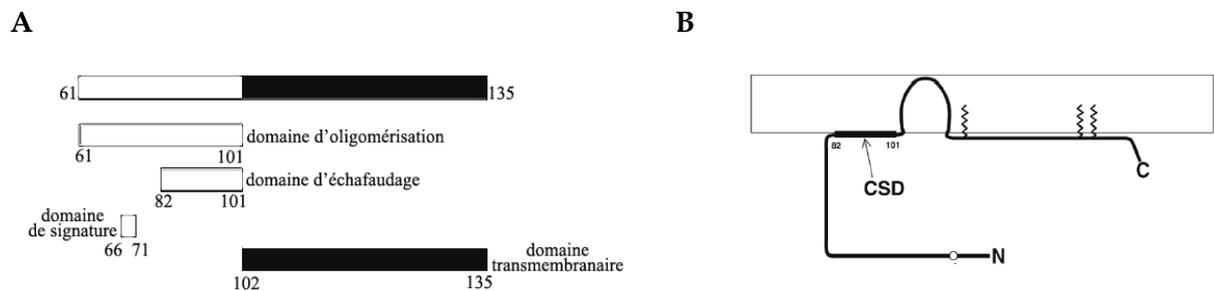


Figure 11. Propriétés structurales de la cavéoline : la base moléculaire de sa localisation membranaire et de son oligomérisation

- A. Représentation schématique des domaines fonctionnels de la cavéoline qui sont impliqués dans l'hétéro- ou l'homo-oligomérisation de cavéoline-1,2 et/ou 3.
- B. Le domaine CSD (domaine d'échafaudage) interagirait avec la face interne de la membrane jouant ainsi un rôle dans l'attachement de la cavéoline à la membrane plasmique (*d'après* [Couet *et al.*, 2001]).

c) La biogenèse des cavéoles : rôle du cholestérol et de la cavéoline.

Le cholestérol est un des composants majeurs des cavéoles. En effet, le cholestérol présente une grande affinité pour la cav-1 et il est nécessaire pour la formation et l'intégrité des cavéoles [Murata *et al.*, 1995]. Le domaine de la cavéoline qui lie le cholestérol n'est pas encore clairement défini mais il est de plus en plus proposé que le domaine CSD joue un rôle important dans les interactions cavéoline/membrane [Arbuzova *et al.*, 2000], (pour revue [Couet *et al.*, 2001]). L'utilisation d'agents se liant au cholestérol, tels que la filipine et la cyclodextrine, induit la déstructuration complète des cavéoles morphologiquement identifiées [Hailstones *et al.*, 1998]. Les agents qui inhibent le transport de cholestérol à la membrane

plasmique, tels que la progestérone utilisée dans des conditions particulières, ont les mêmes effets suggérant que l'apport continu de cholestérol est indispensable pour le maintien de ces structures [Anderson, 1998]. Les niveaux de cholestérol au sein de la membrane plasmique jouent un rôle non seulement dans la formation des cavéoles mais aussi dans la formation des vésicules synaptiques ou bien des vésicules recouvertes de clathrine [Thiele *et al.*, 2000 ; Rodal *et al.*, 1999]. Il est alors évident qu'il n'est pas le seul responsable pour la formation des cavéoles.

Les expériences de surexpression de la cav-1 dans des cellules qui en sont dépourvues ou sa suppression dans des cellules présentant des cavéoles de façon endogène conduisent respectivement à la formation [Fra *et al.*, 1995] ou la perte de ces structures membranaires [Drab *et al.*, 2001]. Ces données établissent un lien net entre l'expression de la cavéoline et la formation des cavéoles. Comme décrit précédemment, 14 à 16 monomères de cavéoline interagissent pour former des complexes oligomériques. Ces complexes peuvent interagir entre eux (*via* leur domaine C-ter) pour former des complexes encore plus importants d'un diamètre de 20 à 40 nm [Sargiacomo *et al.*, 1995].

Les concentrations localement élevées de cavéoline et de cholestérol permettent la formation d'un microenvironnement lipide/protéine idéal pour la torsion de la membrane plasmique et la formation de l'invagination membranaire [Parton *et al.*, 2006].

II.3) Importance fonctionnelle des cavéoles

Depuis leur découverte dans les années 50, la caractérisation morphologique des cavéoles a été bien établie (pour revue [Beech, 2005]). Par contre, en ce qui concerne leur rôle physiologique principal dans les cellules, le débat reste ouvert. En effet, certaines des fonctions des cavéoles semblent être dépendantes du type cellulaire et de la méthode d'étude et de purification [Parton, 2003]. Il semblerait que les cavéoles constituent des unités structurales pouvant jouer divers rôles en fonction des composants spécifiques des cellules soit en tant que structure statique de la surface cellulaire soit en tant que transporteur mobile (pour revue [Parton *et al.*, 2007]).

II.3.1) Trafic vésiculaire

a) *Transcytose*

Il s'agit du transport de certaines protéines à travers les cellules des vaisseaux capillaires (Figure 12) [Simionescu *et al.*, 1975]. L'hypothèse de l'implication des cavéoles dans la transcytose était basée sur la morphologie vésiculaire et l'abondance des cavéoles dans les cellules endothéliales. Les premières approches dans ces études initiales ne permettaient pas de démontrer que ce type de transport était bien spécifique des cavéoles [Schnitzer *et al.*, 1994 ; Simionescu *et al.*, 1991]. Le marquage des protéines résidant au sein des cavéoles des cellules endothéliales a permis de démontrer que le transport *via* les cavéoles constitue une voie majeure et préférentielle pour la transcytose de certaines protéines telles que les LDL (*Light Density Lipoprotein*) [Schnitzer, 2001; McIntosh *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2008].

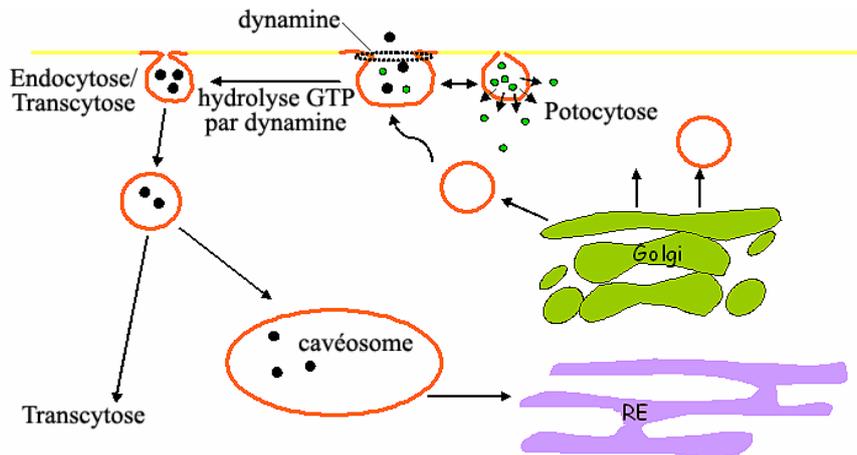


Figure 12. Les cavéoles et le trafic des membranes (schéma synoptique)

L'endocytose de certaines macromolécules s'effectue *via* les cavéoles et nécessite l'implication de la dynamine. La potocytose *via* les cavéoles concerne les petites molécules. Les cavéoles incorporent ces molécules en fermant leur « cou » tout en restant associées à la membrane. La transcytose *via* les cavéoles permet le transport de certaines protéines du côté luminal des cellules endothéliales vers le compartiment interstitiel (schéma inspiré de [Razani *et al.*, 2002]).

b) *Endocytose*

Le phénomène d'endocytose a été associé pendant longtemps au transport de vésicules recouvertes de clathrine. Il est clair maintenant que le transport de certains récepteurs (comme le récepteur à l'interleukine 2 [Lamaze *et al.*, 2001]) et certaines macromolécules s'effectue exclusivement *via* les cavéoles plutôt que les puits recouverts de clathrine [Anderson, 1998] (Figure 12). Ce processus a également été démontré pour certaines toxines (comme la toxine cholérique), la phosphatase alcaline et le virus SV40 [Pelkmans *et al.*, 2001]. Les vésicules

bourgeonnantes se détachent de la membrane plasmique grâce à l'activité GTPasique de la dynamine [Oh *et al.*, 1998 ; Schnitzer *et al.*, 1996], une enzyme cytoplasmique capable de se polymériser sous forme d'hélice autour du « cou » des vésicules. En fait, lors de l'hydrolyse du GTP en GDP, l'hélice se rétrécit et s'allonge induisant le détachement de la vésicule de la membrane. La destinée de ces vésicules cavéolaires endocytées n'est pas encore tout à fait bien définie, mais en fonction des macromolécules endocytées, les vésicules seraient transportées de la membrane plasmique vers les compartiments du RE/Golgi ou vers les organites spécialisés endosomaux riches en cav-1 connus sous le nom de cavéosomes [Nichols, 2003 ; Pelkmans *et al.*, 2001] (Figure 12).

c) Potocytose

Il s'agit d'un processus par lequel des ions et des petites molécules d'une taille inférieure à 1 kD sont transportés dans les cellules sans devoir être endocytées dans des vésicules vers les compartiments endosomiques et lysosomiques [Anderson, 1998] (Figure 12). Démontré pour la première fois dans le cas du récepteur de l'acide folique (à ancrage GPI) [Rothberg *et al.*, 1990], les cavéoles semblent faciliter l'incorporation de l'acide folique tout en restant associées à la membrane plasmique [Anderson *et al.*, 1992].

II.3.2) L'homéostasie du cholestérol

Comme il a été noté précédemment, il existe un lien très étroit entre la cavéoline et le cholestérol. La sensibilité des cavéoles à la déplétion en cholestérol est un fait connu depuis longtemps. Les premières preuves du lien entre la cavéoline et le cholestérol sont survenues suite à des expériences réalisées *in vitro* [Murata *et al.*, 1995]. En effet, la cav-1 forme un complexe avec le cholestérol dans des mélanges lipidiques de l'ordre de 1 à 2 molécule(s) de cholestérol par molécule de cav-1 [Murata *et al.*, 1995]. Il est démontré que le transport subcellulaire de la cav-1 est très fortement lié à celui du cholestérol [Smart *et al.*, 1994] (Figure 13). De plus, il a été observé que l'expression cellulaire de la cav-1 était dépendante du contenu en cholestérol des cellules [Hailstones *et al.*, 1998 ; Fielding *et al.*, 1997].

Le cholestérol quant à lui, synthétisé dans le RE, est transporté aussitôt dans les divers compartiments membranaires dont la membrane plasmique (90% du cholestérol cellulaire y est présent) [Simons *et al.*, 2000]. Son trafic jusqu'à la membrane plasmique serait indépendant de la voie golgienne [Heino *et al.*, 2000]. Smart et collaborateurs ont pu montrer que le cholestérol nouvellement synthétisé est distribué à la membrane plasmique après avoir été transporté dans un premier temps dans les membranes cavéolaires [Smart *et al.*, 1996]. En

plus de ce transport, la cav-1 semble jouer un rôle dans l'efflux de cholestérol en excès, du feuillet extracellulaire de la membrane vers les HDL (*High Density Lipoproteins*) en direction du foie [Fielding *et al.*, 1997] (Figure 13).

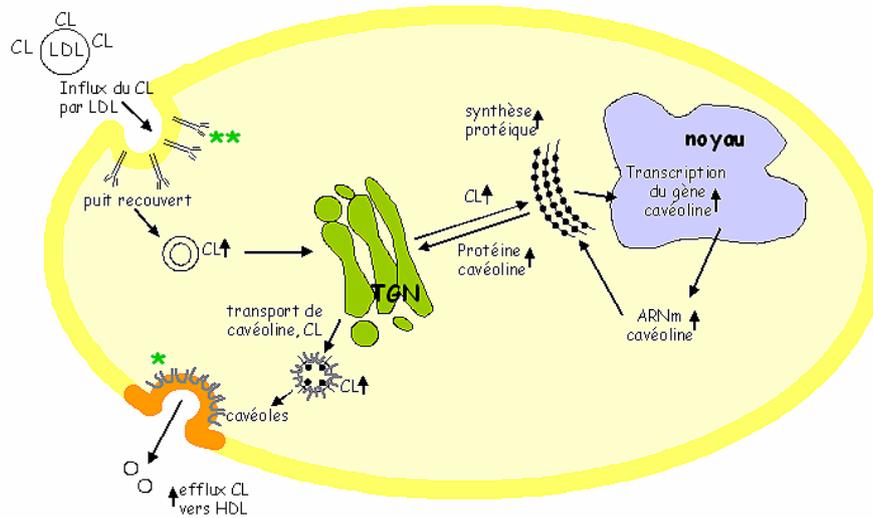


Figure 13. Homéostasie du cholestérol régulée par la cavéoline

Après transfert aux cellules par les LDL (*light density lipoprotein*), le cholestérol libre (CL) est transporté au réseau *trans-golgien* (TGN) induisant une augmentation des niveaux d'ARN messager de la cavéoline. Celle-ci, transportée et incorporée à la membrane, promeut l'efflux du cholestérol libre. Les flèches vers le haut indiquent une augmentation ; la cavéoline (*) et clathrine (**).

II.3.3) La signalisation cellulaire

a) Le concept de la compartimentation des événements de signalisation

Les études biochimiques des DRM et des fractions enrichies en cavéoles ont permis l'identification d'un nombre important de protéines de signalisation, souvent attachées par des modifications lipidiques [Lisanti *et al.*, 1994 ; Casey, 1995]. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que les « rafts » lipidiques et les cavéoles sont impliqués dans une variété de voies de signalisation débutant à la surface cellulaire, en plus de leurs autres rôles décrits précédemment [Simons *et al.*, 2000 ; Smart *et al.*, 1999]. Diverses protéines de signalisation ont été décrites se trouvant concentrées dans les cavéoles et cette liste n'a pas fini d'être complétée [Razani *et al.*, 2002]. Les cavéoles serviraient ainsi de points d'amarrage permettant la régulation rapide et sélective d'événements de signalisation.

De plus, la cav-1 joue un rôle de protéine d'échafaudage. D'une part, elle inhibe certaines voies par interaction directe avec certaines molécules directement par leur domaine CSD [Okamoto *et al.*, 1998 ; Engelman *et al.*, 1998]. D'autre part, elle joue un rôle de

régulateur positif dans d'autres voies de signalisation [Giancotti *et al.*, 1999 ; Wary *et al.*, 1998 ; Salatino *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2004].

b) La signalisation calcique

Depuis longtemps, un intérêt considérable est porté sur le rôle des cavéoles dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire. En 1974, Popescu est le premier à émettre l'hypothèse selon laquelle les protéines impliquées dans la signalisation calcique seraient localisées dans les cavéoles des cellules musculaires lisses [Popescu *et al.*, 1974]. Des études morphologiques et biochimiques ont, par la suite, montré que les cavéoles étaient enrichies en d'autres composants « clés » du transport calcique tels la pompe calcique ATPase membranaire, les récepteurs de l'inositol trisphosphate (IP₃R), la calmoduline [Schnitzer *et al.*, 1995 ; Fujimoto, 1993; Fujimoto *et al.*, 1992]. De plus, il a été décrit qu'un contact étroit entre le réticulum endoplasmique et les cavéoles pourrait exister lors de la signalisation calcique [Isshiki *et al.*, 2003]. Il est proposé que les cavéoles interviennent dans l'homéostasie calcique en régulant l'organisation spatiale des sites d'entrée calcique, en contrôlant la quantité de calcium livrée à ces sites et en modulant les multiples cascades de signalisation dépendantes du Ca^{2+} initiées au sein des cavéoles [Isshiki *et al.*, 1999].

c) La relation dynamique avec les récepteurs couplés aux protéines G

Grâce aux études de fractionnement cellulaire et d'immunocytochimie, les RCPG, les protéines G ainsi que leurs effecteurs (protéines kinases, adénylate cyclase) ont été trouvés concentrés dans les cavéoles de certains types cellulaires tels que les cardiomyocytes [Chini *et al.*, 2004 ; Insel *et al.*, 2005 ; Ostrom *et al.*, 2004]. Dans certains cas, ces complexes de signalisation sont pré-assemblés dans les cavéoles et dans d'autres cas l'assemblage se fait suite à l'interaction ligand/récepteur facilitant ainsi la migration du récepteur et de ses effecteurs dans les cavéoles [Shaul *et al.*, 1998]. Parmi ces récepteurs se trouvent le récepteur à l'endothéline [Chun *et al.*, 1994], le récepteur à l'acétylcholine [Feron *et al.*, 1997] ou encore le récepteur α_{1A} -adrénergique (α_{1A} -AR) [Morris *et al.*, 2006]. En effet, il a été démontré que les protéines impliquées dans le signal des catécholamines (noradrénaline, adrénaline) s'accumulent au sein de cavéoles dans certains types cellulaires tels que les cardiomyocytes [Fujita *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 1995 ; Razani *et al.*, 1999].

II.4) La vie sans cavéoles : Implication des cavéolines dans les pathologies humaines

L'invalidation du gène de la cavéoline chez la souris a permis d'une part, de confirmer le rôle essentiel de cette protéine dans la biogenèse des cavéoles et d'autre part, d'évaluer son importance fonctionnelle dans un contexte physiologique. La génération de souris dépourvues de cavéoline a apporté de nouveaux modèles d'étude pour certaines pathologies humaines telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, la cardiomyopathie et la dystrophie musculaire [Hnasko *et al.*, 2003 ; Williams *et al.*, 2004]. Ainsi, la déficience en cav-3 est associée au développement de dystrophies musculaires et cardiopathies [Galbiati *et al.*, 2001 ; Betz *et al.*, 2001]. Les souris dont le gène codant cav-2 est invalidé présentent plutôt des pathologies pulmonaires [Razani *et al.*, 2002]. Enfin, une déficience en cav-1 induit des dérangements métaboliques [Razani *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2002], des dysfonctionnements du système vasculaire [Schubert *et al.*, 2002] et diminue la durée de vie de ces souris [Park *et al.*, 2003].

II.4.1) Le rôle ambigu de la cav-1 dans le cancer

Le cancer est un processus multifactoriel impliquant la perte de la capacité de la cellule à répondre de façon appropriée aux signaux provenant de son microenvironnement. Lors de la tumorigenèse, différents mécanismes contribuent au développement des « capacités acquises » qui expliquent le comportement autonome de la cellule tumorale [Hanahan *et al.*, 2000]. Les modifications moléculaires sous-jacentes sont amenées par des altérations génétiques et par des mécanismes épigénétiques [Brandt-Rauf *et al.*, 1998]. Selon le « gain de fonction » ou la « perte de fonction » apporté par ces modifications, les molécules sont classées en tant qu'oncogènes ou à l'inverse en tant que suppresseurs de tumeur. Toutefois, de façon intéressante, la cav-1 semble appartenir à un groupe très privilégié de protéines présentant les deux caractéristiques. Le fait que la cav-1 promeut ou prévient la formation de tumeurs semble dépendre du contexte cellulaire (pour revue [Goetz *et al.*, 2008]).

a) cav-1, un suppresseur de tumeur

Depuis une dizaine d'années, une grande quantité de travaux s'est accumulée mettant en relation la cav-1 et le processus de transformation cellulaire. Sa première implication a été décrite en tant que protéine tyrosine phosphorylée prédominante dans les fibroblastes transformés par le v-src [Glenney *et al.*, 1989 ; Glenney *et al.*, 1992]. De plus, dans des

lignées cellulaires dérivées de tumeurs ou des cellules transformées par des oncogènes, une régulation négative des niveaux d'expression de la cav-1 a été observée [Engelman *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1998 ; Razani *et al.*, 2000]. D'ailleurs, l'expression à nouveau de la cav-1 dans ces cellules était suffisante pour renverser le phénotype transformé et prévenir la croissance anarchique de ces cellules [Koleske *et al.*, 1995]. L'ensemble de ces données indique que la perte de la cav-1 est nécessaire et suffisante pour favoriser la transformation cellulaire. En effet, l'expression de la cav-1 est réduite dans plusieurs types de cancer tels que celui du poumon [Racine *et al.*, 1999], du sein [Lee *et al.*, 1998] ou du colon [Bender *et al.*, 2000].

b) cav-1, un promoteur de tumeur

La progression des cellules tumorales vers un cancer de stade avancé implique l'acquisition de certaines capacités caractéristiques comme la signalisation mitogène croissante, le potentiel illimité de division, la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse et la résistance pléiotropique aux drogues (MDR, *Multi-Drug Resistance*) [Hanahan *et al.*, 2000]. Un rôle opposé à celui décrit précédemment est attribué à la cav-1 proposant un caractère plus agressif de la cav-1 dans certaines cellules cancéreuses. De façon intéressante, les cellules cancéreuses humaines à MDR expriment des niveaux élevés de cav-1 et présentent plus de cavéoles sur leur membrane plasmique [Lavie *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1998 ; Pang *et al.*, 2004]. Les niveaux élevés de cav-1 ne sont pas exclusivement caractéristiques des cellules cancéreuses à MDR mais sont maintenus dans plusieurs lignées cellulaires issues de tumeurs telles que des mélanomes, des tumeurs rénales, du colon ou encore ovariennes [Ross *et al.*, 2000].

Comment expliquer qu'une protéine potentiellement suppresseur de tumeur puisse être hautement exprimée dans autant de types de cellules cancéreuses ? Récemment, il a été suggéré que la cav-1 jouerait un rôle dans la survie des cellules cancéreuses. Le rôle de promoteur de tumeur de la cav-1 a été initialement démontré dans les cellules métastatiques de la prostate [Nasu *et al.*, 1998 ; Timme *et al.*, 2000 ; Tahir *et al.*, 2001], puis dans la protection des cellules cancéreuses du sein contre l'anoïkis (apoptose déclenchée suite à la perte de contact de la cellule avec la matrice extracellulaire) [Ravid *et al.*, 2006 ; Fiucci *et al.*, 2002].

Même dans les tissus où la formation de tumeur est initialement associée à la perte de la cav-1, la re-expression de cette protéine dans les stades plus tardifs est corrélée avec le caractère malin de ces tumeurs. Il est proposé que la cav-1 puisse être régulée négativement

dans les cancers de stade précoce (lorsque l'expansion clonale est importante). Au contraire, dans les cancers de stade avancé, son expression serait élevée dans le but de favoriser la survie des cellules cancéreuses (lorsque la résistance au stress est importante) (Figure 14).

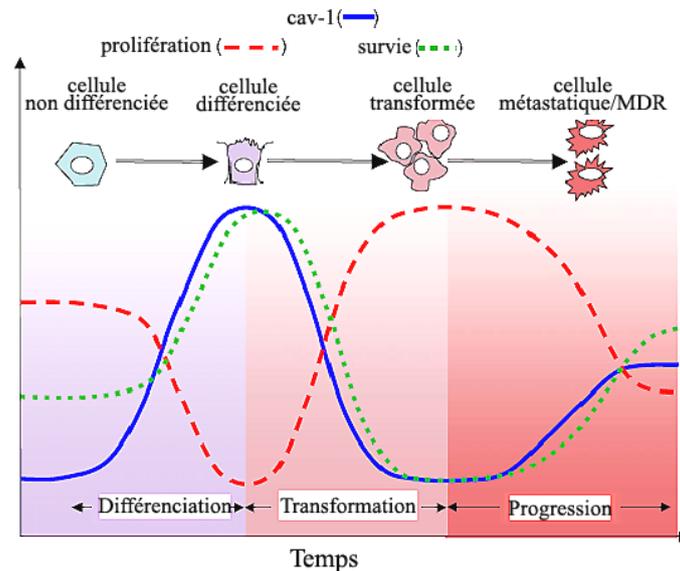


Figure 14. Variations dynamiques de l'expression de la cavéoline-1 lors de la différenciation, l'initiation et la progression tumorale

L'expression de la cav-1 augmente lors de la différenciation cellulaire. Dans les stades précoces du cancer, les niveaux d'expression de la cav-1 sont faibles pour re-augmenter progressivement dans les cellules cancéreuses métastatiques et/ou à résistance pléiotropique aux drogues (MDR) (d'après [Ravid *et al.*, 2006]).

II.4.2) La cav-1 et le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est devenu un problème de santé publique de premier plan au cours des 20 dernières années. Comme il a été exposé précédemment, suite au traitement consistant en l'ablation des androgènes, une rechute par échappement hormonal et métastase est presque certaine. Pour développer d'autres options cliniques, il est nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette pathologie et de sa progression.

Le premier criblage des gènes exprimés dans la prostate cancéreuse a révélé une association significative entre l'expression de la cav-1 et la progression du cancer de la prostate [Yang *et al.*, 1998]. Depuis, diverses données indiquent que la surexpression de la cav-1 joue un rôle dans l'agressivité de ce cancer, en particulier la métastase et le phénotype androgéno-indépendant, par des mécanismes peu définis [Yang *et al.*, 2000 ; Mouraviev *et al.*, 2002 ; Karam *et al.*, 2007]. De plus, il a été démontré que la cav-1 est sécrétée dans le sang

sous une forme biologiquement active par les cellules prostatiques [Nasu *et al.*, 1998 ; Tahir *et al.*, 2001]. En effet, la cav-1 peut se trouver dans la lumière de certaines vésicules de sécrétion et elle est sécrétée sous forme d'un complexe lipidique [Liu *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 2001]. Ainsi, des niveaux élevés de cav-1 ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'un cancer de la prostate par rapport aux hommes sains ou atteints d'une HBP [Tahir *et al.*, 2003 ; Tahir *et al.*, 2006]. La présence de cette protéine dans le sérum de ces patients servirait de marqueur potentiel de mauvais pronostic. Il a été montré que les cellules prostatiques cancéreuses LNCaP surexprimant la cav-1 sont capables de sécréter cette protéine dans une particule lipoprotéique à densité similaire à celle des particules HDL. La cav-1 ainsi sécrétée induit la tumorigénicité des cellules LNCaP dépourvues de cav-1 [Bartz *et al.*, 2008]. Le concept de l'existence d'un tel facteur autocrine/paracrine contribuant à la résistance aux androgènes du cancer de la prostate représente un mécanisme efficace maximisant la résistance aux différents stimuli pro-apoptotiques que les cellules métastatiques rencontrent lors du processus de métastase [Fidler, 1990]. En plus, la cav-1 sécrétée semble jouer un rôle dans la régulation de l'angiogenèse pathologique [Tahir *et al.*, 2008] en augmentant la phosphorylation de la eNOS (NO synthase) induisant la production de NO (monoxyde d'azote) [Liu *et al.*, 2002 ; Sonveaux *et al.*, 2004 ; Labrecque *et al.*, 2003]. Il est établi que la cav-1 induit la survie et la croissance clonale des cellules prostatiques cancéreuses [Li *et al.*, 2001 ; Thompson *et al.*, 1999]. Il a été proposé que la voie du récepteur à l'EGF (PI3K/Akt) contribue à réguler la survie de ces cellules par l'intermédiaire de microdomaines lipidiques membranaires [Zhuang *et al.*, 2002]. L'identification d'un grand nombre de protéines et de lipides de signalisation au sein des cavéoles suppose le rôle de « chef d'orchestre » de la cav-1 dans différentes voies de signalisation [Galbiati *et al.*, 2001]. La régulation de la survie des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes et métastatiques pourrait être mise en œuvre *via* les cavéoles membranaires par plusieurs voies de signalisation.

En effet, la capacité remarquable des cellules cancéreuses prostatiques à résister à l'apoptose a conduit les recherches vers des voies qui permettent à ces cellules des « alternatives » à la mort par l'intermédiaire des cavéoles [Feldman *et al.*, 2001 ; Nelson, 1998]. L'influence du microenvironnement stromal avoisinant ces cellules, dans les voies de croissance et de survie, est une évidence [Arnold *et al.*, 2002]. Néanmoins, certains aspects de ces interactions stroma-épithélium sont toujours sujets à débat [McKenzie *et al.*, 2006]. Un de ces aspects concerne l'implication des neurotransmetteurs tels que la noradrénaline dans les mécanismes de survie des cellules cancéreuses prostatiques. En effet, les cellules prostatiques stromales et épithéliales expriment en majorité le

récepteur adrénérgique α_{1A} (α_{1A} -AR) [Schwinn *et al.*, 2008]. Connu pour son rôle dans la contraction des muscles lisses prostatiques [Marshall *et al.*, 1995], l'implication du α_{1A} -AR dans la croissance et la survie des cellules épithéliales prostatiques reste à définir.

III. Les récepteurs adrénérgiques

Les récepteurs adrénérgiques ou *adrénorécepteurs* (AR) font partie de la famille des Récepteurs membranaires Couplés aux Protéines G (RCPG). Ils constituent des cibles pour les catécholamines endogènes : adrénaline et noradrénaline. Les AR ont été initialement divisés en deux sous-types, α et β , par Alquist dans son manuscrit référence datant de 1948. Des études pharmacologiques ont ensuite permis la caractérisation de cinq sous-types : α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 [Hieble, 2007] (Figure 15). Par la suite, grâce au clonage moléculaire au début des années 90, neuf sous-types des α et β -AR sont dénombrés ($\alpha_{1A, B, D}$; $\alpha_{2A, B, C}$; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$) [Bylund, 2007], chacun décrit du point de vue pharmacologique et fonctionnel [Piascik *et al.*, 1996 ; Graham *et al.*, 1996 ; Guarino *et al.*, 1996]. Les AR sont présents dans une grande variété d'organes et de tissus, ce qui leur attribue un grand nombre de fonctions physiologiques [Heinsimer *et al.*, 1982 ; Lefkowitz *et al.*, 1985]. Effectivement, l'activation des AR améliore l'inotropie (force de contraction cardiaque), la bronchodilatation, la vasoconstriction et l'analgésie. Au contraire, leur inhibition résulte en la vasodilatation, la diminution de la fréquence cardiaque et la relaxation du muscle lisse de la prostate. Chacune de ces actions est importante pour le traitement clinique de certaines pathologies telles que l'hypertension, l'asthme, le glaucome, l'insuffisance cardiaque et l'HBP [Smiley *et al.*, 1998 ; Kable *et al.*, 2000 ; Michelotti *et al.*, 2000].

Les données pharmacologiques et histologiques démontrent l'abondance et le rôle primordial du sous-type α_1 dans la prostate [Pennefather *et al.*, 2000], d'où notre intérêt pour cette sous-famille de AR et son rôle potentiel dans la physiopathologie prostatique.

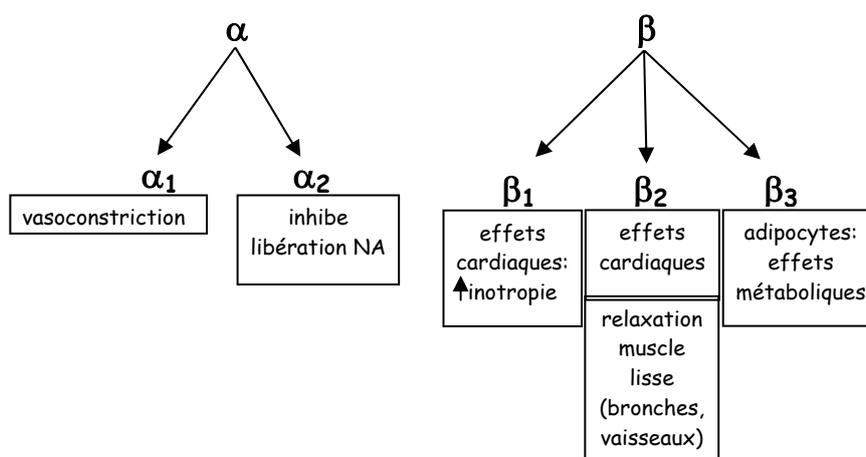


Figure 15. Les fonctions physiologiques des récepteurs adrénérgiques

Énumération sommaire des fonctions physiologiques des cinq sous-types des adrénorécepteurs α et β .

III.1) Les récepteurs α_1 -adrénergiques : clonage, épissage alternatif et structure

III.1.1) Classification moléculaire des α_1 -AR

Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont impliqués dans diverses fonctions du système nerveux sympathique périphérique [Lefkowitz *et al.*, 1988], en particulier dans le cœur, les vaisseaux et la prostate humaine [Faber *et al.*, 2007], (pour revues [Guarino *et al.*, 1996 ; Michelotti *et al.*, 2000]). Le clonage moléculaire a permis d'identifier trois sous-types d'AR : α_{1A} , α_{1B} et α_{1D} , tous associés aux protéines $G_{q/11}$ activant la PLC [Hieble *et al.*, 1995]. Par ailleurs, les études fonctionnelles ont permis de définir un quatrième sous-type, α_{1L} -AR, caractérisé par sa faible affinité pour l'antagoniste prazosine [Guimaraes *et al.*, 2001] et décrit comme un état conformationnel alternatif du α_{1A} -AR [Nelson, 2008 ; Ford *et al.*, 1997].

III.1.2) Régulation génique du α_{1A} -AR

Douze isoformes distinctes issues d'un épissage alternatif de l'extrémité C-ter des récepteurs α_{1A} adrénergiques ont été décrits [Hirasawa *et al.*, 1995 ; Chang *et al.*, 1998]. Il est suggéré que puisqu'elles diffèrent seulement dans leur région C-ter, elles pourraient avoir des affinités distinctes pour telle ou telle protéine G, comme cela avait déjà été démontré pour le récepteur à prostaglandine EP3 [Namba *et al.*, 1993]. Leur différence de fonction pourrait également être dépendante du processus de désensibilisation [Lattion *et al.*, 1994 ; Price *et al.*, 2002]. L'expression de ces isoformes dans les cellules pourrait moduler la localisation membranaire ou le trafic des formes complètes du α_{1A} -AR, lui attribuant une nouvelle fonction ou pharmacologie [Coge *et al.*, 1999]. L'expression tissulaire de ces isoformes semblent varier mais leur importance physiologique n'est pas connue à ce jour [Chang *et al.*, 1998]. Par exemple, dans la prostate humaine, quatre isoformes ont été identifiées α_{1A-1} , α_{1A-2} , α_{1A-3} et α_{1A-4} . Il est proposé que leur expression variable dans les tissus puisse être modifiée en fonction de l'état pathologique expliquant ainsi l'initiation ou le développement de telle ou telle pathologie [Chang *et al.*, 1998].

III.1.3) Structure des α_{1A} -AR

Dans l'ensemble, la localisation membranaire des α_1 -AR comprend sept domaines transmembranaires hydrophobes en hélice- α (TM1-7), un domaine extracellulaire N-ter, trois boucles extracellulaires, un domaine intracellulaire C-ter et trois boucles intracellulaires (Figure 16). Il a été suggéré que les domaines transmembranaires soient impliqués de façon

capitale dans la liaison avec les ligands adrénrgiques [Dixon *et al.*, 1987 ; Kobilka *et al.*, 1987]. La fonction majeure associée aux domaines cytoplasmiques de ces récepteurs est celle du couplage avec les protéines G. Les études biochimiques et de couplage moléculaire ont permis l'identification d'une grande famille de protéines G responsables du couplage fonctionnel des récepteurs avec une variété d'enzymes, de canaux ioniques et d'autres effecteurs [Gilman, 1987]. Il semblerait que les régions des boucles intracellulaires et/ou des domaines C-ter détermineraient la spécificité des interactions de tel AR avec telle protéine G.

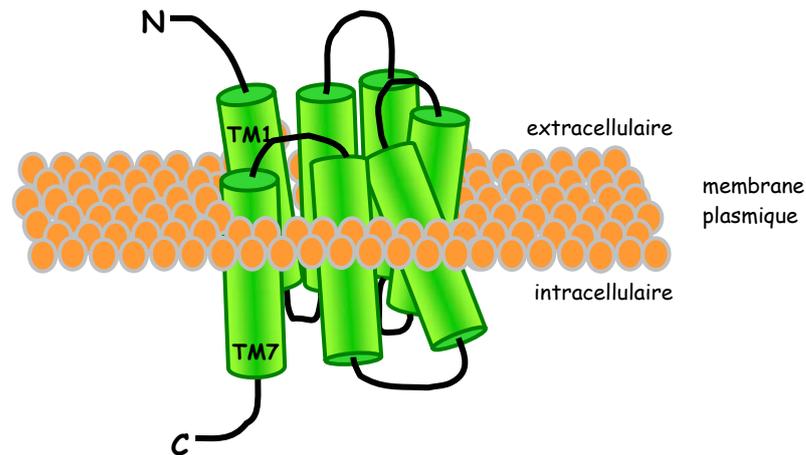


Figure 16. Représentation schématique tridimensionnelle de la structure des α -adrénorécepteurs

Localisation des différentes parties du récepteur α -adrénergique. N, région amino-terminale ; C, région carboxy-terminale ; TM1, domaine transmembranaire 1 ; TM7, domaine transmembranaire 7. Il existe trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires.

III.1.4) Régulation fonctionnelle des α_1 -AR

Une des propriétés importantes des récepteurs α -adrénergiques (mais aussi β -adrénergiques) est la régulation dynamique de leur fonction et de leur localisation cellulaire. Le mécanisme le plus étudié est celui qui mène à la diminution de la sensibilité des cellules à une stimulation continue par les catécholamines, souvent connu sous le terme de « désensibilisation » [Molina-Munoz *et al.*, 2008 ; Mori *et al.*, 2007]. En effet, toutes voies de signalisation mises en jeu nécessitent aussi d'être arrêtées, par l'une des 2 voies suivantes. Dans le cas de la désensibilisation homologue, les récepteurs adrénrgiques subissent une phosphorylation par les kinases des RCPG [Penn *et al.*, 2000] conduisant soit au découplage du récepteur des protéines G soit à son internalisation [Bunemann *et al.*, 1999 ; Garcia-Sainz *et al.*, 2000]. La désensibilisation hétérologue quant à elle, consiste en la diminution de la sensibilité d'un récepteur adrénrgique par activation d'un autre récepteur ou d'une voie de signalisation qui implique des processus de phosphorylation par des kinases telles que la PKA

et la PKC [Claing *et al.*, 2002 ; Vazquez-Prado *et al.*, 2000]. Le processus de désensibilisation assure que la signalisation est accomplie de façon spatiotemporelle tout en permettant la régulation fine des fonctions cellulaires.

III.1.5) α_1 -AR : les aspects cliniques

Les rôles physiopathologiques très variés des α_1 -AR sont dus à la présence de ces récepteurs dans une multitude d'organes et de tissus [Michelotti *et al.*, 2000]. Ils sont particulièrement répandus dans le système cardiovasculaire où ils interviennent dans l'inotropie et l'hypertrophie du myocarde ainsi que dans l'arythmie atriale/ventriculaire et le conditionnement ischémique [Li *et al.*, 1997 ; Tomai *et al.*, 1999]. Puisque les α_1 -AR induisent la contraction des muscles lisses, ils jouent un rôle très important au niveau du système vasculaire [Rudner *et al.*, 1999], du myomètre [Gaspar *et al.*, 1998], de la vésicule biliaire [Wyse, 1988] mais également du système nerveux (cerveau et moelle épinière) [Smith *et al.*, 1999] et du foie [Garcia-Sainz *et al.*, 1995 ; Kassahun *et al.*, 2005]. De plus, il a été démontré que le α_1 -AR, en particulier le sous-type α_{1A} , joue un rôle déterminant dans la physiopathologie de la prostate humaine [Kojima *et al.*, 2006 ; Price *et al.*, 1993 ; Marshall *et al.*, 1995].

III.2) Les différentes voies de signalisation et fonctions liées aux α_1 -AR

Les α_1 -AR sont le plus souvent couplés à la protéine G_q et leur stimulation résulte en l'activation de différents effecteurs tels que des enzymes comme la phospholipase C (PLC), la PLA_2 et la PLD ainsi que divers canaux et échangeurs ioniques (exemples : Ca^{2+} , Na^+ / Ca^{2+} ou Na^+ / H^+ , K^+) [Graham *et al.*, 1996 ; Puceat *et al.*, 1993]. De plus, leur stimulation peut induire l'activation de la transcription de certains gènes impliqués dans la croissance cellulaire [van Biesen *et al.*, 1996 ; Graham *et al.*, 1996]. La complexité de la signalisation du récepteur est due en partie à la capacité de chaque sous-type de α_1 -AR à se coupler à des effecteurs différents *via* des protéines G distinctes. De plus, à cette complexité se rajoute la grande diversité en protéines effectrices spécifiques aux différents tissus [Perez *et al.*, 1993].

III.2.1) La voie calcique

Les α_1 -AR initialisent des signaux dans les cellules cibles par une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) affectant l'état métabolique et contractile de ces cellules [Schwinn *et al.*, 1991]. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est régulée par l'hydrolyse du

phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) en inositol trisphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG) *via* la PLCβ [Berridge, 1981]. De façon intéressante, dans certains tissus, la libération du Ca²⁺ stocké (RE) est à elle seule suffisante pour induire des réponses physiologiques, alors que d'autres tissus nécessitent l'influx de Ca²⁺ extracellulaire à travers des canaux membranaires spécifiques [Minneman, 1988 ; Horinouchi *et al.*, 2007]. Il a été démontré que des canaux calciques chimio-dépendants sont activés ainsi directement par le DAG suite à l'activation du α₁-AR et sont connus sous le terme de ROC (*Receptor-Operated Channel*) [Inoue *et al.*, 2001]. Leur nature moléculaire a longuement été étudiée et les candidats les plus probables sont ceux de la famille des protéines TRP (*Transient Receptor Potential*) [Vazquez *et al.*, 2004]. Le DAG libéré agit également en tant que second messenger en activant la PKC [Berridge, 1981]. Le mécanisme d'hydrolyse des phospholipides membranaires n'est pas le seul impliqué dans la transduction des signaux induits au niveau des α₁-AR. Il a été démontré que l'activation de ce récepteur peut provoquer la libération d'acide arachidonique, l'accumulation d'AMPC ou de GMPc, observations liées à l'existence des différents sous-types de α₁-AR [Minneman, 1988].

III.2.2) Les voies de croissance cellulaire

Il est établi que certains ligands, en se fixant à des RCPG, induisent des réponses mitogènes comme la synthèse d'ADN, la prolifération cellulaire, l'expression d'oncogènes nucléaires [van Biesen *et al.*, 1996]. La stimulation de l'hypertrophie et/ou de l'hyperplasie a été démontrée suite à l'activation des α₁-AR couplés aux protéines G_q et observée, entre autres, dans les cardiomyocytes [Woodcock *et al.*, 2008] et les cellules musculaires lisses des vaisseaux [Faber *et al.*, 2007 ; Hu *et al.*, 1996]. Ainsi, il a été démontré que l'activation des α₁-AR peut induire la stimulation de ERK (*Extracellular signal-Related Kinase*) [Huang *et al.*, 2007], de la MAPK [Kanagawa *et al.*, 2003 ; Leicht *et al.*, 2003 ; Schaak *et al.*, 2000], de JNK (*c-Jun Amino-terminal protein Kinase*) et de proto-oncogènes [Garcia-Sainz *et al.*, 1998], impliquant ces récepteurs dans les processus de prolifération et de survie cellulaire. Par ailleurs, il existe des évidences sur l'effet mitogène des catécholamines dans la croissance de la prostate [Thompson *et al.*, 1987 ; McVary *et al.*, 1998]. Le rôle du α₁-AR en tant que médiateur de la croissance cellulaire est confirmé par le fait que son antagoniste, la prazosine, inhibe la croissance des cellules prostatiques hyperplasiques et cancéreuses [Kyprianou, 2000 ; Justulin *et al.*, 2008] en augmentant l'expression du TGF-β 1 (*Transforming Growth Factor-Beta 1*) [Garrison *et al.*, 2006 ; Partin *et al.*, 2003], une cytokine multifonctionnelle qui régule la production et la dégradation de la matrice extracellulaire, la différenciation, la

prolifération cellulaire et l'apoptose [Huang *et al.*, 2003 ; Zhu *et al.*, 2005 ; Fleisch *et al.*, 2006].

Il est certain que la régulation de la croissance par les α_1 -AR implique un réseau très complexe de voies de signalisation interagissant entre elles et dont la nature exacte semble dépendre du type cellulaire.

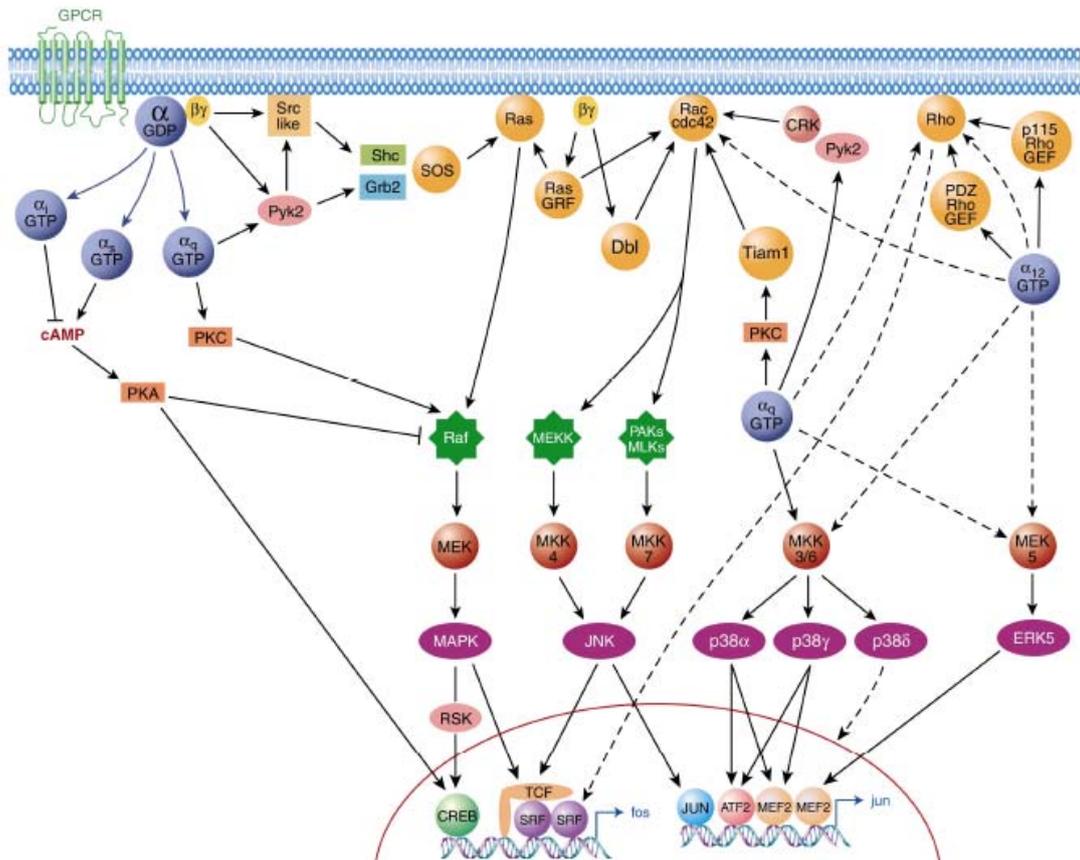


Figure 17. Voies de signalisation depuis les RCPG vers le noyau

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent stimuler diverses protéines de la voie des MAPK. Sur ce schéma, sont représentées diverses molécules reliant les RCPG aux MAPK, JNK, p38 et ERK. Les flèches pleines représentent des stimulations, les lignes bloquées représentent des inhibitions et les flèches en pointillés des voies non encore établies (*source* : [Gutkind, 2000]).

III.3) Récepteurs adrénergiques et prostate humaine

Le stroma de la prostate est particulièrement riche en cellules musculaires lisses participant de façon dynamique à la miction et à l'éjaculation [Farnsworth, 1999], (pour revue [Ventura *et al.*, 2002]). Dans ces processus de contraction, le système nerveux orthosympathique et ses récepteurs prennent toute leur importance.

III.3.1) Récepteurs β -adrénergiques

Un ensemble de travaux pharmacologiques, immunohistochimiques et moléculaires a démontré l'expression au niveau protéique et messenger, des trois sous-types du récepteur β -adrénergique (β_1 , β_2 , β_3) dans la prostate humaine (pour revue [Michel *et al.*, 2006]). A ce niveau, la stimulation β_1 et β_2 -adrénergique induit la relaxation du muscle lisse. Les niveaux d'androgènes ainsi que l'âge peuvent réguler l'expression et la fonction des récepteurs β -adrénergiques prostatiques [Tsujii *et al.*, 1992 ; Ramberg *et al.*, 2008]. Peu d'éléments existent sur l'expression et la fonction des récepteurs β -adrénergiques dans le cancer de la prostate. Parmi ces éléments, des études récentes révèlent que le gène du β_2 -adrénergique est réprimé dans les cas de cancer [Yu *et al.*, 2007 ; Prowatke *et al.*, 2007] par la protéine EZH2 (*Enhancer of Zeste 2*), une méthyltransférase des histones responsable du « silencing » des gènes cibles. La surexpression de EZH2, protéine marqueur des tumeurs épithéliales agressives [Bracken *et al.*, 2003 ; Varambally *et al.*, 2002 ; Bachmann *et al.*, 2006] est associée à un mauvais pronostic [Collett *et al.*, 2006 ; Matsukawa *et al.*, 2006].

III.3.2) α_{1A} -AR, hyperplasie et croissance de la prostate

Les récepteurs α -adrénergiques de la prostate humaine appartiennent essentiellement au sous-type α_{1A} -AR [Schwinn *et al.*, 2008]. Leur stimulation par un agoniste (phényléphrine) ou leur blocage par des antagonistes spécifiques (prazosine) confirme l'implication de ces récepteurs dans la contraction des cellules musculaires lisses prostatiques [Honda *et al.*, 1985]. Des travaux révèlent le rôle primordial de ces récepteurs dans l'obstruction prostatique lors de l'HBP [Takeda *et al.*, 1999]. Comme il a été exposé précédemment, l'HBP est une maladie fréquente chez l'homme âgé conduisant à l'obstruction du tissu prostatique hypertrophié. Cette contraction est due, en partie, à la réponse adrénergique induite par les α_{1A} -AR, très abondants dans le stroma hypertrophié par rapport au tissu sain [Nasu *et al.*, 1996 ; Foglar *et al.*, 1995 ; Price *et al.*, 1993 ; Moriyama *et al.*, 1996]. Ces données ont abouti au développement de médicaments spécifiques, antagonistes du récepteur ou α -bloquants [Kawabe *et al.*, 1994]. Leur effets bénéfiques sont attribués à une action directe sur le muscle lisse prostatique [Andersson *et al.*, 1997]. Des travaux révèlent que les α -bloquants, tels que la terazosine et la doxazosine, inhibent la croissance des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques et des cellules musculaires lisses, par induction d'apoptose comme il a été précédemment élucidé [Kyprianou *et al.*, 2000 ; Kyprianou *et al.*, 1998]. La doxazosine

pourrait être une drogue potentielle pour la prévention et le traitement du cancer androgéno-indépendant de la prostate [Anglin *et al.*, 2002 ; Kyprianou, 2003 ; Chiang *et al.*, 2005].

III.3.3) Quelle est la place du α_{1A} -AR dans le cancer de la prostate ?

Même si l'étiologie exacte du cancer de la prostate est inconnue, un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose a été identifié dans cette pathologie [Kyprianou *et al.*, 2000]. Evidemment, la diminution de la prolifération et/ou l'induction de l'apoptose émergent comme des cibles potentielles pour optimiser les traitements cliniques contre le cancer de la prostate [Bruckheimer *et al.*, 2000]. De plus en plus d'évidences démontrent l'implication des RCPG dans le cancer de la prostate [Daaka, 2004]. L'expression des RCPG et de leurs ligands semble être élevée dans les cellules cancéreuses prostatiques, comme cela a été montré dans le cas du récepteur de l'endothéline 1A [Gohji *et al.*, 2001] et du récepteur de la bradykinine [Taub *et al.*, 2003]. Par ailleurs, la stimulation des RCPG induirait la prolifération et empêcherait l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes [Raj *et al.*, 2002].

En ce qui concerne le récepteur α_{1A} -AR, à part les données sur les effets de ses antagonistes sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques [Kyprianou *et al.*, 2000 ; Kyprianou, 2003 ; Justulin *et al.*, 2008], il existe peu d'informations sur le profil d'expression et le rôle fonctionnel de ce récepteur dans la progression maligne des cellules prostatiques. Des travaux récents, effectués sur les cellules primaires épithéliales prostatiques ainsi que sur la lignée de cellules androgéno-dépendantes LNCaP, ont montré que la stimulation des α_{1A} -AR par la phényléphrine (PHE) induit la prolifération de ces cellules [Thebault *et al.*, 2003 ; Thebault *et al.*, 2006]. Il est alors nécessaire de mieux comprendre l'implication du α_{1A} -AR dans le phénotype androgéno-indépendant du cancer de la prostate.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les hommes et la deuxième cause de mortalité par cancer (chez l'homme) dans les pays industrialisés [Greenlee *et al.*, 2000]. Divers facteurs, tels que les androgènes et les facteurs de croissance, régulent la prolifération des cellules épithéliales prostatiques normales et cancéreuses de stade précoce. L'ablation des androgènes est actuellement le traitement thérapeutique le plus couramment utilisé pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes. Toutefois, la croissance et la survie de ces cellules deviennent progressivement indépendantes des mécanismes de régulation ce qui conduit à l'échappement thérapeutique (pour revue [Arnold *et al.*, 2002]). L'évolution du cancer androgéno-dépendant vers un état androgéno-indépendant constitue un mauvais pronostic pour les patients atteints du cancer de la prostate. L'acquisition du phénotype androgéno-indépendant suppose que des facteurs, autres que les androgènes, régulent la croissance, la survie et l'expression protéique des cellules cancéreuses [McKenzie *et al.*, 2006].

Parmi les autres facteurs qui peuvent expliquer l'échappement thérapeutique les catécholamines endogènes, noradrénaline et adrénaline, peuvent être mises en avant. En effet, le stroma (cellules musculaires lisses) ainsi que l'épithélium de la prostate sont riches en récepteurs α_1 -adrénergiques (α_1 -AR) et plus particulièrement en sous-type α_{1A} -AR [Higgins *et al.*, 1989 ; Chapple *et al.*, 1994]. Les inhibiteurs du α_1 -AR ou α -bloquants sont largement utilisés dans le cadre du traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate grâce à leur action directe sur les α_1 -AR des cellules musculaires lisses [Raghavan, 1988 ; Andersson *et al.*, 1997]. De façon intéressante, il a été démontré qu'ils induisent l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses [Kyprianou, 2000]. Des études récentes sur des cultures primaires de cellules épithéliales prostatiques humaines montrent que la stimulation par la phényléphrine, un agoniste du α_{1A} -AR, induit leur prolifération par une voie dépendante de l'entrée calcique *via* le canal calcique TRPC6 [Thebault *et al.*, 2003 ; Thebault *et al.*, 2006].

Dans certains types cellulaires tels que les cardiomyocytes, il a été démontré que les α_{1A} -AR ainsi que certains canaux calciques, par exemple TRPC1 et TRPC3, se trouvent localisés au sein de structures membranaires de type cavéoles [Morris *et al.*, 2006 ; Ambudkar *et al.*, 2004 ; Ambudkar, 2006]. Les cavéoles sont indispensables à la régulation de diverses molécules de signalisation et toute altération des fonctions et de la structure des cavéoles pourrait avoir des effets sur la carcinogenèse [Koleske *et al.*, 1995]. A ce propos, il existe de plus en plus d'évidences sur l'implication de la cavéoline-1, un constituant majeur des cavéoles, dans la progression maligne et métastatique du cancer de la prostate [Karam *et al.*,

2007 ; Li *et al.*, 2001]. Par ailleurs, les canaux calciques TRPC seraient impliqués dans la régulation de la croissance des cellules prostatiques cancéreuses [Prevarskaya *et al.*, 2007].

Comme il a été proposé que les microdomaines lipidiques membranaires jouent un rôle de sites potentiels pour les effets de la croissance cellulaire dans le cancer de la prostate, le premier objectif de ma thèse fut donc l'étude de la localisation du α_{1A} -AR et des canaux TRPC6, peut-être au sein des cavéoles des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes d'origine métastatique : les cellules DU145.

Le rôle fonctionnel du α_{1A} -AR ainsi que son profil d'expression dans les cellules androgéno-indépendantes étant inconnus, le second objectif de ma thèse a consisté en l'étude des fonctions physiologiques de ce récepteur dans le modèle cellulaire précédent.

Il a été démontré qu'il existe quatre isoformes du récepteur α_{1A} -AR dans la prostate humaine au sein d'échantillons sains et pathologiques issus de prélèvements humains [Chang *et al.*, 1998 ; Hirasawa *et al.*, 1995]. Le troisième objectif de ma thèse a donc consisté à étudier le profil d'expression des isoformes du récepteur ainsi que celui de la cavéoline-1 dans les cellules prostatiques. Une grande partie de mes travaux a finalement été consacrée à déterminer le rôle de la cavéoline-1 dans la fonction du α_{1A} -AR au sein de ces cellules épithéliales cancéreuses prostatiques.

L'ensemble des travaux effectués au cours de ma thèse a donc visé à contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes favorisant la survie des cellules prostatiques androgéno-indépendantes. Mon travail sera présenté sous forme de résultats qui n'ont pas été publiés mais qui ont été importants dans la progression du sujet, puis sous forme d'un article scientifique (soumis pour publication).

MATERIELS ET METHODES

Mes compétences en culture cellulaire, biologie cellulaire et biochimie, ainsi qu'en microscopie électronique, confocale et imagerie calcique m'ont permis de réaliser la plupart des travaux illustrés dans ce manuscrit. Dans ce chapitre, j'ai choisi de n'aborder que les techniques que j'ai moi-même utilisées.

I. Culture Cellulaire

I.1) Lignées Cellulaires

Au cours de mes travaux, j'ai essentiellement travaillé sur la lignée DU145 provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, USA). Il s'agit d'une lignée cellulaire établie à partir d'une métastase cérébrale issue d'un patient âgé de 69 ans atteint d'un cancer prostatique [Stone *et al.*, 1978]. Ces cellules épithéliales adhérentes croissent en monocouche et n'expriment pas le récepteur aux androgènes, elles sont donc androgéno-indépendantes : capables de proliférer en absence d'androgènes dans leur environnement. Les cellules DU145 peuvent induire des adénocarcinomes de stade II lorsqu'elles sont injectées dans des souris « nues », nues car dépourvues de poils et athymiques car dépourvues de lymphocytes T dès la naissance [Mickey *et al.*, 1977].

I.2) Conditions de culture et traitements

La lignée DU145 est cultivée dans le milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en 2 mM de L-glutamine, 100 µg/ml de kanamycine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) constituant ainsi un milieu de culture dit complet. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5% de CO₂ et le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours. Lorsque les cellules arrivent à environ 80% de confluence, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont décollées par une brève trypsinisation (trypsine-EDTA, 0,25%, ICN, USA) pendant quelques minutes. L'effet de la trypsine est ensuite inhibé par l'ajout de milieu de culture complet. Les cellules sont alors dissociées par une série d'aspiration/rejet à l'aide d'une pipette et réparties dans de nouveaux flacons de culture de 25 ou 75 cm². D'autres supports existent pour une utilisation par différentes techniques. En effet, pour les mesures de survie cellulaire, les cellules sontensemencées dans des plaques de 24 puits (Nunc) ; pour les études en imagerie calcique, dans des boîtes delta T à fond en verre (Bioptechs, Butler, PA, USA) traitées au préalable avec 9 µl de collagène de

type 1 (queue de rat, UPSTATE) à 4,14 mg/ml dilués dans 2 ml de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pendant 15 minutes ; pour les études d'immunocytochimie, dans des boîtes de pétri (\varnothing 35 mm, Nunc) contenant trois lamelles de verre de 10 mm de diamètre ; pour les études en Western-blot, microscopie électronique et cycle cellulaire, dans des flacons de 25 ou 75 cm². Conformément aux recommandations de l'ATCC ainsi qu'à nos propres pratiques de laboratoire, les cellules subissent un passage (trypsinisation) par semaine et sontensemencées pour obtenir 80% de confluence une semaine plus tard sauf besoin précis en fonction des expériences souhaitées.

Les différents traitements suivants sont réalisés dans le milieu de culture. La phényléphrine (PHE) (Sigma, France), agoniste spécifique des récepteurs adrénergiques α_1 , est utilisée à 10 μ M pendant 10 min pour les traitements à court terme et en prétraitement de 3 jours pour les études à long terme. La prazosine (PRA) (Sigma), antagoniste compétitif spécifique des récepteurs adrénergiques α_1 , est utilisée à 1 μ M seule ou simultanément avec la phényléphrine. L'apoptose des DU145 est induite par un traitement de 48 h à la thapsigargine (Alomone, Euromedex, France) à 10 μ M. La thapsigargine, terpène d'origine végétale, inhibe la Ca²⁺-ATPase SERCA de façon irréversible, induisant la déplétion des stocks calciques réticulaires et par conséquent l'apoptose des cellules. La Progestérone (Sigma) à 10 μ g/ml, stabilisée par la présence de 0,5 mg/ml de BSA (*Bovine Serum Albumin*) dépourvue d'acides gras (Sigma), a été utilisée pour inhiber le trafic de la cavéoline-1 et du cholestérol vers la membrane plasmique [Smart *et al.*, 1996]. Ce traitement permet de désorganiser indirectement les « rafts » membranaires en diminuant la quantité de cholestérol membranaire [Wang *et al.*, 2006].

II. Transfections

La transfection consiste en l'introduction d'un ADN/ARN étranger dans des cellules en culture. L'étude d'une protéine d'intérêt peut en effet nécessiter qu'elle soit surexprimée ou au contraire réprimée dans les cellules. Dans le cas d'une surexpression, un plasmide contenant le gène codant cette protéine, appelé plasmide d'expression ou transgène, sera alors transféré dans la cellule. En revanche, il est possible de sous-exprimer voire de supprimer la protéine d'intérêt par le mécanisme d'ARN interférence (ARNi) qui est un mécanisme post-transcriptionnel naturel mis en évidence chez les plantes [Fire *et al.*, 1998]. De façon artificielle, nous pouvons introduire un ARNi ciblant l'ARN messager d'un marqueur d'intérêt afin de le dégrader et par conséquent de diminuer ou de supprimer l'expression de ce

marqueur. Typiquement réalisée par la formation transitoire de « pores » au niveau de la membrane plasmique des cellules pour permettre l'entrée de molécules, la transfection peut être stable (le matériel génétique s'insère alors dans le génome) ou transitoire. Lors de mes travaux, j'ai utilisé les plasmides d'expression suivants : α_{1A} -AR cDNA (humain) (Pharmacome LCC, Japon, n° d'accèsion : U03866, [Scofield *et al.*, 2002]), hTRPC6 (humain) (n° d'accèsion : AJ006276, [Thebault *et al.*, 2006]); ainsi que les siARN répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 1) :

<i>nom</i>	<i>séquence ciblée 5'-3'</i>	<i>numéro d'accèsion dans le Genbank</i>
si-CTL Luciférase	CUUACGCUGAGUACUUCGA	-
siADR1A-1 (mélange)	CAGGAAAGAUGCAGAGGA et UUCCUCUGCAUCUUCCU	2059654 et 2059655
siADR1A-2 (mélange)	GCGUCUACGUGGUGCCA et UUGGCCACCACGUAGACG	2059656 et 2059657
shCTL		-
shcavéoline-1	CTGGAATAAGTTCAAATTCTT 2121 3'utr	NM_001753

Tableau 1. Séquences des différents siARN et shARN utilisés au cours de mes travaux.

II.1) Transfections transitoires par nucléofection

La « nucléofection » (transfection au moyen du nucléofector) est une technique de transfection par électroporation mise au point par la société Amaxa. L'électroporation consiste en l'application d'une brève mais forte impulsion électrique grâce à un électroporateur (AMAXA®) permettant d'augmenter la perméabilité membranaire à la molécule d'ADN/ARN d'intérêt. La nucléofection est réalisée sur des cellules en suspension. Les cellules sont d'abord culottées par centrifugation puis reprises dans 100 μ l de tampon de nucléofection (variant selon le modèle cellulaire, pour les DU145 il s'agit du tampon L) et transférées dans une cuve d'électroporation. L'ADN/ARN est alors directement ajouté dans l'homogénat. Les cellules sont alors électroporées dans le nucléofector puis directement remises dans leur milieu de culture. Le plasmide commence à être exprimé 4 h seulement après la nucléofection. Les expériences effectuées sur les cellules surexprimant α_{1A} -AR et TRPC6 ont été réalisées 48 h après la nucléofection.

II.2) Etablissement de lignées stables

Les différentes lignées exprimant stablement un gène hétérologue, c'est-à-dire ayant intégrées dans leur génome le vecteur encodant ce gène d'intérêt, furent toutes obtenues par la

méthode suivante. Deux jours après nucléofection, les cellules sont mises en contact avec l'antibiotique de sélection (dont le gène de résistance est présent dans le plasmide servant à exprimer la protéine d'intérêt) à une dose prédéterminée lors d'un test de toxicité. La puromycine a été utilisée pour sélectionner les cellules exprimant stablement le shRNA dirigé contre la cavéoline-1 ainsi que celles exprimant le shCTL, le plasmide vide (Tableau 1). Lorsque toutes les cellules non transfectées sont mortes, la sélection est arrêtée pour permettre aux cellules « positives » de croître et ainsi former des clones « positifs ». Les différents clones résistants sont alors récupérés directement dans un cône de pipette avec de la trypsine puis sous-clonés pour être ensuite testés par Western-blot (Figure 17) et analyse fonctionnelle (imagerie calcique) ; seuls les clones positifs sont conservés mais aussi congelés.

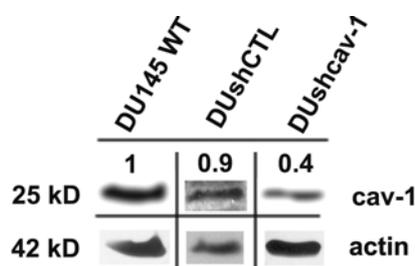


Figure 17. Expression de la cavéoline-1 dans les cellules DU145 non transfectées et stablement transfectées avec le plasmide shcav-1 ou le plasmide vide (shCTL)

L'expression de la cavéoline-1 est quantifiée par rapport à l'actine (contrôle interne), pour les DU145 non transfectées (DU145 WT), les cellules exprimant stablement le plasmide vide (DUshCTL) ou le plasmide exprimant le shARN dirigé contre la cavéoline-1 (DUshcav-1).

III. Immunodétection

III.1) Extractions des protéines

Les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS sur glace, puis lysées dans du tampon de lyse contenant du RIPA ($\text{PO}_4\text{Na}_2/\text{K}$ à 20 mM, pH 7,2 ; Triton X-100 1% ; déoxycholate de sodium 1% ; NaCl 150 mM), 5 mM EDTA, 5 mM orthovanadate de sodium et un mélange d'anti-protéases (Sigma, P 8340) pendant 1 h sur glace. Le lysat est ensuite homogénéisé et centrifugé à 10 000 x g pendant 10 min à 4°C. Après centrifugation, la concentration protéique du surnageant est déterminée à 562 nm par la méthode BCA (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) selon les recommandations du fournisseur à l'aide d'une gamme étalon de sérumalbumine bovine (BSA, 2 mg/ml) de 20 à 1 000 µg/ml.

III.2) Western-blot

Pour l'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*), le système utilisé est un système Miniprotean I ou II de la société Bio-Rad. Le pourcentage en acrylamide varie en fonction du poids moléculaire de la protéine recherchée : 8, 10 ou 16%. Avant le dépôt, les échantillons sont repris dans un tampon de reprise (62,5 mM Tris ; 100 mM DTT ; 2% SDS ; 10% saccharose ; Bleu de bromophénol). Des marqueurs de poids moléculaire sont ajoutés à chaque expérience. L'électrophorèse est réalisée sur des minigels de 7 cm sur 10 cm et se déroule à 600 volts constant dans un tampon de migration (25 mM Tris ; 192 mM Glycine ; 0,1% SDS ; pH 8,5). A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées, par électrotransfert semi-sec (Bio-Rad), sur une membrane de nitrocellulose préalablement humidifiée dans un tampon de transfert (48 mM Tris ; 39 mM Glycine ; 0,037% SDS ; 10% méthanol).

Le transfert effectué, la membrane est saturée durant 30 min dans du TNT (15 mM de tampon Tris pH 8 ; 140 mM NaCl ; 0,05% de Tween 20) avec 5% lait (en poudre écrémé) ou 5% BSA (pour les anticorps anti-protéines phosphorylées), pour éviter les fixations aspécifiques. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C en agitation avec les anticorps primaires souhaités (Tableau 2). Après trois lavages en TNT, la membrane est placée 1 h à température ambiante en présence des anticorps secondaires correspondants couplés à la peroxydase de radis noir. Après trois lavages en TNT, la membrane est révélée par chimioluminescence à l'aide du substrat Supersignal West Dura Chemiluminescent Substrate (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) selon les recommandations du fabricant. La membrane est enfin exposée sur des films BioMax Light (Eastman KodakCo., Rochester, NY). L'intensité des signaux obtenus est mesurée par densitométrie sur une station d'acquisition Chemidoc (Biorad, France) puis semi-quantifiée grâce au rapport protéine d'intérêt/protéine rapporteuse (actine ou calnexine).

III.3) Purification des DRM

Les cellules cultivées dans les flacons de 75 cm² sont rincées avec 10 ml de PBS sur glace. Ensuite, elles sont grattées dans 3 ml de PBS, récupérées et centrifugées pendant 5 min à 700 x g à 4°C. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est re-suspendu avec 500 µl de tampon B d'isolement (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) supplémenté d'un mélange d'anti-protéases (P 8340, Sigma). Le culot cellulaire est homogénéisé en 20 coups dans un Dounce en verre de type Kontès de 15 µm de « clearance ». Pour compléter l'homogénéisation, le lysat est passé 20 fois dans une seringue montée d'une aiguille de 22G,

puis centrifugé 10 min à 1 000 x g. Le surnageant est récupéré et 0,2% de Triton X-100 est ajouté pendant 30 min sur glace. Le gradient de densité discontinu (isopycnique) est préparé en diluant l'Optiprep™ (solution d'iodixanol à 60% (poids/volume) dans l'eau, Axis-Shield) avec la solution D (tampon B + 1% Triton X-100) pour donner 1,66 ml de 35% ; 2,5 ml de 20% ; 2,5 ml de 15% ; 2,5 ml de 10% ; 0,83 ml de 5% (poids/volume). Les solutions de gradient sont mises dans un tube d'ultracentrifugeuse (Ultra-Clear™) pour rotor 50 Ti (Beckman). Le lysat cellulaire est repris dans du saccharose (230 mg pour 0,5 ml de lysat) afin de le rendre dense et il est injecté à l'aide d'une aiguille à l'interface des deux gradients de 35% et 20% d'Optiprep™. Les tubes sont centrifugés pendant 4 h (à 4°C) à 165 400 x g. 10 fractions de 1,1 ml sont alors récupérées par le fond du tube dans des microtubes de type Eppendorf® de 2,5 ml (Microcentrifuge Tube Quality Scientific Plastic, USA) (Figure 18). Les fractions sont numérotées par ordre croissant, de la plus légère (fraction 1) à la plus dense (fraction 10), et 1,1 ml de TCA (acide trichloroacétique) à 20% est ajouté à chaque fraction pour précipiter les protéines et ainsi les concentrer. Les tubes sont laissés sur la glace pendant 20 min puis centrifugés à 10 000 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est rejeté et le précipité est lavé avec 1 ml de méthanol. Une autre centrifugation à 10 000 x g est réalisée pendant 10 min à 4°C. Le méthanol est enlevé et le précipité est remis en suspension dans 50 µl de SDS à 4%. Pour favoriser la dissolution du précipité, les tubes sont passés aux ultrasons pendant 3-4 secondes et centrifugés pendant 1 min à 1 000 x g.

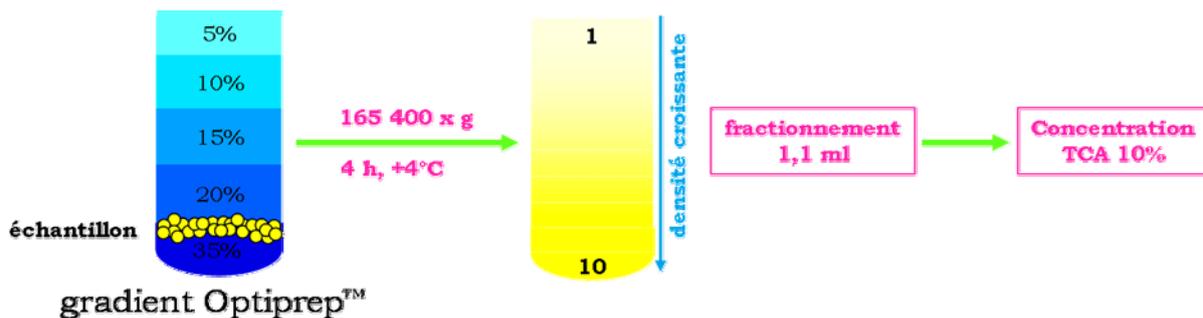


Figure 18. Protocole de purification des microdomaines membranaires sur gradient isopycnique d'Optiprep™

Les dilutions d'Optiprep™ sont déposées de la plus dense à la moins dense formant ainsi un gradient discontinu. L'échantillon, repris dans du saccharose, est déposé entre les gradients d'Optiprep™ de 35% et 20%. Suite à une ultracentrifugation à 165 400 x g à froid, un gradient (de densité) continu est formé et fractionné en 1,1 ml. Le contenu protéique de chaque fraction est concentré avec du TCA avant d'être testé en Dot-blot.

III.4) Dot-blot

L'appareil de Dot-blot à 96 puits (BioRad) est utilisé pour détecter la présence des protéines d'intérêt dans les différentes fractions selon le traitement effectué. Il s'agit d'une technique sensible et rapide permettant la détection de protéines faiblement exprimées. La membrane de nitrocellulose est positionnée entre les deux plaques de l'appareil de Dot-blot sur un morceau fin de papier Whatman[®]. Elle est humidifiée avec du tampon de transfert (Glycine 39 mM ; Tris 48 mM ; SDS 0,037% ; méthanol 10%) et les échantillons sont ensuite déposés. Il s'ensuit le processus d'immunodétection comme il a été décrit dans le paragraphe précédant.

III.5) Immunofluorescence

Les cellules, cultivées sur des lamelles, sont fixées et perméabilisées par de l'acétone pendant 15 min à -20°C. Elles sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS puis saturées, pendant 30 min à température ambiante dans une chambre humide, dans du PBS-gélatine (gélatine de poisson, 1,2%) pour éviter les fixations aspécifiques. Il s'ensuit une incubation avec les anticorps primaires souhaités (Tableau 2) dans du PBS-gélatine pendant 1 h à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS-gélatine et incubées avec les anticorps secondaires correspondants couplés soit à l'Alexa-fluor 488 soit à l'Alexa-fluor 546 (Molecular Probes, USA) dans du PBS-gélatine pendant 1 h à 37°C. Les noyaux sont quant à eux marqués avec du DAPI (*Di Aminido Phenyl Indol*), dilué au 1/200^{ème} dans du PBS pendant 15 min, après deux rinçages au PBS-gélatine et un rinçage au PBS. Suite au montage dans du Mowiol[®], les cellules sont observées à l'aide d'un microscope inversé Zeiss Axiovert 200 équipé d'une tête confocale (Zeiss LSM 510). Les paramètres d'acquisition restent identiques et fixes entre les différentes prises de vue et de mesure pour permettre les comparaisons d'intensité en immunofluorescence du marquage. L'intensité du signal est quantifiée directement sur le microscope confocal avec le logiciel LSM examiner (AIM 3 .2, Zeiss, Le Pecq, France) (voir paragraphe IV.1).

NOM	Mono- ou polyclonal	Espèce	Dilution	Fournisseur
anti- α_{1A} -AR	polyclonal	lapin	1/100 ^{ème} (WB et IF)	Santa Cruz Biotechnology
anti-cavéoline-1	polyclonal	lapin	1/100 ^{ème} (WB et IF)	Santa Cruz Biotechnology
	monoclonal	souris	1/20 ^{ème} (IF)	BD Biosciences

anti-Bcl2	monoclonal	souris	1/100 ^{ème} (WB)	Santa Cruz Biotechnology
anti-Bax	monoclonal	souris	1/100 ^{ème} (WB)	Santa Cruz Biotechnology
anti-Bcl-x _L	monoclonal	souris	1/100 ^{ème} (WB)	Santa Cruz Biotechnology
anti-PCNA	monoclonal	souris	1/1 000 ^{ème} (WB)	Santa Cruz Biotechnology
anti-phospho-p44/p42 MAP kinase	polyclonal	lapin	1/1 000 ^{ème} (WB)	Cell Signaling (Ozyme)
anti-p44/p42 MAP kinase	polyclonal	lapin	1/1 000 ^{ème} (WB)	Cell Signaling (Ozyme)
anti-β-actin	monoclonal	souris	1/400 ^{ème} (WB)	Sigma
anti-TRPC6	polyclonal	lapin	1/100 ^{ème} (WB)	Alomone Labs (Euromedex)
anti-P2Y2	polyclonal	lapin	1/100 ^{ème} (WB)	Santa Cruz Biotechnology
anti-ASM (sphingomyelinase)	polyclonal	lapin	1/50 ^{ème} (IF)	Santa Cruz Biotechnology
anti-procaspase-3	polyclonal	lapin	1/1 000 ^{ème} (WB)	Upstate, Millipore
anti-Pan-cadherin	polyclonal	lapin	1/100 ^{ème} (WB)	Abcam
anti-beta tubulin	monoclonal	souris	1/1 000 ^{ème} (IF)	Chemicon, Millipore
anti-alpha acetylated tubulin	monoclonal	souris	1/100 ^{ème} (IF)	Sigma
anti-keratin 18	monoclonal	souris	1/1 000 ^{ème} (IF)	Interchim
anti-keratin 14	monoclonal	souris	1/50 ^{ème} (IF)	Chemicon, Millipore
anti-NSE (neuron specific enolase)	monoclonal	souris	1/200 ^{ème} (IF)	Dako
anti-golgin-97	monoclonal	souris	1/100 ^{ème} (IF)	Abcam
anti-G _{αq/11}	polyclonal	lapin	1/100 ^{ème} (WB)	Santa Cruz Biotechnology

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés (WB =Western-blot, IF = Immunofluorescence)

III.6) Biotinylation des protéines de surface

Cette technique permet, suite au marquage des protéines membranaires par la biotine suivi d'une extraction totale, de purifier et de détecter les protéines d'intérêt présentes uniquement au niveau de la membrane plasmique des cellules. En effet, la biotine peut se conjuguer par l'intermédiaire de plusieurs réactions chimiques à différentes cibles, les protéines notamment.

Les cellules cultivées dans les flacons de 75 cm² sont tout d'abord placées sur glace pour y être rincées à 2 reprises avec du PBS-B (PBS contenant 1 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂ et dont le pH est ajusté à 8 avec NaOH). Elles sont ensuite incubées en présence de 0,5 mg/ml de biotine (EZ-link Sulfo-NHS-LC-biotin : dans ce cas la biotine ne traverse pas la membrane

plasmique et le groupement NHS interagit avec les amines (lysines) présentes dans les protéines ; Pierce, Rockford Company, IL) dans le PBS-B, sur glace pendant 1 h. Les cellules sont alors rincées 2 fois avec du PBS-B contenant 100 nM de glycine pour fixer la biotine non-liée aux protéines membranaires. Les protéines de la surface cellulaire sont désormais considérées comme biotinylées et les cellules peuvent subir un dernier rinçage avec du PBS seul avant d'être lysées comme précédemment puis centrifugées à 4°C pendant 10 min à 14 000 x g. Le surnageant est dosé par la méthode BCA et une quantité de protéines (identique pour chaque échantillon) est conservée comme contrôle d'expression des protéines totales. En parallèle, entre 0,5 et 1 mg de protéines sont mises en contact, sur la nuit à 4°C, avec 40 µl de billes streptavidine (ou neutravidine) par échantillon dans le but de purifier les protéines marquées par la biotine étant donné qu'elle possède une affinité très élevée pour l'avidine. Finalement, les billes sont rincées plusieurs fois par du tampon de lyse puis les échantillons sont déposés comme pour une électrophorèse classique (voir §III.2).

IV. Microscopie

IV.1) Microscopie confocale

Les images des cellules vivantes ou fixées observées en fluorescence ont été prises sur un microscope confocal (Zeiss LSM 510). Le microscope est doté d'objectifs à immersion à huile 40x (ouverture numérique : 1,3 ; résolution max à 488 nm : 229 nm) et 60x (ouverture numérique : 1,4 ; résolution max à 488 nm : 212 nm) et est associé à une unité contrôlant deux lasers (Argon et Hélium/Neon). La technique de microscopie confocale offre de nombreux avantages par rapport à la microscopie à fluorescence classique : contrôle de la profondeur de champ, réduction (voire élimination) du bruit de fond, très haute résolution spatio-temporelle. Ces performances sont dues à l'utilisation de filtres spatiaux (« pinholes ») qui éliminent les rayons lumineux émis en dehors du plan focal (Figure 19). Les fluorochromes verts (excitation à 488 nm) sont excités par un laser Argon dont la lumière est transmise à l'échantillon *via* une fibre optique et un miroir dichroïque. Les fluorochromes rouge (excitation 546 nm) sont excités par un laser Hélium/Néon. La fluorescence émise est ensuite reçue au niveau de photomultiplicateurs. Ces signaux sont alors traités grâce à un ordinateur doté d'un logiciel spécifique (AIM 3.2).

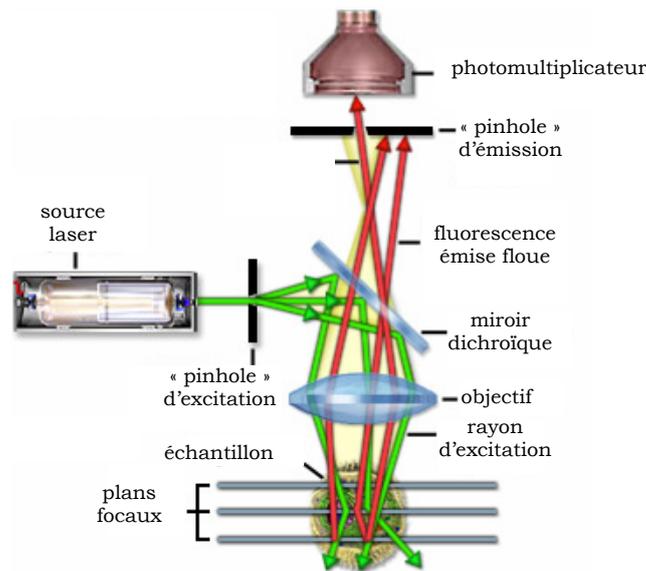


Figure 19. Schéma simplifié du principe du microscope confocal

Le laser est focalisé sur la préparation et seule la zone de focalisation sera suffisamment excitée pour émettre de la fluorescence, le reste de la préparation reste sombre. La fluorescence émise emprunte le même trajet optique mais un **miroir dichroïque** l'empêche de remonter jusqu'à la source laser. Les rayons sont captés par des **photomultiplicateurs** qui détectent l'intensité lumineuse émise. Avant le photomultiplicateur, un diaphragme de rayon (« **pinhole** ») élimine les rayons légèrement hors du plan focal, il diminue la luminosité mais augmente fortement le contraste et la netteté (*d'après : <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>*).

IV.2) Microscopie Electronique à Transmission

Il s'agit d'une technique unique permettant de visualiser des structures cellulaires grâce à un appareil dont la source de rayonnement émet des électrons, ce qui améliore considérablement la résolution.

IV.2.1) Morphologie Ultrastructurale

Les cellules cultivées dans des flacons de 75 cm² sont fixées pendant 15 min sur la glace dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,4 avec 2,5% de glutaraldéhyde, puis rincées 4 fois 5 min dans un tampon cacodylate seul. Elles sont grattées et récupérées dans un tube de type Eppendorf[®] puis centrifugées pendant 3 min à 600 x g. Le culot cellulaire est alors post-fixé pendant 15 min dans du tétroxyde d'osmium 1%, cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,4. Il est ensuite rincé 10 min dans du tampon cacodylate de sodium et contrasté à l'obscurité dans de l'acétate d'uranyle 2% dans l'eau pendant 15 min (coloration « en bloc »). Il est rincé 5 min dans l'eau et déshydraté dans des bains de 10 min

d'acétonitrile/eau dont le rapport est croissant (50/50 ; 70/30 ; 90/10). Enfin, le culot cellulaire est placé dans 3 bains d'acétonitrile de 10 min puis passé dans un mélange de résine Epon[®] et d'acétonitrile (50/50) pendant 2 h puis renouvelé et laissé incubé 1 nuit. Trois bains de 2 h de résine pure sont effectués jusqu'à inclusion définitive. Les échantillons sont mis à l'étuve 70°C durant 3 jours. Grâce à un ultramicrotome (Reichert Ultracut E), des coupes d'environ 90-100 nm sont réalisées et récupérées sur des grilles de cuivre 150 mesh. Leur contraste est augmenté par des bains d'acétate d'uranyle (4 min) et de citrate de plomb (4 min) selon la technique de Reynolds [Reynolds, 1963]. Les coupes sont observées au microscope électronique à transmission (Hitachi H600) à 75 kV (Figure 20).

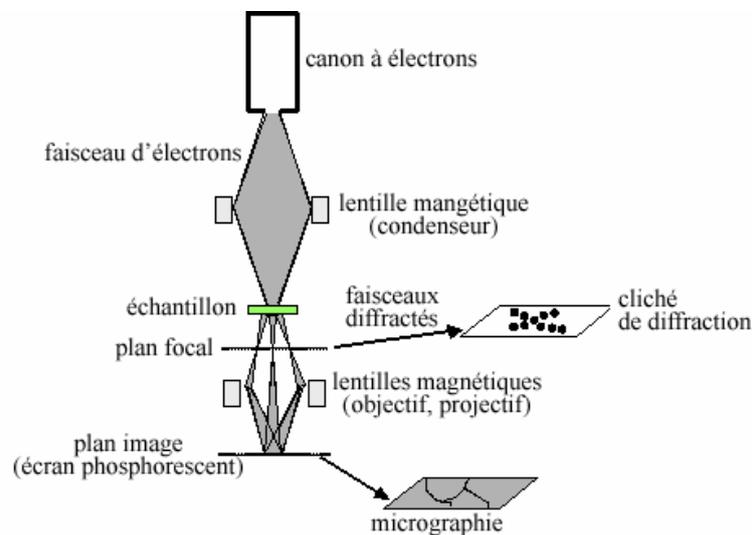


Figure 20. Schéma simplifié du Microscope Electronique à Transmission (MET), du parcours des électrons et leurs interaction avec l'échantillon

Les **électrons**, formés au niveau du **canon**, sont concentrés en un **faisceau fin et cohérent** grâce au **condenseur**. Les électrons incidents sont totalement arrêtés, déviés et ralentis ou bien transmis au contact avec l'échantillon. L'**objectif** permet de **focaliser** le faisceau d'électrons sur l'objet (la mise au point) et le **projectif**, lentille de grossissement, permet de projeter et d'agrandir l'image. L'**écran d'observation** est recouvert d'une substance phosphorescente qui, sous l'impact avec les électrons (non visibles à l'œil nu) émet des photons. Ainsi, les électrons arrêtés par l'échantillon sont traduits en zones sombres et ceux transmis en zones claires (*inspirée de www.technosciences.com*).

IV.2.2) Membranes arrachées

Afin de visualiser les complexes protéiques associés avec le côté cytoplasmique de la membrane plasmique, la technique d'arrachement des membranes des cellules a été utilisée [Sanan *et al.*, 1991 ; Lamaze *et al.*, 2001]. Pour la préparation des supports d'échantillons, des grilles de cuivre 150 mesh membranées (Formvar[®]) (selon [Tokuyasu, 1973]) sont traitées

avec 1 mg/ml de polylysine (Sigma) pendant 15-30 min. Elles sont ensuite rincées 4 fois à l'eau pendant 1 min et laissées sécher à l'air libre à l'abri des poussières. Les cellules sont cultivées dans des boîtes contenant des lamelles de verre de 14 mm de diamètre préalablement traitées avec 9 µl de collagène de type I (queue de rat, UPSTATE) à 4,14 mg/ml dilués dans 2 ml de PBS pendant 15 min. Les grilles sont positionnées sur du parafilm, côté traité polylysine au dessus puis les lamelles de cellules, préalablement rincées au PBS, sont placées (côté cellules) sur les grilles (Figure 21). Un papier filtre est placé sur la lamelle retournée et, à l'aide d'un bouchon en caoutchouc, une légère pression est appliquée pendant 5 secondes. Les lamelles sont ensuite retournées et une goutte de PBS est déposée pour favoriser le flottement des grilles.

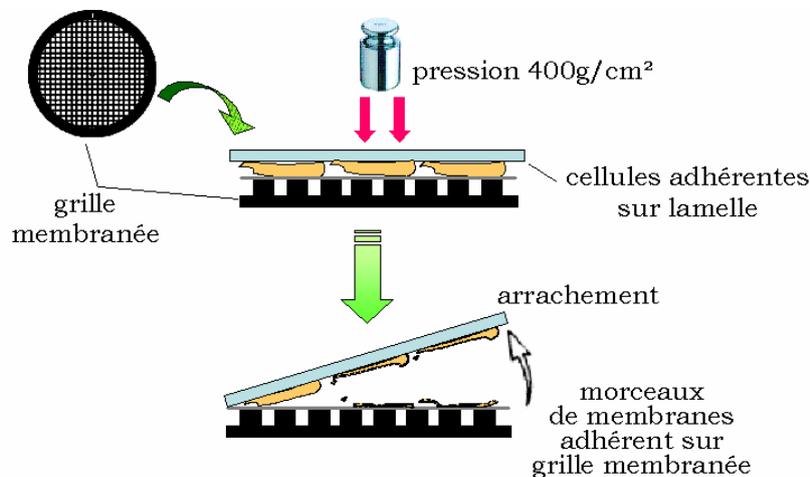


Figure 21. Représentation schématique du protocole de préparation des « membranes arrachées »

Les lamelles sur lesquelles adhèrent les cellules sont posées sur les grilles membranées (Formvar[®]) et traitées à la polylysine. Une légère pression est exercée puis la lamelle est soulevée. Sur la grille restent des morceaux de membrane avec le côté cytoplasmique exposé au dessus (*inspirée de [Sanan et al., 1991]*).

Une fois les grilles récupérées, elles sont fixées pendant 30 min dans du paraformaldéhyde (PAF) dilué à 8% dans du PBS, à température ambiante. Trois rinçages successifs au PBS suivent, avant la saturation des échantillons dans du PBS complété de 25 mM de glycine et de sérum d'âne pendant 30 min. L'immunolocalisation s'effectue selon le protocole classique en utilisant les anticorps primaires d'intérêt, puis les anticorps secondaires couplés à des billes d'or de 6, 12 ou 18 nm dilués dans du PBS gélatine, et incubés pendant 1 h à 37°C. Les grilles sont rincées 3 fois 5 min dans du PBS, puis 2 fois 1

min dans l'eau. Un bain de méthylcellulose pendant 4 min est ensuite effectué pour enrober les coupes. Le contraste est augmenté dans un bain contenant 25% d'acétate d'uranyle dans la méthylcellulose [Griffiths *et al.*, 1983]. Ces deux étapes d'inclusion et de coloration des coupes sont effectuées sur glace et à l'obscurité. Les coupes sont finalement observées au microscope électronique (Hitachi H600) à 75 kV.

IV.2.3) Immunolocalisation Ultrastructurale

Les cellules cultivées dans des flacons de 75 cm² sont fixées pendant 30 min à température ambiante dans du PAF dilué à 4% dans du PBS pendant 1 h à température ambiante puis avec du PAF 8% pendant la nuit à 4°C. Elles sont ensuite rincées 3 fois 5 min dans du PBS, puis grattées et récupérées dans un tube Eppendorf[®]. 500 µl de PBS sont rajoutés et le tout est mis dans un bain-marie préalablement chauffé à 37°C. Un volume égal de gélatine 20% est rajouté (toujours chauffé au bain-marie) en homogénéisant. Il s'ensuit une centrifugation de 1 min puis une de 2 min à 14 000 x g à 40°C. Les tubes sont refroidis en centrifugeant à 2 400 x g à 4°C. Les échantillons sont conservés à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, le culot est inclus dans un mélange de 2,3 M de saccharose et du polyvinylpyrrolidone (PVP). Le saccharose joue le rôle d'un cryoprotecteur pour empêcher la formation de cristaux tandis que le PVP est un plastifiant permettant de rendre les coupes moins cassantes. Les échantillons peuvent être conservés ainsi au frais pendant plusieurs jours. La congélation des échantillons est effectuée dans l'azote pâteux. Des coupes de 90-100 nm sont effectuées en utilisant un cryo-ultramicrotome (Reichert Ultracut E muni d'une chambre FC4 à refroidissement par azote liquide) et sont récupérées sur des grilles membranées de cuivre 150 mesh (Formvar[®]) [Tokuyasu, 1973]. Les grilles sont rincées 3 fois 5 min dans du PBS avant la saturation des échantillons dans du PBS complété de 25 mM de glycine et de sérum d'âne pendant 30 min. L'immunolocalisation est effectuée comme expliqué précédemment (*cf.* § IV.2.2). Après le contraste, les coupes sont observées au microscope électronique (Hitachi H600) à 75 kV.

IV.3.) Imagerie Calcique

IV.3.1) La sonde fura-2/AM

Il s'agit d'une sonde calcique dérivée du fluorophore stilbène possédant quatre fonctions carboxyles dont l'arrangement spatial octacoordonné est caractéristique des

chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA [Grynkiewicz *et al.*, 1985]. Le fura-2 (Molecular Probes) existe sous deux formes :

-Une forme libre, hydrophile et chargée sous forme d'anion, le fura-2 acide dont la fluorescence est dépendante de la concentration en calcium libre. Son affinité pour le calcium est importante ($K_D=225$ nM).

-Une forme estérifiée, perméante et non chargée, l'acétoxy méthylester de fura-2 (fura-2/AM). Le fura-2/AM traverse la membrane cytoplasmique et pénètre dans la cellule où il est clivé par des estérases, ce qui libère le fura-2 sous sa forme acide.

IV.3.2) Caractéristiques spectrales du fura-2/AM

Le fura-2 est un indicateur fluorescent à double longueur d'ondes d'excitation et simple longueur d'onde d'émission (Figure 22A). Ainsi, le fura-2 libre de calcium possède une longueur d'onde d'excitation maximale à 380 nm, alors que complexé au calcium il a une longueur d'onde d'excitation maximale de 340 nm. Dans les deux cas, la longueur d'onde d'émission est de 510 nm. Une augmentation de la concentration en calcium cytosolique se caractérise donc par une diminution de la fluorescence émise lors d'une excitation à 380 nm et par une augmentation lors d'une excitation à 340 nm.

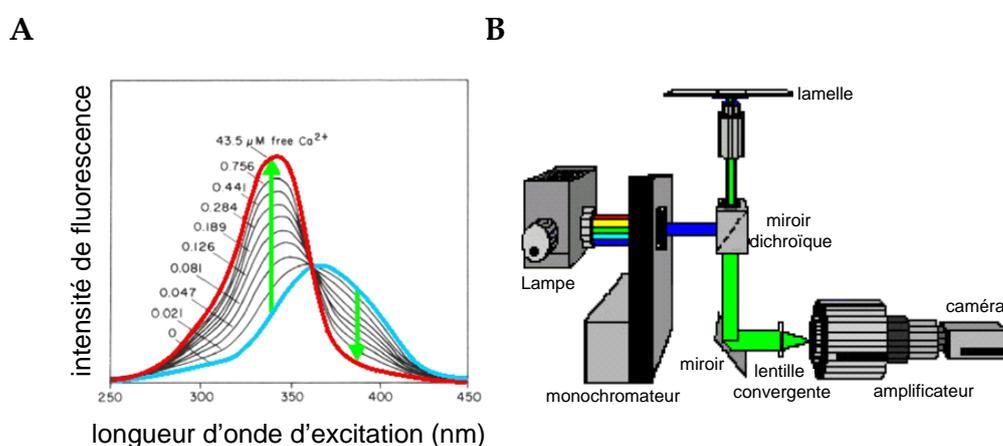


Figure 22. Imagerie calcique avec le fura-2

A : spectre d'excitation du fura-2 dans des solutions contenant de 0 à 43.5 μM de Ca^{2+} libre (d'après <http://www.bphys.uni-linz.ac.at>). **B** : schéma simplifié d'un poste d'imagerie.

Les images sont collectées toutes les 2 secondes et les signaux de fond à 340 et 380 nm sont recueillis avec la même fréquence et soustraits des images fluorescentes respectives. Les résultats ($\Delta R/R$) sont exprimés comme les ratios entre les signaux fluorescents à 340 et

380 nm mesurés lors d'une réponse, divisés par le ratio enregistré lors des conditions contrôles. $\Delta R/R$ est utilisé pour évaluer l'amplitude de l'entrée calcique et des réponses calciques induites par les différents traitements dans les cellules.

IV.3.3) Charge des cellules avec le fura-2/AM

Les cellules DU145 sont chargées avec du fura-2/AM à 4 $\mu\text{mol/L}$ pendant 45 min à 37°C dans du milieu de culture puis rincées pour éliminer toute trace de sonde non incorporée, avec la solution d'enregistrement contenant (mmol/L) : NaCl, 116; KCl, 5,6; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1,2; NaHCO₃, 5; NaH₂PO₄, 1; HEPES, 20; pH 7,3. Chaque cellule présente alors une charge relativement homogène indiquant ainsi que le fura-2 ne pénètre pas uniquement dans les organites intracellulaires connus pour stocker le calcium (réticulum endoplasmique, mitochondries, membrane nucléaire).

IV.3.4) L'équipement optique

Les cellules sont continuellement perfusées et maintenues à 37°C dans une boîte à température contrôlée, posée au-dessus d'un objectif x40 chauffé à épifluorescence à huile (Bioptechs, Butler, PA, USA) ainsi qu'un régulateur de température de perfusion PTR 200 (ALA Scientific Instruments, Westbury, NY, USA). La lumière d'excitation est fournie par une lampe à arc haute pression xénon de 100 W et les longueurs d'ondes 340 et 380 nm sont sélectionnées par un monochromateur (Cairn Research Ltd, Faversham, Kent, UK). Les images fluorescentes sont recueillies par une caméra Sensicam QE CCD (PCO Computer Optics GmbH, Kelheim, Germany), numérisées et coordonnées en temps réel par un processeur d'images (Metafluor, Princeton, NJ, USA) (Figure 22B).

V. Mesure de la viabilité, de l'apoptose et du cycle cellulaire

V.1) Test de viabilité

La méthode colorimétrique utilisée (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, France) détermine le nombre de cellules viables. Le kit de dosage est composé du MTS (sel de tétrazolium) et du PMS (phénazine méthosulfate). Le MTS est réduit par les cellules métaboliquement actives en formazan, soluble dans du PBS, par l'intermédiaire de déshydrogénases. La quantité de formazan produite, mesurée par son absorbance à 490 nm, est donc directement proportionnelle au nombre de cellules viables en

culture. Pour des cellules cultivées dans une plaque 24 puits, il convient d'enlever le milieu de culture avant de déposer dans chacun des puits 400 µl du réactif préparé de la façon suivante : ajouter 1,9 ml de MTS à 2 mg/ml et 100 µl de PMS à 0,92 mg/ml pour 10 ml de PBS. La réaction s'effectue pendant 2 h à l'obscurité dans l'étuve avant de mesurer l'absorbance par un lecteur de plaque (Dinex Technologies MR*422, Thermolabsystems, France). Lorsque l'apoptose est stable entre les différentes conditions, ce kit permet d'estimer la prolifération cellulaire si des mesures sont effectuées jour après jour.

V.2) Test d'apoptose : coloration au Hœchst

Une des méthodes permettant de mesurer l'apoptose est la technique de coloration au Hœchst. Le bisbenzimidazole (Hœchst 33528, Sigma, L'Isle d'Abeau, France) est un agent intercalant de l'ADN qui permet la visualisation de la chromatine en microscopie à fluorescence. Après avoir pris soin de préserver les surnageants, afin de prendre en considération les cellules « flottantes » (apoptose provoquée ou provoquant le décollement ou anoïkis), les cellules encore adhérentes sont trypsinisées. L'ensemble est homogénéisé puis centrifugé afin d'être déposé sur une lame par force centrifuge (Cytospin3, Shambon, France). Les cellules sont alors fixées par un bain de méthanol à -20°C pendant 15 min puis elles sont incubées 20 min à l'obscurité et à température ambiante dans du PBS contenant 4 µg/ml de Hœchst. Après lavage au PBS, les lames sont surmontées d'une lamelle avant d'être observées au microscope à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) à la longueur d'onde d'excitation de 435 nm. Il est ainsi possible de distinguer les différentes figures apoptotiques (condensation périnucléaire, hypercondensation chromatinienne, vésicules apoptotiques) et toutes sont prises en compte pour le comptage. Celui-ci nécessite plus de 500 cellules et doit être répété au moins 3 fois par condition. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de cellules présentant une figure apoptotique sur le nombre total de cellules comptées.

V.3) Cycle cellulaire

Il est également possible de quantifier l'apoptose par la technique de cytométrie de flux en se référant à la proportion des cellules se trouvant sous la phase G0/G1 c'est-à-dire en « sub-G1 ». La cytométrie de flux permet la mesure de paramètres cellulaires (taille, granularité par exemple) suite au passage des cellules devant un faisceau laser. L'étude du cycle cellulaire est possible grâce à l'incorporation, au niveau de l'ADN des cellules, de fluorochromes qui émettront une fluorescence suite à l'excitation par le laser. Les mesures sont effectuées très rapidement, en général plusieurs milliers de cellules à la seconde. Cette

technique offre une méthodologie rapide et simple à mettre en œuvre pour suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues. Les cellules, à raison de 3 flacons de 25 cm² par condition, sont récoltées (cellules flottantes et cellules adhérentes après trypsinisation) et elles sont bien homogénéisées avant d'être centrifugées 5 min à 300 x g. Le culot cellulaire est suspendu dans 2 ml de PBS, les cellules sont comptées pour ne conserver qu'un million de cellules par condition. Elles sont lavées avec 2 ml de PBS et centrifugées pendant 5 min à 300 x g. Ensuite, elles sont suspendues dans 200 µl de PBS avant d'ajouter 1 ml d'éthanol 70% glacé (-20°C). L'homogénéisation dans chacune de ces étapes est nécessaire pour la bonne dissociation des cellules. Un lavage au PBS précède alors une incubation de 15 min en présence de 2 µg/ml de RNase dans du PBS. L'étape suivante consiste en un marquage par 25 µg/ml d'iodure de propidium (IP, fluorochrome qui s'intercale entre les bases de la double hélice de la molécule d'ADN) dans du PBS-Triton X-100 0,1%, pendant 30 min minimum à température ambiante et à l'obscurité. La distribution du cycle cellulaire (entre les différentes phases : sub-G1 correspondant à l'apoptose, G0/G1, S et G2/M) est mesurée à 520 nm après excitation à 488 nm par un cytomètre de flux (Beckman coulter Epics XL4-MCL) couplé à un logiciel d'acquisition Expo32. La réinterprétation des données est réalisée sur Multicycle for Windows (Phoenix Flow system). Ce travail est effectué en collaboration externe avec Nathalie Jouy de l'IFR 114 (Lille, France).

VI. Analyse des données

Les données sont analysées avec le logiciel Origin (Microcal Software Inc, Northampton, MA, USA). Les tests statistiques sont réalisés par le t-test (pour comparer 2 groupes indépendants) ou par une analyse de variance (ANOVA=*Analysis Of Variance*) suivie d'un post-test de Student-Newman-Keuls (pour des comparaisons par paires) ou de Dunnett (pour comparer un contrôle avec plusieurs autres conditions) grâce au logiciel GraphPad InStatTM (GraphPad Software, V2.04). Les différences sont considérées comme significatives avec des seuils de : p<0,05 : * ; p<0,01 : ** ; p<0,001 : ***. Les résultats sont exprimés par les moyennes représentées avec les erreurs standard à la moyenne (sem).

RESULTATS

Résultats préalables

I) Existe-t-il une association entre le récepteur α_{1A} -AR et le canal TRPC6 au sein des cavéoles des cellules DU145 ?

La cascade de signalisation liant le RCPG et l'augmentation du taux de Ca^{2+} cytosolique a été méticuleusement étudiée [Berridge, 1993]. L'hydrolyse des PIP_2 membranaires, dépendante de la PLC et résultant de l'activation du récepteur, donne naissance à deux seconds messagers : l' IP_3 qui induit la libération du Ca^{2+} du RE *via* les IP_3R et le DAG qui lui active la PKC. Dans certains types de cellules, la déplétion des stocks calciques intracellulaires active un influx Ca^{2+} par une voie dite « capacitive » *via* des canaux « SOC » (Store-Operated Channels) [Putney, 2005 ; Parekh *et al.*, 2005].

Il y a de plus en plus de données sur l'existence de voies d'entrée calcique indépendantes de la déplétion des stocks calciques, impliquant des seconds messagers tels que le DAG, la PKC, l'acide arachidonique pour en nommer certains [Fasolato *et al.*, 1994]. Il a été démontré que les protéines de la sous-famille des TRPC (Transient Receptor Potential Canonical) forment des canaux cationiques (ROC, Receptor-Operated Channel) perméables aux ions Ca^{2+} , activés suite à la stimulation de RCPG [Hofmann *et al.*, 2000 ; Minke *et al.*, 2002]. Le canal TRPC6 est un des candidats impliqués dans ce type d'entrée calcique [Jung *et al.*, 2002 ; Hofmann *et al.*, 1999]. A ce propos, TRPC6 a été initialement identifié en tant que candidat moléculaire responsable de l'entrée calcique induite par la stimulation du récepteur adrénergique α_1 des myocytes de vaisseaux sanguins [Inoue *et al.*, 2001]. Dans le cas des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses, il a été démontré que la stimulation du α_{1A} -AR accroît la prolifération des cellules et ce suite à l'activation des voies de signalisation déclenchée par l'entrée calcique *via* TRPC6 [Thebault *et al.*, 2003 ; Thebault *et al.*, 2006].

Plusieurs travaux novateurs décrivent que les protéines TRPC sont assemblées au sein de complexes multiprotéiques contenant diverses protéines de la signalisation calcique [Ambudkar, 2004 ; Ambudkar, 2006 ; Pani *et al.*, 2008]. Ces assemblages pourraient se trouver organisés dans des « rafts » lipidiques de type cavéoles. D'ailleurs, la cavéoline-1 serait indispensable pour l'assemblage des complexes multiprotéiques contenant TRPC1 et TRPC3 et pour l'entrée calcique *via* ces canaux dans les cellules des glandes submandibulaires par exemple (pour revue [Ambudkar *et al.*, 2004]). Il est proposé que cette localisation privilégiée faciliterait les interactions entre les canaux TRPC et leurs protéines associées (Figure 23).

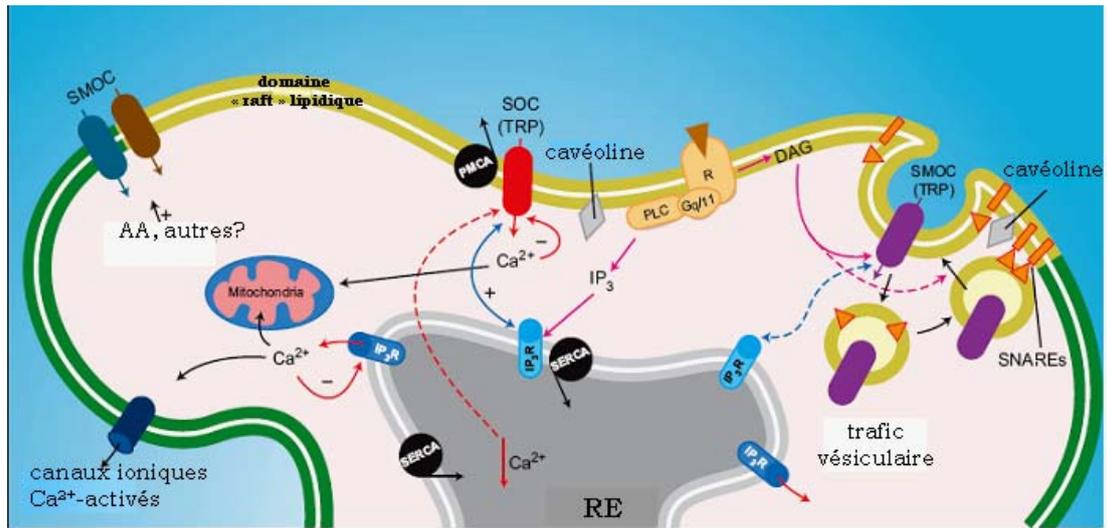


Figure 23. Mécanismes d'entrée calcique et microdomaines de la signalisation calcique

Assemblage d'un complexe de signalisation calcique comprenant récepteurs, protéines G, PLC et TRP, au sein de microdomaines lipidiques (« raft » ou cavéole, en jaune) de la membrane plasmique (en vert). La localisation de ce complexe protéique à proximité des partenaires cytoplasmiques (RE, mitochondrie) contribue de façon importante à l'ensemble de ces mécanismes (*d'après* [Ambudkar, 2004]).

J'ai cherché, tout d'abord, à déterminer la localisation membranaire de TRPC6 et du α_{1A} -AR au sein des cellules épithéliales cancéreuses prostatiques DU145 et j'ai tenté de démontrer que ces deux protéines sont localisées dans des cavéoles.

Le protocole de purification des fractions DRM des cellules DU145 a été utilisé dans un premier temps afin de localiser TRPC6 au niveau des microdomaines membranaires. Mes résultats en Dot-blot montrent que TRPC6 est localisé dans les fractions de faible densité 2-5 correspondant aux gradients 5%-20% (Figure 24A). Dans le même type de fractions sont localisés le α_{1A} -AR et la cav-1. Il est important de souligner que ces résultats biochimiques ne suffisent pas pour prouver la localisation cavéolaire de TRPC6 dans les cellules. TRPC6 et cav-1 peuvent simplement être présents dans des microdomaines de composition lipidique similaire, donc de même densité. D'autres techniques sont alors nécessaires pour déterminer si TRPC6 est colocalisé avec la cav-1. La technique de « membranes arrachées » (Matériels et Méthodes §IV.2.2) suivie d'immunomarquage a été utilisée afin d'étudier la topologie membranaire de TRPC6 (Figure 24B). Dans les conditions contrôles, j'ai observé un marquage distinct entre la cav-1 (billes d'or de 18 nm) et TRPC6 (billes d'or de 6 nm) qui semble former des rassemblements de plusieurs protéines (Figure 24B, a). J'ai ensuite stimulé

le α_{1A} -AR pendant 10 minutes avec un agoniste, la phényléphrine (PHE), dans le but de savoir si une stimulation du récepteur pouvait favoriser la formation d'un complexe riche en TRPC6 associé à la cav-1. La stimulation du α_{1A} -AR ne semble pas rassembler les protéines TRPC6 au sein de cavéoles (Figure 24B, b). Par ailleurs, j'ai observé de façon systématique un nombre plus important de microdomaines enrichis en cav-1 suite à la stimulation du récepteur (Figure 24B, b, flèches noires).

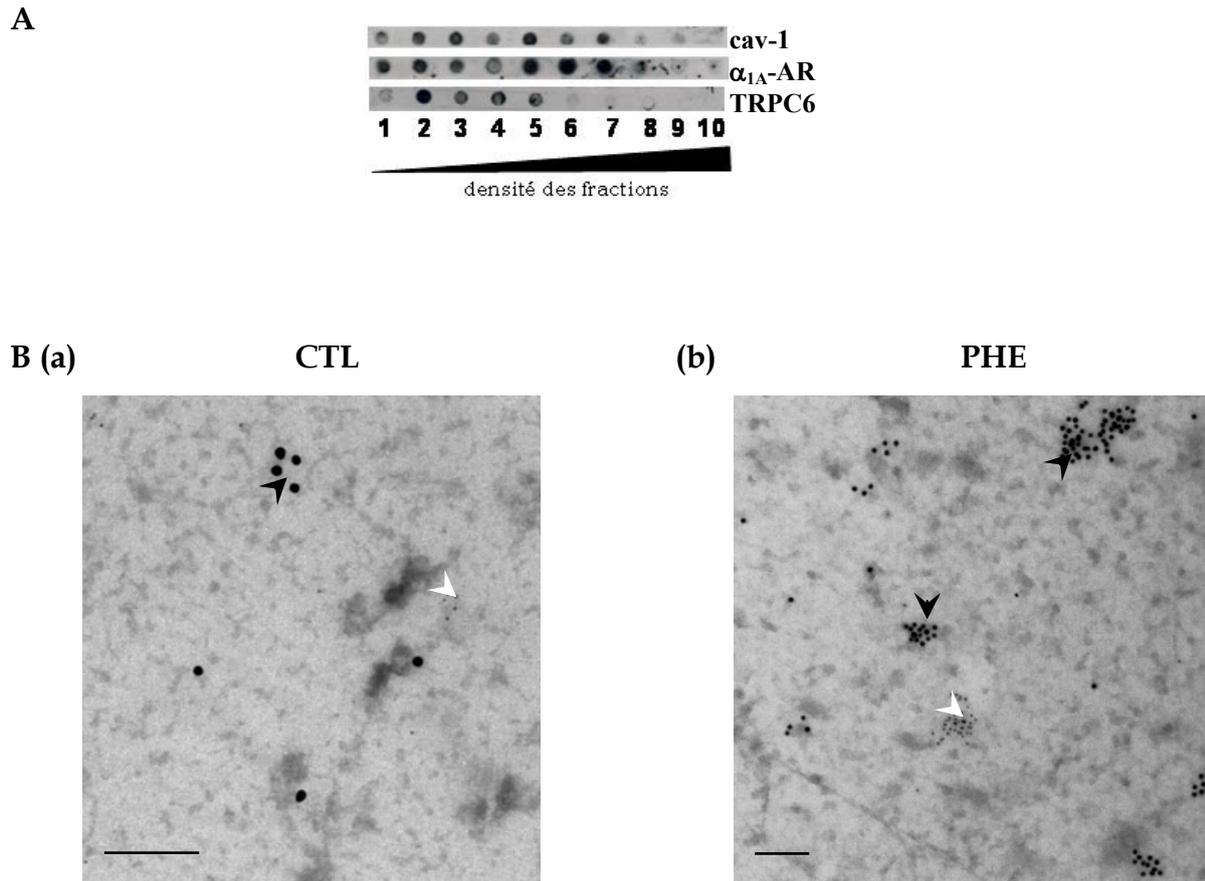


Figure 24. Localisation membranaire de TRPC6 et de cav-1 des cellules DU145

- A. Dot-blot des fractions membranaires purifiées des DU145, de densité croissante de la fraction 1 à la fraction 10.
- B. Micrographies représentatives (a) d'une cellule non traitée, cav-1 marquée avec des billes d'or de 18 nm (flèche noire) et TRPC6 avec des billes d'or de 6 nm (flèche blanche). Barre = 200 nm. (b) Cellule traitée avec PHE à 10 μ M pendant 10 min, cav-1 marquée avec des billes d'or de 12 nm (flèche noire) et TRPC6 avec des billes d'or de 6 nm (flèche blanche). Barre = 150 nm.

Parallèlement à l'étude de la localisation de TRPC6 au sein de cavéoles, j'ai exploré le couplage fonctionnel entre α_{1A} -AR et TRPC6 dans les cellules DU145. Grâce à la technique d'imagerie calcique et l'utilisation de la sonde ratiométrique Fura-2/AM (Figure 25A) (voir

Matériels et Méthodes, §IV.3) j'ai mesuré les variations de la concentration calcique intracellulaire des cellules DU145 suite à une stimulation par la PHE.

La stimulation des cellules DU145 par la PHE n'induit ni de vidange calcique réticulaire ni d'entrée calcique (Figure 25A, tracé vert). J'ai alors transfecté transitoirement des cellules DU145 par le α_{1A} -AR. La PHE à 10 μ M induit dans ces cellules une vidange calcique puis un influx calcique lors du protocole d'enregistrement (Figure 25A, tracé rose). Ce type de réponse a d'ailleurs été observé sur d'autres modèles cellulaires exprimant de façon endogène le α_{1A} -AR, tels que les hépatocytes humains Huh-7 (observation personnelle). En revanche, je n'ai observé aucune variation calcique intracellulaire après la surexpression transitoire de TRPC6 (Figure 25A, tracé gris). Il est important à noter que l'étude de l'entrée calcique induite par la PHE a été confirmée, en collaboration interne, par la technique électrophysiologique de patch-clamp et l'imagerie calcique en microscopie confocale. De nouveau, aucune entrée calcique n'a été enregistrée dans les cellules DU145 avec ces techniques (résultats non montrés).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats est en faveur de l'absence d'un couplage fonctionnel entre α_{1A} -AR et TRPC6 au sein de cavéoles des cellules DU145.

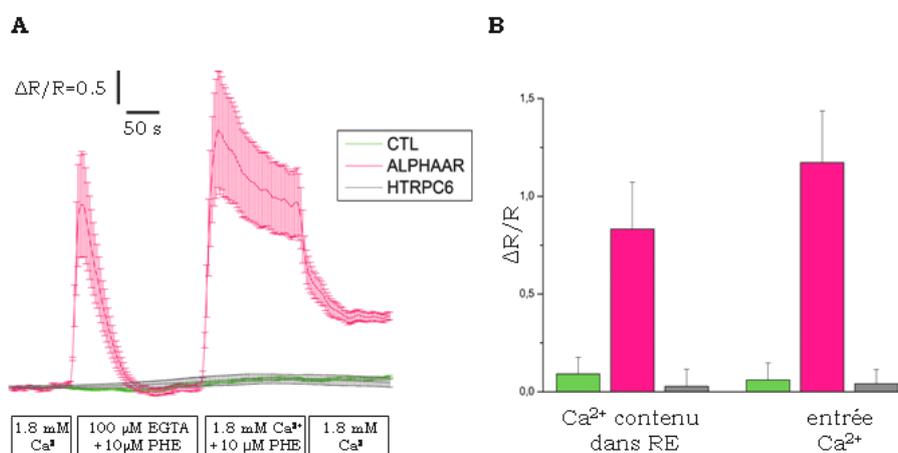


Figure 25. Variation de la concentration calcique cytosolique suite à la stimulation par la phényléphrine.

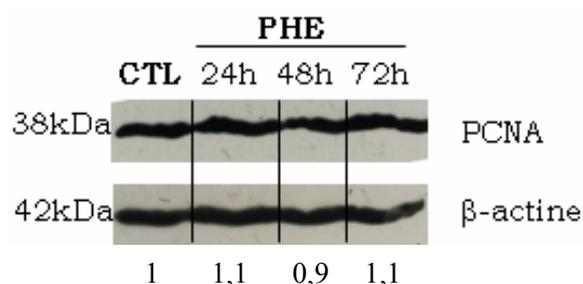
- A. La stimulation des cellules surexprimant le récepteur adrénergique α_{1A} (rose) par 10 μ M de phényléphrine (PHE), en absence de Ca^{2+} extracellulaire (EGTA), entraîne une vidange calcique réticulaire. Par la suite, une seconde stimulation par 10 μ M de PHE en présence cette fois-ci de 1,8 mM de Ca^{2+} extracellulaire induit une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} due à un influx calcique. La PHE ne provoque aucune entrée calcique ni dans les cellules contrôles (CTL, vert) ni dans les cellules surexprimant le canal TRPC6 (HTRPC6, gris).
- B. Histogrammes représentant la vidange des stocks calciques réticulaires ainsi que l'influx calcique dans les cellules CTL (vert), surexprimant α_{1A} -AR (rose) ou hTRPC6 (gris). Les erreurs standard à la moyenne (sem) y sont représentées ; (n=100).

II) Le α_{1A} -AR joue-t-il un rôle dans la prolifération des cellules androgéno-indépendantes DU145 ?

Les travaux précédents du laboratoire ont démontré que la stimulation du α_{1A} -AR par un agoniste pendant 2 jours accroît la prolifération des cellules primaires prostatiques épithéliales cancéreuses humaines [Thebault *et al.*, 2006]. L'entrée calcique *via* le canal TRPC6 qui résulte de la stimulation du α_{1A} -AR est nécessaire pour activer le NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) et TRPC6 est ainsi proposé comme nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer de la prostate [Thebault *et al.*, 2006]. De nombreuses données montrent l'implication des RCPG et leur signalisation dans la croissance tumorale de la prostate [Daaka, 2004], il est donc indispensable de mieux comprendre le rôle du α_{1A} -AR dans les cellules androgéno-indépendantes.

J'ai alors étudié l'effet de la PHE sur la prolifération des cellules androgéno-indépendantes DU145. Pour cela, j'ai utilisé le kit colorimétrique de prolifération cellulaire MTS (voir Matériels et Méthodes, §V.1) pour des traitements de 24h, 48h et 72h. Il est important de noter que le temps de doublement des cellules DU145 (d'après l'ATCC) est de 24h. En parallèle, j'ai cherché par Western-blot d'éventuelles variations d'expression de la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Polypeptide nucléaire à fonction de co-facteur de l'ADN polymérase, la protéine PCNA participe à la synthèse et la réparation de l'ADN [Paunesku *et al.*, 2001]. Cette protéine est essentiellement exprimée lors des phases G₁ et S du cycle cellulaire, l'étude de son expression peut être utilisée en tant que marqueur fiable des cellules en prolifération [Suzuki *et al.*, 1992]. Je n'ai observé aucune variation de l'expression de PCNA après 24h, 48h ou 72h de traitement par la PHE (Figure 26A). De plus, aucune différence significative du pourcentage de survie cellulaire n'a été détectée entre les conditions contrôles et traitées par la PHE et cela quelque soit la durée du traitement (Figure 26B).

A



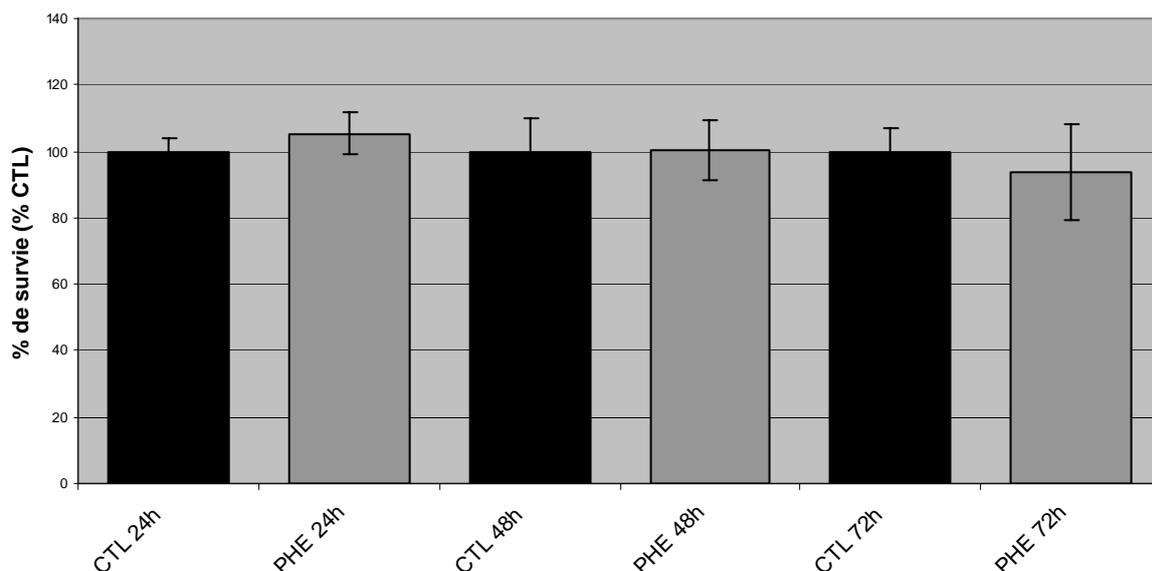
B

Figure 26. Effet de la PHE dans la prolifération des cellules DU145

- A. Expression de la protéine PCNA (38 kD) dans les cellules contrôles (CTL) et traitées pendant 24h, 48h et 72h avec la PHE à 10 μ M. Le taux de PCNA dans chaque échantillon est normalisé par rapport à celui de l'actine (42 kD). Les ratios sont représentés sous le Western-blot.
- B. Pourcentage de survie dans les conditions contrôles (CTL, colonnes noires) respectivement par rapport aux traitements de 24h, 48h et 72h de PHE (colonnes grises). Y sont représentées les erreurs standard à la moyenne (sem) de 4 expériences.

N'ayant pas mis en évidence l'implication du α_{1A} -AR dans la prolifération des cellules DU145, je me suis engagée à rechercher d'autres fonctions du α_{1A} -AR dans ces cellules androgéno-indépendantes. L'étude de l'expression de diverses protéines suite au traitement des cellules DU145 par la PHE a été révélatrice. En effet, la PHE à 10 μ M pendant 24h et 72h induit une augmentation respective de 50% et de 130% du taux de Bcl-2, comparé aux cellules non traitées (Figure 27A). De même, les quantités de Bcl-x_L sont augmentées de 100% et 200% après 24h et 72h respectivement de traitement des cellules DU145 par la PHE (Figure 27B).

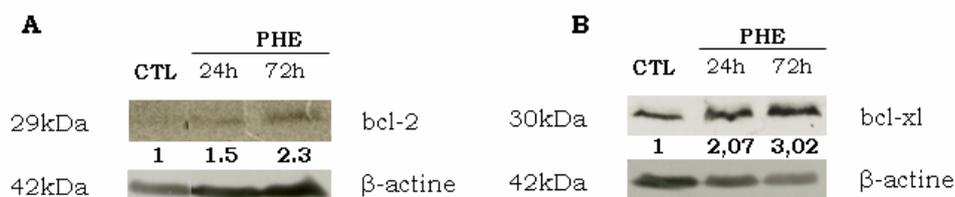


Figure 27. Western-blot de l'expression de Bcl-2 et Bcl-x_L dans les cellules DU145

- A. Expression de Bcl-2 dans les cellules non traitées (CTL) et traitées par la phényléphrine (PHE) 10 μ M pendant 24h et 72h. Les taux de Bcl-2 sont normalisés par rapport à l'actine.
- B. Expression de Bcl-x_L dans les cellules non traitées (CTL) et traitées par la PHE 10 μ M pendant 24h et 72h. Les taux de Bcl-x_L sont normalisés par rapport à l'actine.

Ces deux protéines appartiennent à la grande famille des protéines Bcl-2 impliquées dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose et composée de membres pro- et anti-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L empêchent l'apoptose soit en séquestrant les caspases soit en empêchant la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux tels que le cytochrome C et l'AIF (*Apoptosis-Induced Factor*) dans le cytoplasme [Tsujiimoto *et al.*, 2000]. La surexpression de protéines de la famille Bcl-2 survient dans une grande variété de cancers humains et contribue à l'expansion néoplasique. La survie cellulaire est ainsi prolongée par la suppression de mécanismes maintenant l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose [Reed, 1994 ; Reed, 1995 ; Rong *et al.*, 2008].

Des travaux précédents démontrent que la progression du cancer prostatique humain vers un état androgéno-indépendant et/ou métastatique est associée à une surexpression, entre autres, des protéines Bcl-2 et Bcl-x_L [Furuya *et al.*, 1996 ; Krajewska *et al.*, 1996 ; McDonnell *et al.*, 1992]. D'ailleurs, des analyses immunohistochimiques des carcinomes prostatiques ont démontré que Bcl-x_L est plus abondamment exprimé dans les cancers d'un score de Gleason élevé et associé de façon significative à l'échappement hormonal. Ces données font de cette protéine un candidat supplémentaire pouvant contribuer à la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques [Castilla *et al.*, 2006].

**“Caveolae contribute to the apoptosis resistance induced by the α_{1A} -adrenoceptor
in prostate cancer cells”**

KATSOGIANNOU Maria, EL BOUSTANY Charbel, GACKIERE Florian, DELCOURT Philippe, ATHIAS Anne, DEWAILLY Etienne, MARIOT Pascal, JOUY Nathalie, LAMAZE Christophe, MAUROY Brigitte, PREVARSKAYA Natalia and SLOMIANNY Christian

En revision pour publication dans PLoS ONE

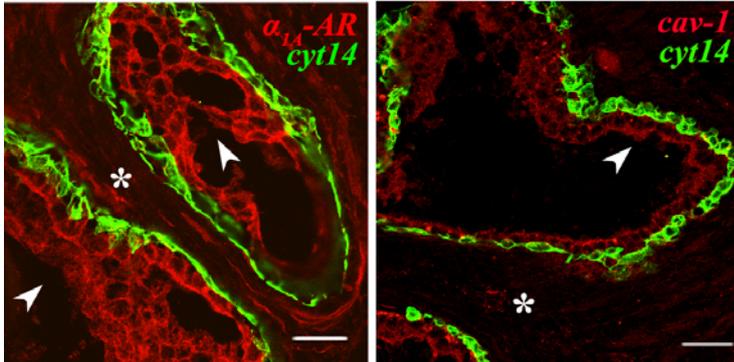
Une meilleure compréhension des voies associées au développement et à la progression du cancer prostatique androgéno-indépendant s'avère fondamentale pour espérer un meilleur contrôle thérapeutique ou préventif. De plus en plus de données sont en faveur de l'implication des récepteurs couplés aux protéines G et de leurs ligands dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate [Daaka, 2004 ; Bookout et al., 2003]. Dans ce travail, nous mettons en évidence la participation du récepteur adrénérgique α_{1A} (α_{1A} -AR), via les cavéoles membranaires des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes DU145, dans la résistance à l'apoptose induite par la thapsigargine. Nous démontrons que les niveaux d'expression du α_{1A} -AR sont élevés dans les tissus prostatiques cancéreux de stade avancé par rapport aux tissus normaux ou hyperplasiques.

J'ai ainsi démontré, par une approche biochimique, que le α_{1A} -AR est présent dans des fractions membranaires de faible densité correspondant à des microdomaines lipidiques. Des études d'immunolocalisation ultrastructurale en microscopie électronique ont ensuite permis de colocaliser le α_{1A} -AR avec la cavéoline-1 (cav-1), constituant majeur des cavéoles.

Afin d'étudier l'implication de ces structures membranaires dans les premières étapes de la signalisation du α_{1A} -AR, nous avons exploré les effets de la stimulation du récepteur par un agoniste, la phényléphrine, sur la distribution membranaire du récepteur et de sa protéine $G_{\alpha q}$ associée. De plus, l'étude de la composition lipidique des fractions DRM ainsi que les observations de la morphologie membranaire suite à la stimulation du α_{1A} -AR ont permis de suggérer un mécanisme de formation des structures cavéolaires par rassemblement des cav-1 et des molécules impliquées dans la voie de signalisation du α_{1A} -AR.

Nous avons donc démontré que la stimulation du α_{1A} -AR des cellules DU145 par la phényléphrine induit, à long terme, des effets de résistance à l'apoptose induite par un stress réticulaire. Il est démontré que les cavéoles sont indispensables à ce processus.

Enfin, une corrélation positive a été établie entre l'expression du α_{1A} -AR et de la cav-1 des cellules épithéliales luminales et le stade avancé du cancer de la prostate. Des données supplémentaires présentées avant l'article confirment la présence du α_{1A} -AR et de la cav-1 dans les cellules épithéliales luminales et au contraire leur absence dans les cellules épithéliales basales. L'ensemble de ces travaux propose la participation du α_{1A} -AR dans les mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules androgéno-indépendantes, certainement en synergie avec d'autres facteurs présents dans le microenvironnement de ces cellules.

Données supplémentaires :

Localisation du α_{1A} -AR (à gauche) et de la cav-1 (à droite) en rouge au niveau des cellules épithéliales bordant la lumière des acini prostatiques (flèches blanches) et du stroma (astérisque). Dans les deux cas, les cellules épithéliales basales sont « spécifiquement » marquées à la cytokératine 14 (cyt14) en vert (Barre = 20 μ m). L'absence de comarquage (absence de marquage jaune) indique que les protéines α_{1A} -AR et cav-1 ne colocalisent pas avec la cytokératine 14 ce qui montre que α_{1A} -AR et cav-1 ne sont pas exprimées dans les cellules épithéliales basales.

Running title : α_{1A} -AR in caveolae of DU145 cells

“Caveolae Contribute to the Apoptosis Resistance Induced by the α_{1A} -adrenoceptor in Androgen-independent Prostate Cancer Cells”

KATSOGIANNOU Maria^{1,2}, EL BOUSTANY Charbel^{1,2}, GACKIERE Florian^{1,2},
 DELCOURT Philippe^{1,2}, ATHIAS Anne³, MARIOT Pascal^{1,2}, DEWAILLY Etienne^{1,2},
 JOUY Nathalie⁴, LAMAZE Christophe^{5,6}, MAUROY Brigitte^{1,2}, PREVARSKAYA
 Natalia^{1,2} and SLOMIANNY Christian^{1,2§}

¹ Inserm U800, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d’Ascq, F-59650, France ; ² Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d’Ascq, F-59650, France

³ Lipidomique-IFR100, Hôpital du Bocage, Dijon, F-21079, France

⁴ IFR 114, IMPRT, Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, Lille, F-59045, France

⁵ Institut Curie, Centre de Recherche, Laboratoire Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires, 75248 Paris Cedex 05, France ; ⁶ CNRS, UMR144

[§] Corresponding author.

KATSOGIANNOU Maria: mkat2@hotmail.com; EL BOUSTANY Charbel: celboustany@hotmail.com; GACKIERE Florian: florian.gackiere@wanadoo.fr; DELCOURT Philippe: Philippe.Delcourt@inserm.fr; ATHIAS Anne: anathias@u-bourgogne.fr; MARIOT Pascal: Pascal.Mariot@inserm.fr; DEWAILLY Etienne: Etienne.Dewailly@inserm.fr; JOUY Nathalie: Nathalie.Jouy@inserm.fr; LAMAZE Christophe: christophe.lamaze@curie.fr; MAUROY Brigitte: Brigitte.mauroy@wanadoo.fr; PREVARSKAYA Natalia: Natalia.Prevarskaya@inserm.fr; SLOMIANNY Christian: Christian.Slomianny@inserm.fr

ABSTRACT

Background

During androgen ablation prostate cancer cells' growth and survival become independent of normal regulatory mechanisms. These androgen-independent cells acquire the remarkable ability to adapt to the surrounding microenvironment whose factors, such as neurotransmitters, influence their survival. Although findings are becoming evident about the expression of α_{1A} -adrenoceptors in prostate cancer epithelial cells, their exact functional role in androgen-independent cells has yet to be established. Previous work has demonstrated that membrane lipid rafts associated with key signalling proteins mediate growth and survival signalling pathways in prostate cancer cells.

Methodology/Principal Findings

In order to analyze the membrane topology of the α_{1A} -adrenoceptor we explored its presence by a biochemical approach in purified detergent resistant membrane fractions of the androgen-independent prostate cancer cell line DU145. Electron microscopy observations demonstrated the colocalisation of the α_{1A} -adrenoceptor with caveolin-1, the major protein component of caveolae. In addition, we showed that agonist stimulation of the α_{1A} -adrenoceptor induced resistance to thapsigargin-induced apoptosis and that caveolin-1 was necessary for this process. Further, immunohistofluorescence revealed the relation between high levels of α_{1A} -adrenoceptor and caveolin-1 expression with advanced stage prostate cancer.

Conclusions/Significance

In conclusion, we propose that α_{1A} -adrenoceptor stimulation in androgen-independent prostate cancer cells *via* caveolae constitutes one of the mechanisms contributing to their generalized resistance to apoptosis.

INTRODUCTION

Prostate cancer is one of the most common forms of cancer in men and the second cause of cancer death in industrialized countries [1]. Various factors such as androgens and growth factors regulate epithelial cell proliferation and apoptosis in the normal prostate and early-stage prostate cancer (PCa). Androgen ablation is currently the leading therapy used to block the growth of androgen-dependent cancer cells. However PCa cells' proliferation and survival often become independent of regulatory mechanisms leading to a hormone-refractory disease [2] for which there is currently no successful therapy. Androgen-independent PCa cells have the remarkable ability to adapt to the surrounding microenvironment whose influence on intracellular survival pathways remains subject to debate [3]. Indeed, PCa cells are in contact with various factors such as hormones, growth factors and neurotransmitters which are thought to influence the physiology of these cells. Among others, interest has been shown for the endogenous catecholamines norepinephrine and epinephrine. In fact, the subepithelial stroma of the prostate is particularly rich in autonomic nerves and α_1 -adrenoceptors (α_1 -AR). The α_{1A} -AR subtype, in particular, is found in smooth muscle cells but its expression has also been described in epithelial cells [4], [5]. The α_{1A} -AR is a member of the superfamily of G-protein coupled receptors (GPCR) mediating actions of the previously mentioned catecholamines in a variety of cells [6].

α_1 -AR antagonists are already used for the clinical treatment of benign prostate hyperplasia (BPH) [7], where their therapeutic benefit is attributed to a direct action on α_1 -AR present in prostate smooth muscle cells [8]. However, several studies have provided evidence on additional effects of α_1 -AR antagonists such as doxazosin on long-term BPH treatment. These agents have been demonstrated to inhibit prostate growth by inducing apoptosis in stromal and epithelial cells and are emerging as potential therapeutic

regimens for the prevention and treatment of androgen-independent PCa [9-11]. In addition, previous studies from co-workers on human prostate cancer epithelial (hPCE) cells and the androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP show that phenylephrine (PHE), an α_{1A} -AR agonist, stimulates their proliferation [12], [13]. Despite these promising findings, the functional role of α_{1A} -AR in androgen-independent PCa cells has yet to be established.

It has been described that the signalling and trafficking of several GPCR are regulated by specialized plasma membrane domains known as lipid rafts [14]. Moreover, recent data on cardiomyocytes have shown that α_1 -AR as well as the molecules involved in its signal transduction pathway are accumulated in caveolae, a subclass of membrane microdomains [15], [16]. Caveolae are 50-100 nm flask-shaped plasma membrane invaginations, characterized on one hand by high contents of cholesterol and glycosphingolipids and on the other hand by the presence of caveolin-1 (cav-1), the major constitutive protein of 20-25 kD [17]. Interestingly, cav-1 has been associated with many diseases such as atherosclerosis and Alzheimer's disease [18], [19]. Regarding its role in cancer, it has been established that PCa is associated with increased cav-1 expression [20]. In fact, this protein has been identified as a marker associated with PCa progression and hormone-refractory disease, playing a determinant role in the androgen-independence of PCa cells [21]. By its association with specific receptors and enzymes on the plasma membrane, cav-1 can be a direct mediator of survival, growth and metastasis signals in PCa cells [22].

To date, not much is known about the mechanisms underlying neurotransmitters involvement in the survival of PCa cells, let-alone the role of α_{1A} -AR in androgen-independent epithelial cells and PCa progression. In this regard, it is tempting to link the

presence of α_{1A} -AR and cav-1 and to hypothesize that the α_{1A} -AR could mediate *via* caveolae its functional effects on growth or survival of advanced stage PCa cells.

The objective of our work was therefore to explore the role of the α_{1A} -AR in androgen-independent PCa cells. Here, we investigate the presence of α_{1A} -AR in caveolae of DU145 cells, an androgen-independent PCa cell line derived from brain metastasis. We analyze the consequence of α_{1A} -AR stimulation by PHE on the receptor and cav-1 membrane distribution as well as its effect on the lipid composition of membrane raft fractions purified from DU145 cells. Furthermore, we describe the effect of PHE in the apoptosis resistance of these cells and our results strongly imply the involvement of caveolae in this signalling pathway. Finally, by immunohistofluorescence and RT-PCR, we observe a positive correlation of α_{1A} -AR and cav-1 expression and advanced stage PCa. The presence of α_{1A} -AR-rich caveolae could therefore contribute to the generalized apoptosis resistance characterizing androgen-independent prostatic tissue.

METHODS

Cell culture

The androgen-independent human prostate cancer cell line DU145, obtained from the American Type Culture Collection, was maintained in culture in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Inc) supplemented with 10% (v/v) FCS (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France), 5mM L-glutamine and 2mM kanamycin (Sigma). Cells were routinely grown in 50 ml flasks (Nunc, PolyLabo, Strasbourg, France) at 37°C in a humidified 5% CO₂-95% air atmosphere. These cells constitute a suitable model for brain metastatic cancer cells present in hormone-refractory prostate cancer.

Cell transfections and generation of cav-1 knock-down DU145 cell line

Two ready-to-use siRNAs against α_{1A} -AR (siADR1A, Eurogentec) were transiently transfected (50 nM) with HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen) in DU145 cells. Control siRNA (siCTL) experiments were performed by transfecting siRNA against Luciferase.

siLuciferase (siCTL) : 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA-3'. siADR1A-1 (mix of): 5'-CAGGAAAGAUGCAGAGGA-3' and 5'-UUCCUCUGCAUCUUUCCU-3'. siADR1A-2 (mix of): 5'-GCGUCUACGUGGUGGCCA-3' and 5'-UUGGCCACCACGUAGACG-3'. DU145 clones stably expressing empty Psuper plasmid (DUshCTL) and Psuper plasmid expressing shRNA against cav-1 (sequence: CTGGAATAAGTTCAAATTCTT 2121 3'utr) (DUshcav-1) were established according to [23]

Antibodies and Reagents

Primary antibodies used for immunofluorescence (IF) microscopy and immunoblotting (IB) were: rabbit anti- α_{1A} adrenoceptor (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-caveolin-1 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-caveolin-1 (BD transduction Laboratories), mouse anti- β -actin (Sigma), mouse anti-cytokeratin 18 (Chemicon, Millipore, Paris,

France), mouse anti-bax (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-procaspase 3 (UPSTATE). Secondary antibodies used for IB were: horseradish peroxidase-linked anti-mouse or anti-rabbit (Chemicon). For IF, Alexa Fluor[®] 488-labelled and 546-labelled secondary antibodies (Molecular Probes) were used. All antibodies were used at concentrations recommended by the manufacturers.

Cells were treated with 10 μ M L-Phenylephrine Hydrochloride (PHE) and 1 μ M prazosin (PRA) for three days (renewed every 24h) and 10 μ M TG for 48 hours in RPMI medium. Short term PHE treatments were realized in a solution containing (mM): NaCl, 116; KCl, 5.6; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1.2; NaHCO₃, 5; NaH₂PO₄, 1; HEPES, 20; pH 7.3. All chemical products were provided by Sigma except Thapsigargin (TG) (Alomone).

Cell cycle analysis

Cells were grown in three 60-mm dishes per condition and drugs were applied as described above. After treatments, cells were trypsinized, harvested and resuspended in 0.2 ml sterile PBS. 1 ml of cold 70% ethanol was added onto cell suspensions while vortexing. Samples were centrifuged, washed in sterile PBS and then incubated with ribonuclease (2 μ g/ml) for 15 min. Propidium iodide (25 μ g/ml final in PBS-triton X-100 0.1%) was then added and allowed to incubate for an additional 30 min. DNA content was measured by exciting propidium iodide at 488 nm and measuring the emission at 520 nm using a flow cytometer (Beckman coulter Epics XL4-MCL with Expo32 acquisition). Experiments were repeated four times.

Western Blot

The cell culture medium was discarded and flasks were washed with iced PBS. Cellular proteins were then extracted using RIPA buffer [1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) Na deoxycholate, 150mM NaCl and 20mM sodium or potassium phosphate, pH 7.2] with 5mM EDTA and anti-protease cocktail (P8340; Sigma) for 30 min on ice. After scraping,

any insoluble material was removed by centrifugation at 30000 x g for 10 min at 4 °C and the amount of protein was assessed by the BCA method (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, U.S.A.). Equal amounts of proteins were subjected to SDS/PAGE (16% gels). Finally, the proteins were transferred on to nitrocellulose membranes using a semi-dry electro-blotter (Bio-Rad). After saturation in non-fat milk, membranes were incubated overnight with diluted primary antibodies (see “Antibodies and Reagents”). The membranes were then washed with a TNT buffer (15mM Tris/HCl, pH 8, 140mM NaCl and 0.05% Tween 20) and treated with the corresponding horseradish peroxidase-linked secondary antibodies in TNT/milk (anti-mouse or anti-rabbit, Pierce) for 1 h at room temperature. After several washes in TNT buffer, the membranes were processed for chemiluminescent detection using the Super Signal West Dura chemiluminescent substrate (Pierce) according to the manufacturer's instructions. The membranes were finally exposed to X-Omat AR films (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, U.S.A.). The intensity of the signals was evaluated by densitometry and semi-quantified using the ratio for each sample between the intensity of protein of interest divided by the actin intensity. Each experiment was repeated at least twice.

Isolation of Detergent Resistant Membranes (DRM) and Dot blot

Cells were rinsed, scrapped, centrifuged and the supernatant was removed. The pellet was resuspended with isolation buffer B (according to Axis-Shield S20 Application Sheet) and homogenized with a Dounce homogenizer (Kontes) of 15 µm pestle clearance then centrifuged for 10 min at 1000 x g. The supernatant corresponding to crude lipid raft extract was isolated and 0.2% Triton X-100 was added. A discontinuous 5-step Optiprep[®] (Axis-Shield PoC AS) gradient was formed with buffer D (buffer B + 1% Triton X-100) (w/v) in order to obtain 1.66 ml of 35%; 2.5 ml of 20%; 2.5 ml of 15%; 2.5 ml 10%; 0.83 ml of 5%. Crude lipid raft extract was made dense with sucrose (230 mg for 0.5 ml of

lysate) and laid at the interface between gradients 35% and 20%. Ultracentrifugation at 165400 x g for 4 h at 4°C in 50 Ti rotor (Beckman Coulter) was followed by collection from the bottom up of 1.1 ml fractions. 1.1 ml of 20% (v/v) TCA (Trichloroacetic Acid) was added to each fraction in order to precipitate proteins. Tubes kept on ice for 20 min were centrifuged at 10000 x g at 4°C for 10 min. The precipitate was washed with methanol, centrifuged then re-suspended in 4% (v/v) SDS. Since samples were not highly concentrated in proteins and detection by classical western blot was difficult to obtain, samples were loaded on nitrocellulose membrane in a 96-well Dot-Blot unit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). The ten fractions were spotted onto nitrocellulose membrane in series and hybridized with the desired antibodies following classical IB procedure as previously described. Precautions were accordingly taken in keeping some important factors constant for the treated and non-treated conditions. The cell density used for the experiments was constant and when cold detergent extraction was carried out both the concentration of the detergent and the ratio of cell number/detergent concentration were the same. Each well was loaded with the equal volumes from each fraction. This standardized method was repeated at least three times and was used to evaluate changes in the partitioning of a target molecule in DRM, avoiding false estimations when based on the relative amounts with regard to all other molecules present.

Quantification of phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM)

Lipids were extracted according to the method of Folch et al. [24]. Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC Sigma), dimyristoylphosphatidylserine (DMPS Avanti Polar Lipids), lauroylsphingomyelin (LSM Avanti Polar Lipids) were used as internal standards. Phospholipid analysis was performed on a Hypersil Si 2x200 mm column (Agilent Technologies, Massy, France) following protocol (Becart I, 1990). Positive ESI-MS was performed on a MSD 1100 Mass Spectrometer (Agilent

Technologies). The orifice voltage was set at 120 V, the capillary voltage at 3.5 kV, the drying gas (Nitrogen) flow at 8 l / min and scan range from m/z 400 to 950. Integrated peak were as from Extracted Ion Chromatograms (EIC) for m/z = 700 to 950 at the retention time (RT) of PC, PS, SM were divided by the EIC for m/z = 679 at the RT of DMPC, m/z =681 at the RT of DMPS or m/z = 647 at the RT of LSM. Levels were determined by comparison of this ratio with a standard curve of known amounts of phosphatidylcholine and sphingomyelin.

Quantification of Cholesterol

Extraction and saponification were performed according to the previously described procedure [25] with some modifications. Quantification of cholesterol was performed using a HP6890 Gas Chromatograph equipped with an HP7683 Injector and a HP5973 Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Chromatography was performed using a HP-5MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm inner diameter, 0.25 µm film thickness, Agilent Technologies). A selected ion-monitoring program was used for mass spectrometry. The ions used for analysis (m/z) were as follows: epicoprostanol, 370; cholesterol, 368. Calibration curves were obtained by analyzing standards prepared from authentic standards (Steraloids) and extracted with the method used for samples.

Plasma Membrane “Rip Off”

This method was based on a published protocol [26]. Cells were grown on glass coverslips. Formvar[®]-coated copper grids (according to Tokuyasu, 1973) were coated with polylysine. Coverslips were placed cell side down onto the grids and a slight pressure was exerted using a rubber bung then coverslips were turned over and the grids were carefully detached then fixed in 8% (v/v) PFA. After washing in PBS and saturation in PBS/2.5 mM, glycine/donkey serum immunolabelling was carried out according to standard techniques, using primary antibodies followed by species-specific anti-IgG gold

conjugates of 6 nm, 12 nm and 18 nm. Finally, grids were contrasted and prepared for observation on a Hitachi H-600 transmission electron microscope (magnification x 20000) at 75 kV.

Ultrastructural Microscopy

For transmission electron microscopy, Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde prepared in 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer. After acetonitril dehydration, the pellet was embedded in Epon. Serial thin sections (90 nm) were cut using a Reichert Ultracut E ultramicrotome and collected on 150 mesh hexagonal barred copper grids. After staining with 2% uranyl acetate prepared in 50% ethanol and incubation with a lead citrate solution, sections were observed on a Hitachi H-600 transmission electron microscope.

Indirect Immunofluorescence

Resection BPH specimens from human prostate frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and kept in “Tissue-Tek[®]” at -80°C before 10 µm sections were prepared at -20°C with a cryostat, mounted on glass slides and proceeded to IF study. Normal and cancerous prostate tissue were supplied by tissue-array slides (SuperBioChips Laboratories), deparaffinized according to manufacturer’s indications (Cliniscience) before preparation for IF. All slides were blocked with PBS/1.2% (v/v) gelatin according to [27]. Imaging was performed using Zeiss LSM 510 confocal head (Carl Zeiss) connected to a Zeiss Axiovert 200M microscope with a x 40 oil-immersion objective lens (numerical aperture 1.45). Slides were scanned using an argon ion laser and a helium/neon ion laser. All scanning parameters were kept constant throughout the different experiments. AIM 3.2 confocal microscope software (Carl Zeiss) was used for data acquisition and analysis.

RT-PCR

Reverse transcription-PCR was carried out as previously described [28]. The 178pb α_{1A} -AR isoform 1 amplicon was amplified with 5'-AGACCAATCCTCCTGTACCAC-3' (forward) and 5'-CTCTGCATCTTTCATGTCCTAG-3' (reverse). The 220pb cav-1 amplicon was amplified with 5'-AGTGCTCCTGTTCTCCCTTC-3' (forward) and 5'-CTTGTCGATGGCTTCCTTCAC-3' (reverse) (Eurogentec). The 236pb GAPDH amplicon internal control was amplified with 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (forward) and 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (reverse). The 241pb cytokeratin 18 amplicon was amplified with 5'-TGAGTCAGAGCTGGCACAGA-3' (forward) and 5'-TGGTGTCATTGGTCTCAGACA-3' (reverse). Finally, the 210pb cytokeratin 14 amplicon was amplified with 5'-TGCGAGATGGAGCAGCAGAA-3' (forward) and 5'-TGCCATCGTGCACATCCATGA-3' (reverse).

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using unpaired *t* tests (for comparing two groups) or analysis of variance tests followed by Dunnett (for multiple control *versus* test comparisons). Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

RESULTS

α_{1A} -AR is associated with cav-1 at the DU145 cell surface

Previous studies have described a direct interaction of α_{1A} -AR with cav-1 [15]. Moreover, α_{1A} -AR signalling is known to localize in caveolae [14], [29]. To explore the membrane topology of α_{1A} -AR, we used the “rip-off” technique developed in adherent cells allowing the isolation and observation by electron microscopy of large areas of the plasma membrane [30]. α_{1A} -AR immunogold staining (6 nm dots, black arrowhead) colocalizes with cav-1 (18 nm dots, white arrowhead) in plasma membrane microdomains of about 50-100 nm (Figure 1).

Plasma membrane protein redistribution and lipid composition alterations in DRM fractions induced by phenylephrine

Analysis of plasma membrane microdomain, caveolae or lipid raft composition typically begins with detergent solubilization of whole cells followed by density gradient centrifugation and recovery of detergent-resistant membranes (DRM) from light fractions of the gradient. We investigated the association of α_{1A} -AR with purified DRM from DU145 whole cell membrane extracts on an OptiPrep[®] density gradient. For the characterisation of DRM fractions, the presence of a specific plasma membrane marker pan cadherin was first assessed as a positive control (Figure 2A, a). Its presence in all 10 purified fractions demonstrates that the isolated DRM fractions correspond to plasma membrane regions. In addition, the nuclear protein PCNA (proliferation cell nuclear antigen) and the mitochondrial protein bax were used as negative controls as they are known not to associate with plasma membrane. Their absence in DRM fractions validates the absence of contamination by intracellular membranes (Figure 2A, a).

In order to determine whether previously defined microdomains are involved in the α_{1A} -AR signalling pathway in DU145 cells, we examined α_{1A} -AR stimulation by its

specific agonist phenylephrine (PHE). In non treated cells, our data demonstrated the presence of cav-1 and α_{1A} -AR in 1-6 low density fractions corresponding to gradients 5%-20% (Figure 2A, b). Dot blot analysis of DRM fractions also revealed that cav-1 and α_{1A} -AR distribution shifted from fractions 1-6 in control (CTL) conditions towards lower density gradient (5%-10%) fractions 1-5 after 10 minutes treatment by 10 μ M PHE (Figure 2A, b, upper panel CTL; lower panel PHE). $G\alpha_{q11}$ (an α_{1A} -AR effector) contents also showed a shift from fractions 4-5 to fractions 1 to 5 after PHE treatment and remain present in higher density fractions, suggesting that receptor activation does not involve all $G\alpha_{q11}$ proteins present at the membrane level. We also assessed the purinergic receptor P2Y2 used as a negative control for the specificity of the shift induced by PHE. α_{1A} -AR and P2Y2 are both GPCR sharing similar signalling pathways. P2Y2 is located in the same fractions whether DU145 cells were treated or not (Figure 2A, b, CTL and PHE), therefore demonstrating the specificity of the previously observed PHE-induced shift.

Moreover, we were interested in the lipid composition of purified DRM fractions. Lipids known to be enriched in biological lipid rafts, such as lysophosphatidylcholin (LPC), sphingomyelin (SM), phosphatidylcholin (PC) and cholesterol [31], [32], were analyzed. Once again, we investigated possible alterations of the lipid composition of DRM fractions after PHE stimulation. Our observations show a significant increase in the quantities of these lipids mainly in low density gradient (5%-10%) fractions 1-5 as a result of PHE stimulation (Figure 2B, a, b, c, d). These results are in agreement with the well established fact that the high lipid content causes floating of lipid microdomains in low density fractions during centrifugation. Previously published data on lipid model systems show that the size of lipid rafts depends on the lipid membrane composition [33], [34]. The observed alterations in lipid compositions due to membrane reorganization may

account for lighter density microdomains resulting in the redistribution of α_{1A} -AR, cav-1 and G α_{11} observed within DRM fractions.

Protein and lipid reorganization induced by phenylephrine is associated with cav-1-rich membrane clustering

It is thought that upon extracellular stimulus, the plasma membrane is prepared for the formation of more stabilized domains and molecular clusters with enhanced size and lifetime such as caveolae [35], [36]. In order to understand the involvement of caveolae in the α_{1A} -AR signalling, we explored the effect of PHE stimulation on the DU145 cell surface morphology (Figure 3A). Cells treated for 10 min with 10 μ M PHE present numerous surface invaginations corresponding to caveolae (Figure 3A, b) as compared to non-treated cells (Figure 3A, a). Caveolae are evident as circular profiles with uniform shape and 50-80 nm diameter. In this representative electron micrograph caveolae are present as single pits (Figure 3A, b, black arrowheads) and sometimes in more complex arrangements interconnected with cytoplasmic caveolar profiles (Figure 3A, b, white arrowheads).

Caveolae are formed by the polymerisation of caveolins leading to the clustering and invagination of existing cholesterol-sphingolipid rich domains in the cell plasma membrane [36]. We investigated the membrane distribution of cav-1 and α_{1A} -AR in control conditions and after α_{1A} -AR stimulation (Figure 3B). The same surface areas of preparations (ten/condition) were compared in control and treated conditions and the mean number of clusters was calculated (Figure 3B, d). Here, representative electron micrographs for each condition are presented. We observed a greater number of cav-1-rich domains in PHE treated cell surfaces (Figure 3B, b) as compared to control conditions (Figure 3B, a). Further, in order to test the specificity of PHE stimulation on cell surface distribution of cav-1 and α_{1A} -AR, we used an α_1 -AR antagonist, prazosin (PRA)

simultaneously with PHE (Figure 3B, c). Cav-1 was present in isolated units and not in clusters at the cell surface associated with α_{1A} -AR. It should be noted that PRA alone did not affect membrane localization of either cav-1 or α_{1A} -AR (data not shown). Our results propose that α_{1A} -AR may associate with cav-1 in resting cells and upon receptor stimulation clustering of cav-1-rich units form α_{1A} -AR –containing structural surface caveolae.

Phenylephrine sensitizes DU145 cells' resistance to Thapsigargin-mediated apoptosis in a cav-1 dependent manner

We first quantified cav-1 in DU145 non-transfected cells (DU145 WT) and in stably transfected DU145 cells with either an empty plasmid (DUshCTL) or a plasmid expressing shRNA against cav-1 (Figure 4A, a). These cav-1 knockdown cells express 60% less cav-1 than non-transfected or shCTL cells. The use of these cells allowed us to investigate the involvement of caveolae in the α_{1A} -AR signalling as it is further explained.

In order to study the role of α_{1A} -AR signalling in the survival of DU145 cells, we induced cell apoptosis by a 48 h treatment with 10 μ M thapsigargin (TG), a known inhibitor of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA). As a consequence of inhibiting SERCA, TG induces a substantial depletion of calcium stores, creating perturbations in cellular calcium known as reticular stress coupled with the ability to engage mitochondrial-dependent apoptotic pathways [37]. In the present study, apoptosis was measured as an increased number of cells in SubG1 phase of the cell cycle [38]. It should be noted that the percentage of apoptotic cells in non-treated conditions was close to 0% and a 48h TG treatment induced an increase of cells in SubG1 phase to 30% (data not shown). In order to assess the effect of PHE on the TG-induced apoptosis, here we considered TG-treated cells as 100% in SubG1 phase (Figure 4A, b) and different treatments were therefore compared to TG-treated conditions.

A three-day pre-treatment by 10 μ M PHE prior to TG treatment induced a significant 25% decrease in the number of DU145 WT cells (white columns) in SubG1 phase as well as a 20% decrease in DUshCTL (black columns) (Figure 4A, b). In order to demonstrate the α_1 -AR specificity of the apoptosis resistance induced by PHE, PRA was simultaneously used with PHE. Indeed, the resistance to TG-induced apoptosis was abolished when 1 μ M PRA was added to the pretreatment solution (Figure 4A, b, black and white columns). It should be noted that PHE and/or PRA alone have no effect on cell cycle phases (data not shown). We then sought to investigate the involvement of caveolae in this phenomenon. We therefore disrupted caveolae structure by underexpressing cav-1. Analysis of SubG1 phase revealed that in cav-1 knockdown cells PHE pre-treatment did not promote resistance to TG-induced apoptosis (Figure 4A, b, grey columns). All these results were confirmed by the Hoechst staining (data not shown). The present findings strongly suggest the involvement of caveolae in the resistance to TG-induced apoptosis mediated by PHE in DU145 cells.

We then explored the expression of target proteins known to regulate mechanisms of apoptosis induction or resistance such as the caspase and Bcl-2 family of proteins by western blot analysis (Figure 4B, a). Scanning densitometry allowed us to represent relative average densities of three different experiments by histograms (Figure 4B, b and c). We first assessed the expression of the 32 kD protein procaspase 3 in DU145 WT, DUshCTL and DUshcav-1 cells (Figure 4B, a). Our results in DU145 WT and DUshCTL cells showed a decrease of procaspase 3 after TG treatment due to its cleavage to active caspase 3 (Figure 4B, a), reflecting the induction of apoptosis and indicated respectively by a 60-80% decrease in intensity represented by the average ratios (Figure 4B, b, white and black columns). The TG-induced decrease of procaspase 3 was reversed by 60% and 134% respectively when DU145 WT and DUshCTL cells were pre-treated with 10 μ M

PHE, indicating decreased apoptosis (Figure 4B, a and c, white and black columns). Further, when 1 μ M PRA was used simultaneously with PHE, procaspase 3 levels were similar to TG alone pointing out the antagonistic action of PRA to PHE (Figure 4B, a and c, white and black columns). On the contrary, in DUshcav-1 cells, PHE alone or in the presence of PRA did not reverse the 66% decrease of procaspase 3 induced by TG (Figure 4B, a and c, grey columns).

Bax is a 23 kD pro-apoptotic protein, member of the Bcl-2 family. TG treatment of DU145 WT and DUshCTL cells induced overexpression of Bax thus apoptosis of these cells (Figure 4B, a and b, white and black columns) but no significant difference was observed in DUshcav-1 cells (Figure 4B, a and b, grey columns). A three-day treatment by 10 μ M PHE preceding TG treatment reduced the levels of Bax by up to 70% in DU145 WT and DUshCTL cells, once again suggesting decreased apoptosis in these cells (Figure 4B, a and c, black and white columns). Once more, 1 μ M PRA pretreatment opposed the PHE-induced decrease of Bax expression levels (Figure 4B, a and c, black and white columns). No significant consequence of PHE pretreatment in the resistance to TG-induced apoptosis was observed in DUshcav-1 cells (Figure 4B, a and c, grey column) once again strongly suggesting the involvement of caveolae in this function of α_1 -AR.

Expression and localization variations of cav-1 and α_{1A} -AR are associated with pathological alterations of human prostate tissue

The α_{1A} -AR is abundant in the fibromuscular tissue in normal and hyperplastic prostate [39], [40] however, its role in prostate epithelial cells is still not well defined. Moreover, cav-1 has been described to play an important role in the survival/growth of PCa cells contributing to their metastatic activities [41], [42]. To determine the association of α_{1A} -AR and cav-1 expression with established features of PCa as well as BPH in comparison to normal prostate, we performed α_{1A} -AR and cav-1 immunostaining on tissue

microarrays containing specimen cores from 40 patients. Cytokeratin 18 immunostaining was used as a label of apical epithelial cells present in acini. Normal tissue regions from 9 of these patients were present on these slides. The figures shown here are representative of all samples observed. We first confirmed the specificity of the α_{1A} -AR antibody by the use of two siRNA against α_{1A} -AR (siADR1A-1 and siADR1A-2) (Figure 5A, a). The use of these siRNA induced a 40% and 60% decrease of α_{1A} -AR as compared to cells transfected with the control siRNA. Previous studies revealed that cav-1 overexpression is associated with aggressive PCa [43] but little is known about α_{1A} -AR expression in PCa progression. Here, we found that cav-1 and α_{1A} -AR were strongly expressed in luminal, invasive epithelial cells in stage III PCa (Figure 5A, b, cancerous acinus). Furthermore, in hyperplastic tissues cav-1 and α_{1A} -AR immunostaining was present in the simple lining of cytokeratin 18-positive-acinar epithelium and in the fibromuscular stroma (Figure 5A, b, hyperplastic acinus). The majority of the normal regions of the samples expressed low levels of cav-1 and α_{1A} -AR in apical epithelial cells and the presence of the two proteins was mostly observed in the stroma (Figure 5A, b, normal acinus). Overall, these results demonstrated elevated expressions of cav-1 and α_{1A} -AR in advanced PCa epithelial cells, more numerous and invasive in these conditions than in BPH.

Finally, we were interested in assessing the mRNA levels of α_{1A} -AR and cav-1 in a series of cancerous and hyperplastic human prostate samples. We analyzed six PCa samples obtained from patients in hormone-refractory phase and characterized as androgen-independent. Relative quantification of α_{1A} -AR and cav-1 mRNA levels as compared to GAPDH internal control was quite promising (Figure 5B, b). We found average mRNA levels of α_{1A} -AR and cav-1 more elevated in androgen-independent PCa samples than in BPH (Figure 5B, b, black and hatched grey columns). Noticeably, cytokeratin 18 mRNA, characteristic of apical epithelial cells was more abundant in

androgen-independent cancer samples than BPH, in agreement with our previous observations in immunofluorescence. Finally, we noticed that basal epithelial cells' marker cytokeratin 14 mRNA levels did not present any variations between androgen-independent prostate cancer and BPH (except for sample C2 for which no information is available to allow an explanation for its non-detection). Our data strongly suggest that α_{1A} -AR may be associated with androgen-independent PCa epithelial cells and advanced stage PCa just like cav-1. Regardless of internal variability of hyperplastic and cancerous samples (related to factors such as patients' age, progression of disease, treatment) we underlined significant elevated mRNA levels of α_{1A} -AR and cav-1 in androgen-independent cancer compared to BPH. We propose that their simultaneous expression could account in part for the α_{1A} -AR signalling *via* caveolae in androgen-independent PCa epithelial cells.

DISCUSSION

Various locally produced and circulating factors maintain prostate cancer growth by acting through cellular receptors. Increasing evidence supports the involvement of GPCR in neoplastic transformation of the prostate [44], [45]. Moreover, cancerous prostate expresses increased levels of GPCR and their ligands (for example bradykinin, endothelin and their corresponding receptors) [46], [47] suggesting that GPCR signalling may always be “switched on” therefore contributing to the initiation and progression of the disease.

A growing number of recent data has shown the involvement of α_{1A} -AR in human prostate pathology [48], [49]. Further lines of evidence have demonstrated that α_{1A} -AR and its effector proteins are differentially distributed in surface caveolae of cardiac cells [15], [16]. Caveolae and cav-1, the major protein component, have been described to play prominent roles in various human disease phenotypes including cancer (for reviews [18], [50]). Interestingly, the expression of cav-1 has been identified to be closely associated with PCa malignant progression and highly expressed in androgen-independent cells [51], [20], [43].

Despite the above findings, the precise surface localization of the α_{1A} -AR in androgen-independent PCa epithelial cells and its functional role in the proliferation and survival of these cells remain unknown. The present study is the first to demonstrate the localization of α_{1A} -AR in caveolae of the androgen-independent PCa epithelial cells DU145. Our results from the exploration of the lipid-protein contents of purified DRM from these cells were particularly revealing. Noticeably, we provide evidence of significant increase in DRM lipids upon agonist stimulation of the α_{1A} -AR. We propose that this elevated content of raft-specific lipids consequently leads to alterations of DRM density as it is known that high lipid composition causes floating of membranes to lower density fractions after centrifugation [52]. Our results after dot blot analysis strongly

suggest that α_{1A} -AR and cav-1 content is accordingly shifted toward lower density fractions.

Furthermore, lipid composition alterations may be explained by coalescence of cav-1-containing membranes. In agreement with this suggestion, we observed a remarkable surface membrane reorganisation and formation of a great number of cav-1-rich invaginations following α_{1A} -AR stimulation. It is well established that caveolae are formed by the polymerisation of caveolins, leading to the clustering and invagination of a subset of sphingolipid/cholesterol-rich membrane domains [36]. The trafficking of intracellular caveolin-containing membranes and their fusion with the plasma membrane could supply domains with cav-1 and lipids for caveolae formation. Besides it has been described that lipid redistribution in the plasma membrane may modify the biophysical properties of microdomains and regulate signalling pathways [53]. The exact relationship between microdomain composition, density and size is not well established to date. What is known though from previously published data on lipid model systems is that the size of lipid rafts depends on the lipid membrane composition [33], [34] strongly implying that cells could tune their membrane composition to create or destroy domains [54].

A large body of work indicates that cav-1 expression is essential for caveolae formation and function [55], [56]. Moreover, it has been demonstrated in cardiac cells that caveolae integrity regulates α_{1A} -AR signalling [57], [58]. It is essential to note that all α_{1A} -AR may not necessarily be associated to caveolae. In order to study the importance of the caveolar localisation of α_{1A} -AR, we examined its functional role in the presence and absence of cav-1. We demonstrated that agonist stimulation of the α_{1A} -AR enhanced resistance to reticular stress-induced apoptosis in DU145 cells. Importantly, we found that cells underexpressing cav-1 showed no resistance to apoptosis, thus implying the necessity of caveolae integrity in this process.

Our results strongly suggest that α_{1A} -AR signalling in androgen-independent PCa cells contributes to their resistance to apoptosis *via* caveolae. Additionally, our data add to the growing evidence that cav-1 promotes survival and growth of PCa cells [21], [41], [22]. The elevated expression of α_{1A} -AR and cav-1 in androgen-independent PCa cells may contribute to favouring α_{1A} -AR signalling pathway *via* caveolae amplifying the effects on the survival of these cells.

To date, no relevant data describes α_{1A} -AR expression variations according to prostate pathological state. Our study was innovative in the investigation of both α_{1A} -AR and cav-1 expressions in normal, cancerous and hyperplastic prostate (BPH) samples. We show that the elevated expression of α_{1A} -AR in prostate epithelial cells is correlated with prostate pathological progression. During prostate cancer progression, the organ's architecture is greatly compromised, characterized among others, by proliferation of epithelial cells and invasion of prostate ducts and acini [59]. Our immunohistofluorescent study provides evidence of numerous cytokeratin-18-positive (apical epithelial) cells invading acini in advanced PCa samples highly expressing cav-1 and α_{1A} -AR as compared to normal or hyperplastic prostate. Accordingly, we demonstrated increased mRNA levels of cytokeratin-18, α_{1A} -AR and cav-1 in androgen-independent PCa samples as compared to BPH samples. In agreement with previously published data our results propose that the role of α_{1A} -AR in BPH is related to its presence in the fibromuscular stroma [7], [60]. Further, elevated expression of both cav-1 and α_{1A} -AR in advanced stage PCa epithelial cells provide a strong rationale for the understanding of the significance of α_{1A} -AR signalling in androgen-independent PCa.

In conclusion, we demonstrate that caveolae of androgen-independent prostate cancer cells DU145 are involved in the apoptosis resistance induced by the α_{1A} -AR. Our data show that caveolae integrity is necessary for α_{1A} -AR function in these cells. This

study reveals that α_{1A} -AR and cav-1 expressions are positively correlated with the pathological state of human prostate and are highly expressed in advance PCa tissue samples. Our data strongly suggest that the protective function of the α_{1A} -AR *via* caveolae described in DU145 cells, may contribute in synergy with other factors, to the apoptosis resistance mechanisms of PCa cells and enhancement of their survival.

α_{1A} -AR signalling is complex and various lines of evidence demonstrate that α_{1A} -AR stimulation can activate a variety of signalling pathways depending on cell type, receptor expression and agonist concentration [61], [62]. Interestingly, it has been demonstrated that α_{1A} -AR agonists participate in the protection of neural cells and cardiac myocytes against stress-induced death and induce survival signalling [63], [64].

ACKNOWLEDGEMENTS

We are particularly grateful to Pr. Morad Roudbaraki for RNA extraction from human prostate samples and information obtained from the hospital's anatomopathology department. We would also like to thank Dr. Thierry Capiod for his very useful comments and advice on the manuscript.

REFERENCES

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
2. Arnold JT, Isaacs JT (2002) Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr Relat Cancer* 9: 61-73.
3. McKenzie S, Kyprianou N (2006) Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *J Cell Biochem* 97: 18-32.
4. Higgins JR, Gosling JA (1989) Studies on the structure and intrinsic innervation of the normal human prostate. *Prostate Suppl* 2: 5-16.
5. Chapple CR, Burt RP, Andersson PO, Greengrass P, Wyllie M, et al. (1994) Alpha 1-adrenoceptor subtypes in the human prostate. *Br J Urol* 74: 585-589.
6. Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257.
7. Raghavan D (1988) Non-hormone chemotherapy for prostate cancer: principles of treatment and application to the testing of new drugs. *Semin Oncol* 15: 371-389.
8. Andersson KE, Lepor H, Wyllie MG (1997) Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity. *Prostate* 30: 202-215.
9. Kyprianou N, Jacobs SC (2000) Induction of apoptosis in the prostate by alpha1-adrenoceptor antagonists: a novel effect of "old" drugs. *Curr Urol Rep* 1: 89-96.
10. Anglin IE, Glassman DT, Kyprianou N (2002) Induction of prostate apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5: 88-95.
11. Chiang CF, Son EL, Wu GJ (2005) Oral treatment of the TRAMP mice with doxazosin suppresses prostate tumor growth and metastasis. *Prostate* 64: 408-418.
12. Thebault S, Roudbaraki M, Sydorenko V, Shuba Y, Lemonnier L, et al. (2003) Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest* 111: 1691-1701.
13. Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, et al. (2006) Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* 66: 2038-2047.
14. Chini B, Parenti M (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* 32: 325-338.
15. Fujita T, Toya Y, Iwatsubo K, Onda T, Kimura K, et al. (2001) Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 51: 709-716.
16. Morris JB, Huynh H, Vasilevski O, Woodcock EA (2006) Alpha1-adrenergic receptor signaling is localized to caveolae in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 41: 17-25.
17. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, et al. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304.
18. Williams TM, Lisanti MP (2004) The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 36: 584-595.
19. van Helmond ZK, Miners JS, Bednall E, Chalmers KA, Zhang Y, et al. (2007) Caveolin-1 and -2 and their relationship to cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 317-327.
20. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, et al. (1998) Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 4: 1873-1880.

21. Nasu Y, Timme TL, Yang G, Bangma CH, Li L, et al. (1998) Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med* 4: 1062-1064.
22. Thompson TC, Timme TL, Li L, Goltsov A (1999) Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis* 4: 233-237.
23. El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, et al. (2008) Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* 47: 2068-2077.
24. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
25. Abo K, Mio T, Sumino K (2000) Comparative analysis of plasma and erythrocyte 7-ketocholesterol as a marker for oxidative stress in patients with diabetes mellitus. *Clin Biochem* 33: 541-547.
26. Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, et al. (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 7: 661-671.
27. Gackiere F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, et al. (2008) CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* 283: 10162-10173.
28. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P (2006) A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* 39: 357-366.
29. Morris DP, Lei B, Wu YX, Michelotti GA, Schwinn DA (2008) The alpha1a-adrenergic receptor occupies membrane rafts with its G protein effectors but internalizes via clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 283: 2973-2985.
30. Sanan DA, Anderson RG (1991) Simultaneous visualization of LDL receptor distribution and clathrin lattices on membranes torn from the upper surface of cultured cells. *J Histochem Cytochem* 39: 1017-1024.
31. Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-136.
32. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39.
33. de Almeida RF, Loura LM, Fedorov A, Prieto M (2005) Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol* 346: 1109-1120.
34. Yuan C, Furlong J, Burgos P, Johnston LJ (2002) The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys J* 82: 2526-2535.
35. Kusumi A, Suzuki K (2005) Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta* 1746: 234-251.
36. Parton RG, Simons K (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 185-194.
37. Wertz IE, Dixit VM (2000) Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem* 275: 11470-11477.
38. Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z (2007) Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A* 71: 125-131.
39. Lepor H, Tang R, Kobayashi S, Shapiro E, Forray C, et al. (1995) Localization of the alpha 1A-adrenoceptor in the human prostate. *J Urol* 154: 2096-2099.

40. Nasu K, Moriyama N, Kawabe K, Tsujimoto G, Murai M, et al. (1996) Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. *Br J Pharmacol* 119: 797-803.
41. Li L, Yang G, Ebara S, Satoh T, Nasu Y, et al. (2001) Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* 61: 4386-4392.
42. Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, et al. (2001) Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 61: 3882-3885.
43. Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, Ashfaq R, Karakiewicz PI, et al. (2007) Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *Prostate* 67: 614-622.
44. Raj GV, Barki-Harrington L, Kue PF, Daaka Y (2002) Guanosine phosphate binding protein coupled receptors in prostate cancer: a review. *J Urol* 167: 1458-1463.
45. Daaka Y (2004) G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE* 2004: re2.
46. Taub JS, Guo R, Leeb-Lundberg LM, Madden JF, Daaka Y (2003) Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer Res* 63: 2037-2041.
47. Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoka Y, Nakajima M (2001) Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. *J Urol* 165: 1033-1036.
48. Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayashi Y, Tsujimoto G, et al. (2006) Quantification of alpha1-adrenoceptor subtypes by real-time RT-PCR and correlation with age and prostate volume in benign prostatic hyperplasia patients. *Prostate* 66: 761-767.
49. Kyprianou N, Benning CM (2000) Suppression of human prostate cancer cell growth by alpha1-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis. *Cancer Res* 60: 4550-4555.
50. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR (2008) Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev*.
51. Mouraviev V, Li L, Tahir SA, Yang G, Timme TM, et al. (2002) The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer. *J Urol* 168: 1589-1596.
52. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
53. Wang L, Radu CG, Yang LV, Bentolila LA, Riedinger M, et al. (2005) Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A. *Mol Biol Cell* 16: 2234-2247.
54. Collins MD, Keller SL (2008) Tuning lipid mixtures to induce or suppress domain formation across leaflets of unsupported asymmetric bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 124-128.
55. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, et al. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452.
56. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8655-8659.
57. Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Tranum-Jensen J, Hellstrand P, et al. (2002) Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1267-1272.
58. Neidhold S, Eichhorn B, Kasper M, Ravens U, Kaumann AJ (2007) The function of alpha- and beta-adrenoceptors of the saphenous artery in caveolin-1 knockout and wild-type mice. *Br J Pharmacol* 150: 261-270.

59. Schroder FH, Hermanek P, Denis L, Fair WR, Gospodarowicz MK, et al. (1992) The TNM classification of prostate cancer. *Prostate Suppl* 4: 129-138.
60. Takeda M, Hatano A, Arai K, Obara K, Tsutsui T, et al. (1999) alpha1- and alpha2-adrenoceptors in BPH. *Eur Urol* 36 Suppl 1: 31-34; discussion 65.
61. Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH (1994) Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269: 32848-32857.
62. Taguchi K, Yang M, Goepel M, Michel MC (1998) Comparison of human alpha1-adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 100-110.
63. Huang Y, Wright CD, Merkwand CL, Baye NL, Liang Q, et al. (2007) An alpha1A-adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes. *Circulation* 115: 763-772.
64. Ohashi H, Nishikawa K, Ayukawa K, Hara Y, Nishimoto M, et al. (2007) Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. *Eur J Pharmacol* 573: 20-28.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 α_{1A} -AR and cav-1 colocalization in DU145 cell surface

Plasma membranes were “ripped-off” as described in “Materials and Methods” and incubated with anti-cav-1 and anti- α_{1A} -AR antibodies. Secondary antibodies coupled with 6 nm and 18 nm gold particles were used against anti- α_{1A} -AR (black arrowhead) and anti-cav-1 (white arrowhead) respectively. Grids were then processed for electron microscopy observation. Colocalization of both proteins is indicated by circles. Bar, 200 nm.

Fig. 2 Protein and lipid redistributions after agonist stimulation of the α_{1A} -AR by phenylephrine

(A) DRM fractions of increasing density (from fraction 1 to 10) obtained as indicated in “Materials and Methods” and analyzed by Dot blot. (a) Pan cadherin was used as a positive control confirming that the fractions obtained correspond to plasma membrane. PCNA (proliferation cell nuclear antigen) and bax were used as negative controls, their absence confirming the non-contamination of DRM fractions by intracellular proteins known not to be associated with rafts. (b) Dot blot of the DRM fraction collection in control condition (CTL) and 10 min treatment with 10 μ M phenylephrine (PHE). Purinergic receptor P2Y2 was used as a negative control for the specificity of the effect of phenylephrine on protein redistribution in fractions. Black rectangle marks the shift of α_{1A} -AR, cav-1 and $G\alpha_{q11}$ protein to lighter density fractions. (B) Lipid composition of the 10 fractions was quantified as described in the “Materials and Methods” in control (black column) and PHE treated cells (grey columns) for (a) lysophosphatidylcholin (LPC), (b) phosphatidylcholin (PC), (c) sphingomyelin (SM), (d) cholesterol. Error bars represent SEM calculated from three independent experiments. Statistical analysis used the *t* test; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

Fig. 3 Cell surface modification and caveolin-1 mobilization following α_{1A} -AR stimulation

(A) Representative electron micrograph of DU145 cells in (a) non-treated condition (b) after 10 min treatment by 10 μ M PHE. Caveolae and caveolin containing vesicles of 50-80 nm diameter are dense in electrons are indicated by black arrowheads. White arrowheads indicate complex shaped caveolae. Bar, 500 nm. (B) Representative electron micrograph of plasma membrane “ripped-off” from (a) non-treated cells, (b) treated for 10 min with 10 μ M PHE alone and (c) PHE in the presence of 1 μ M PRA. 6 nm gold particles represent anti- α_{1A} -AR labelling (black arrowheads) and 12 nm particles represent anti-cav-1 (white arrowheads). Bar, 200 nm. (d) The area of randomly selected negatives of electron micrographs (ten/condition) was measured at a magnification of 20000. The number of cav-1 and α_{1A} -adrenoceptor-containing clusters (minimum 3 gold particles for each protein) was counted (mean \pm SEM).

Fig. 4 Apoptosis resistance of DU145 cells depends on caveolin-1 expression

(A)(a) Western blot showing the expression of caveolin-1 (cav-1) in DU145 cells stably transfected with Psuper plasmid expressing shRNA against cav-1 (DUshcav-1) and with empty Psuper plasmid (DUshCTL). Images are grouped from different lanes of the same gel and numbers above gels indicate relative expression assessed on actin expression. (b) Cells were treated during 48 hrs with 10 μ M Thapsigargin (TG) for induction of apoptosis, preceded by a 3-day renewable treatment with 10 μ M phenylephrine alone (PHE+TG) or simultaneously with prazosin (PRA+PHE+TG), then analyzed by flow cytometry of propidium iodide-stained nuclei. Experiments were carried out in DU145 non-transfected cells (DU145 WT, white columns), DUshCTL cells (black columns) and DUshcav-1 cells (grey columns). Error bars represent SEM calculated from four independent experiments. Statistical analysis used *t* test; *, $p < 0.05$, **, $P < 0.01$. (B)(a)

Expression levels of pro-caspase 3 and bax in DU145 WT, DUshCTL and DUshcav-1, after treatments indicated above were determined by western blot analysis and analyzed by scanning densitometry using actin immunoblotting as internal control. (b,c) Average densitometries are represented by histograms for non-transfected (white columns), control shRNA (black columns) and caveolin-1 shRNA expressing cells (grey columns). Plots are the average cumulative data (mean \pm SEM) of three experiments. Statistical analysis used the *t* test; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

Fig. 5 α_{1A} -AR and cav-1 differential expressions in normal, cancerous and hyperplastic human prostate

(A)(a) Western blot showing the expression of α_{1A} -AR in the presence of two siRNA against α_{1A} -AR (siADR1A-1 and siADR1A-2) and control siRNA (siCTL). Numbers above gels indicate relative densitometry assessed on actin expression. (b) Representative immunofluorescence of normal prostate acinus showing the presence of the apical epithelial marker cytokeratin 18 (cytk 18, green) and α_{1A} -AR or cav-1 fluorescence (red); Bar, 50 μ m. Star indicates the acinus lumen and white arrowhead fibromuscular stroma. The middle left panel shows representative stage III cancerous acinus. Typically, cancerous apical epithelial cells detected with cytokeratin 18 (green) have completely invaded the lumen and express both α_{1A} -AR and cav-1 (red); Bar, 50 μ m. The middle right panel shows a section of a representative hyperplastic acinus where the lumen (star) is enlarged ; Bar, 20 μ m. (B)(a) Agarose gel showing the expression of α_{1A} -AR (178 pb), cav-1 (220 pb), cytokeratin 18 (241 pb) and cytokeratin 14 (210 pb) amplicons in six different prostatic androgen-independent carcinoma tissues and six different benign hyperplasia tissues. A no-template control was also run with the PCR samples where cDNA was replaced with water (H₂O). A 1-kilobase DNA ladder (*MW* (bp)) was used as a DNA size marker. GAPDH (236pb) was used as an internal control. (b) Ratios of mean

mRNA quantities of α_{1A} -AR, cav-1, cytokeratin 18 (cytk 18) and 14 (cytk 14) as compared to GAPDH in androgen-independent (AI) cancer (black columns) and hyperplastic samples (grey hatched columns). Plots are the average cumulative data (mean \pm SEM) of six samples by condition. Statistical analysis used the *t* test; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

Figure 1

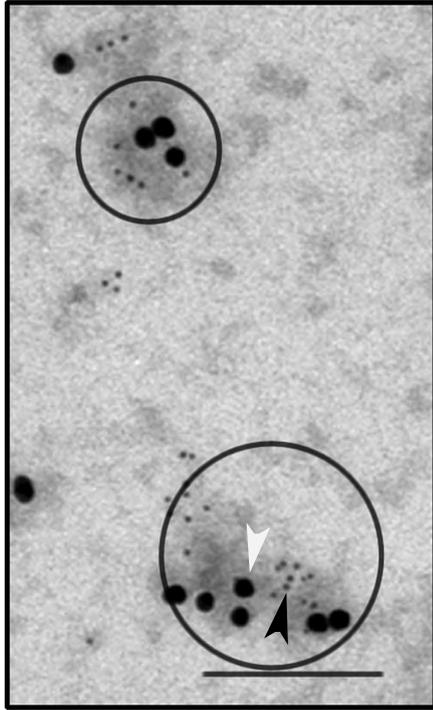
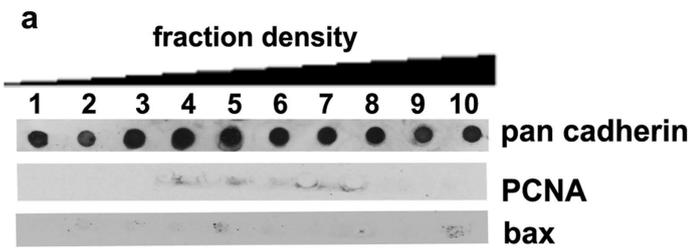


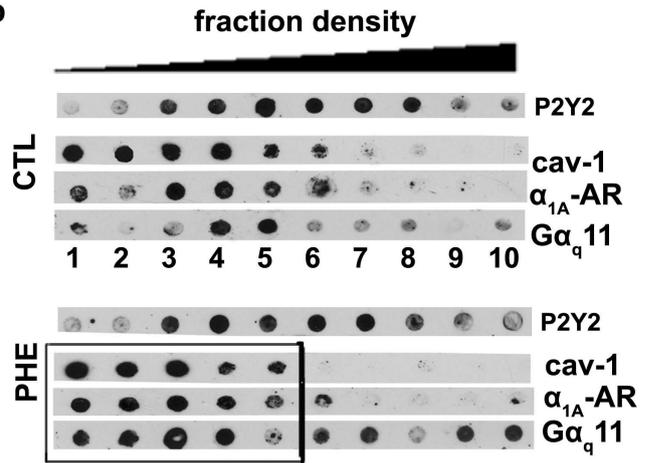
Figure 2

140

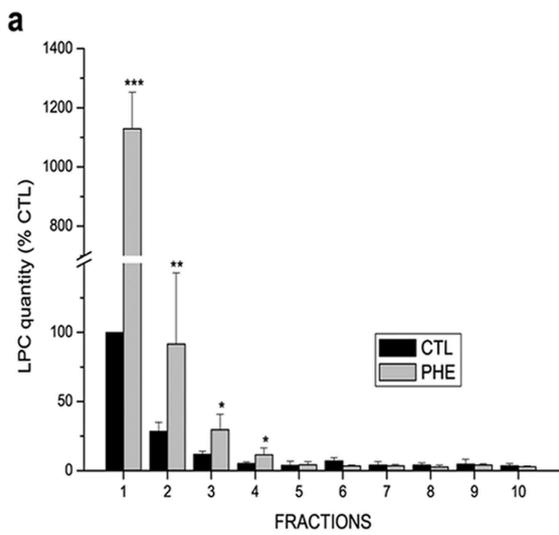
A



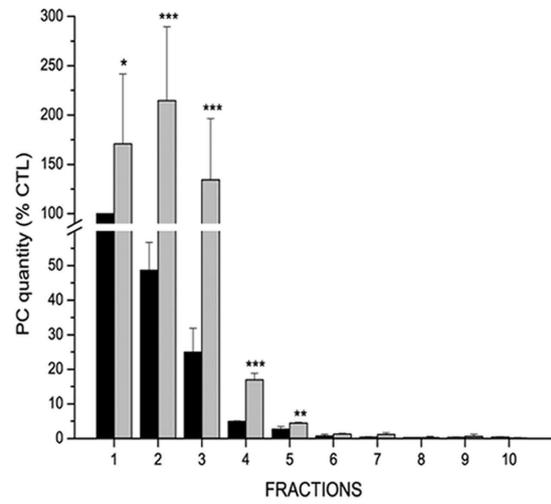
b



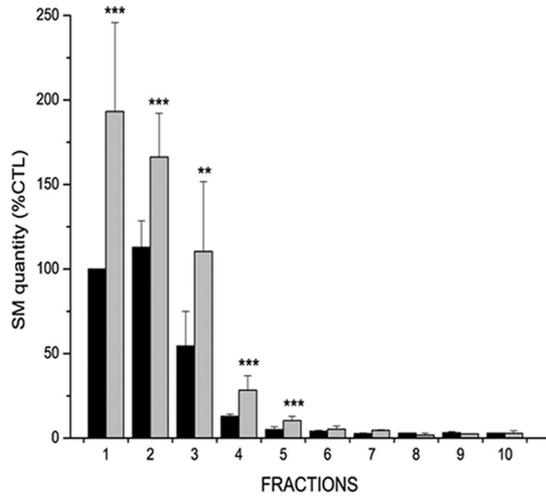
B



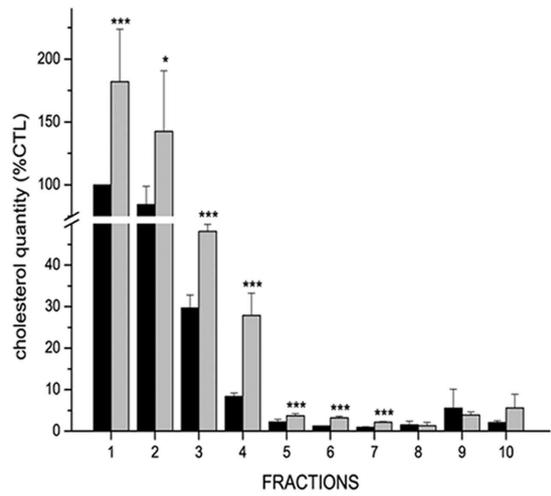
b



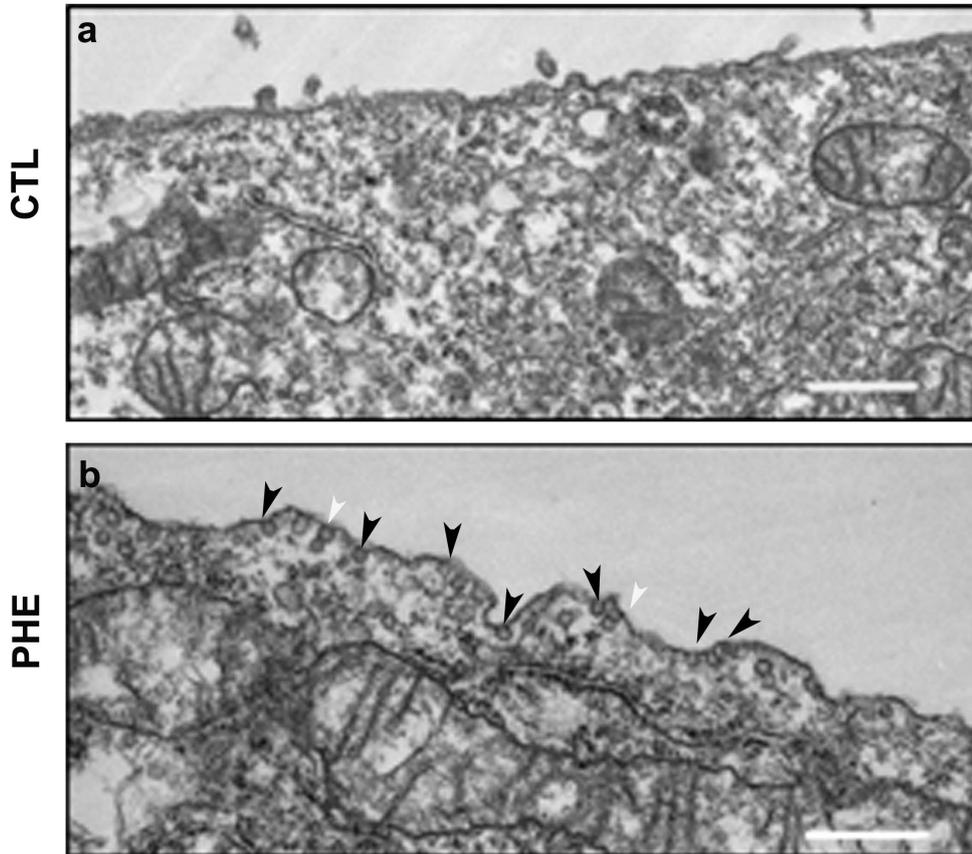
c



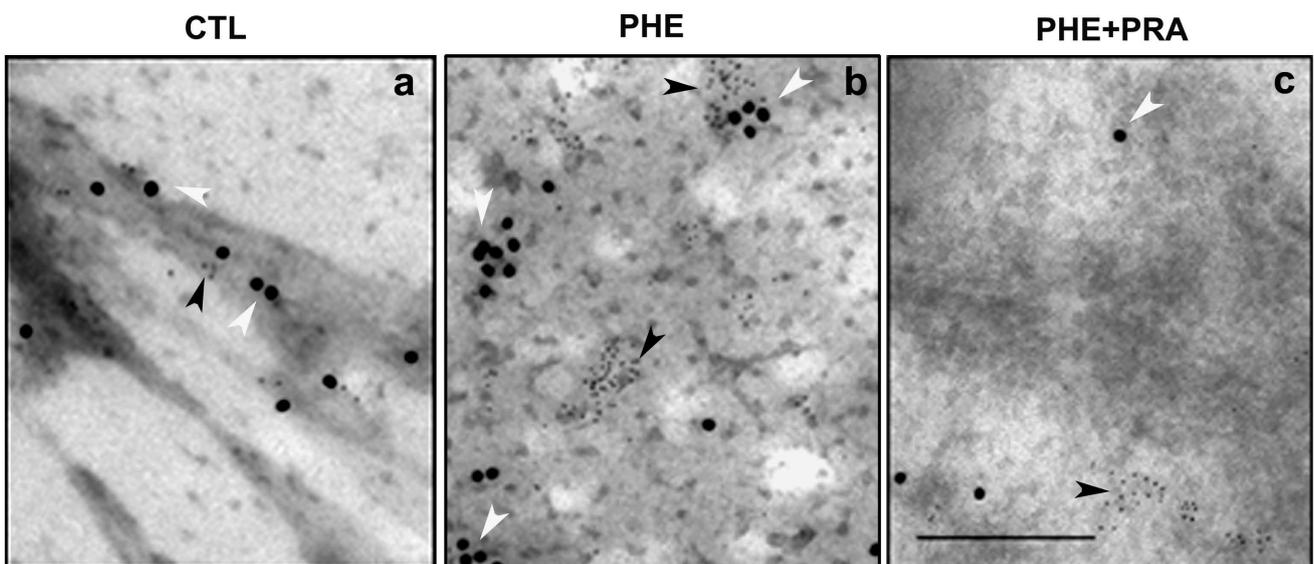
d



A



B



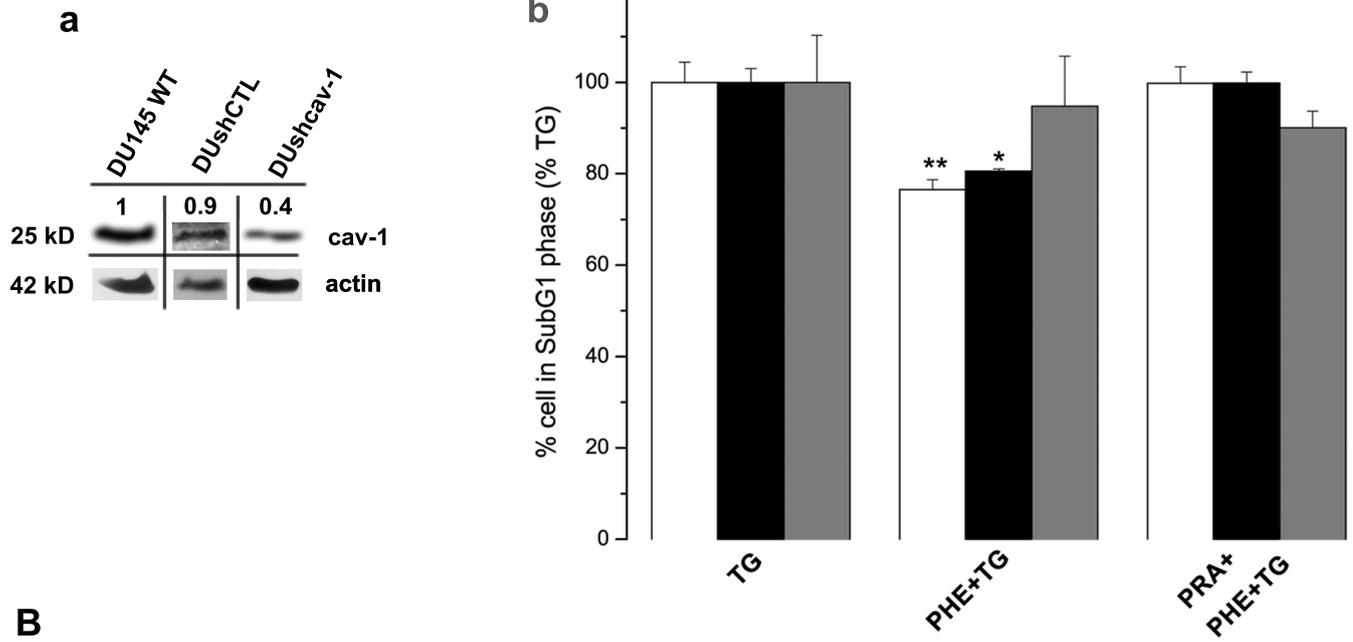
d

	Total area measured (cm ²)	number of clusters (mean ± SEM)
CTL	60	1 ± 0,37
PHE	60	4,7 ± 1,2
PHE+PRA	60	0,8 ± 0,5

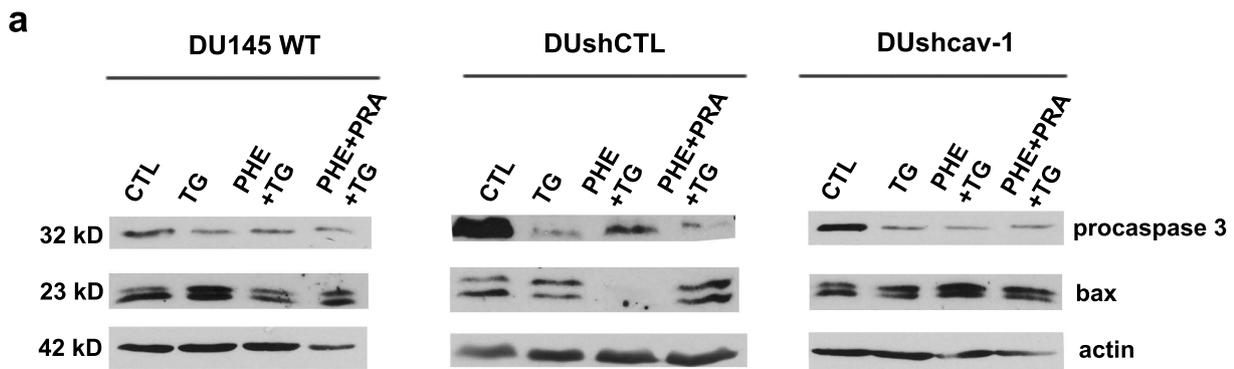
Figure 4

142

A



B



c

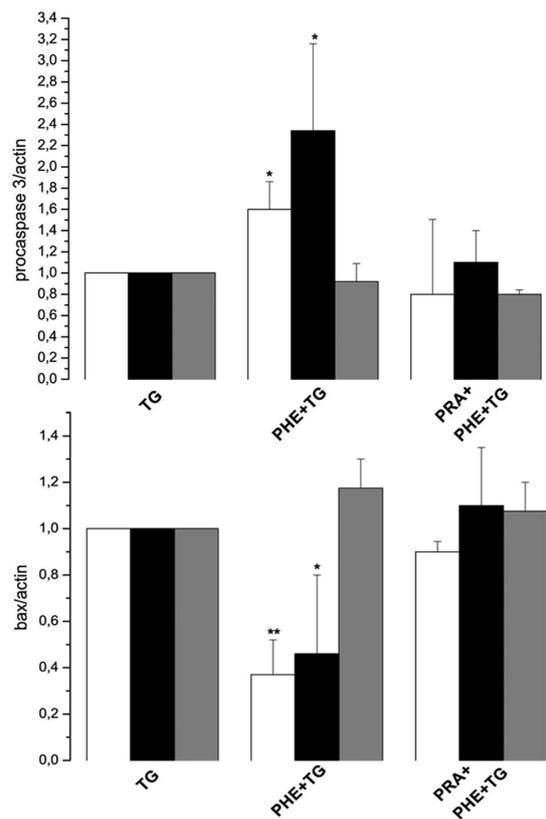
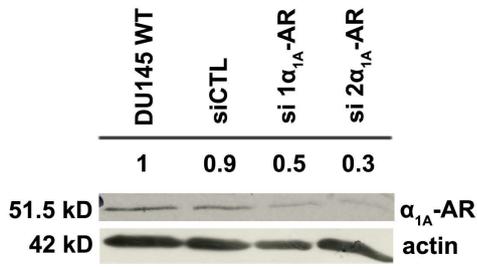


Figure 5

A

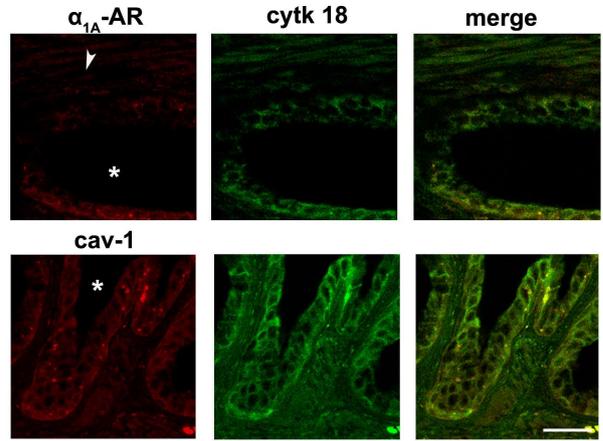
143

a

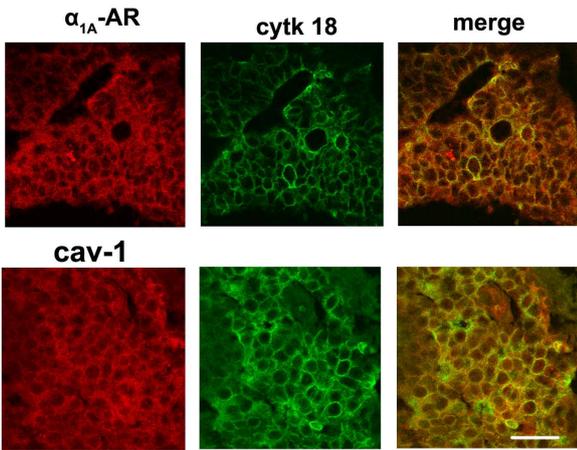


b

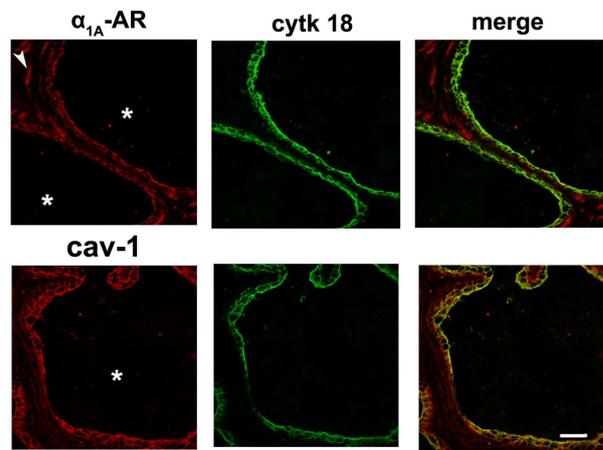
normal acinus



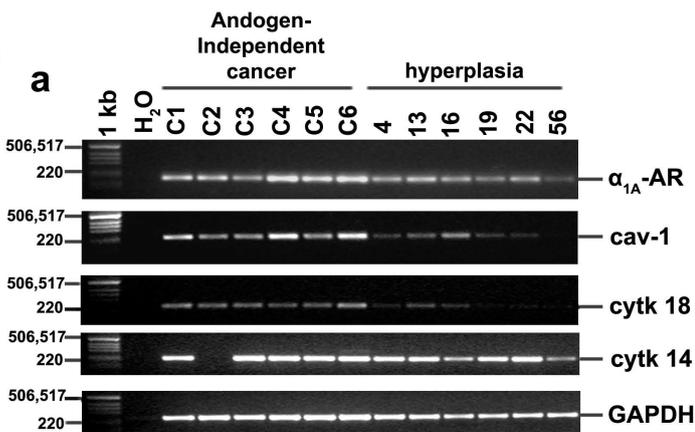
cancerous acinus



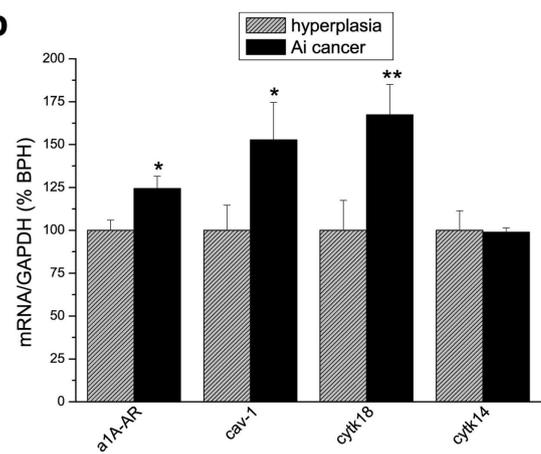
hyperplastic acinus



B



b



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

α_{1A} -AR, survie et anoïkis

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que l'activation du α_{1A} -AR par la phényléphrine (PHE) protège les cellules prostatiques androgéno-indépendantes DU145 de l'apoptose induite par un stress réticulaire provoqué par la thapsigargine (Figure 4, article). Je me suis intéressée à explorer si cette fonction est spécifique de la voie apoptotique enclenchée par la thapsigargine ou si l'apoptose des DU145 induite par d'autres facteurs peut aussi être contrecarrée par la PHE.

Les cellules androgéno-indépendantes DU145 ont la capacité de survivre dans des environnements assez hostiles. Pour induire leur apoptose, plusieurs substances connues pour leurs effets pro-apoptotiques dans des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques ont été testées : doxorubicine, étoposide, puromycine, TRAIL (*Tumor Necrosis Factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), $TNF\alpha$, roténone [Munshi *et al.*, 2002 ; Salido *et al.*, 1999 ; Wu *et al.*, 2002], (et d'après des observations personnelles). Tout d'abord, après un marquage au Hœchst (Matériels et Méthodes §V.2), j'ai observé et quantifié les noyaux apoptotiques. Pour les traitements donnant le pourcentage d'apoptose le plus élevé, j'ai ensuite étudié en cytométrie de flux (Matériels et Méthodes §V.3) la phase subG1 du cycle cellulaire permettant ainsi de quantifier le pourcentage de cellules en apoptose [Kajstura *et al.*, 2007]. J'ai observé que la puromycine (2 μ M) et TRAIL (10 ng/ml) induisent environ 10% d'apoptose et provoquent, au bout de quelques heures, le détachement des cellules DU145 (données non montrées). J'ai donc poursuivi en mesurant la survie cellulaire par la méthode colorimétrique MTS (Matériels et Méthodes §V.1) qui ne prend pas en compte les cellules en suspension. Il faut noter que la survie des cellules DU145 est de 50% et 60% plus faible dans les conditions de traitement par la puromycine et par TRAIL respectivement, par rapport aux conditions contrôles (non traitées). Toutefois, afin d'évaluer le rôle de la PHE dans la survie, je ne présente dans la Figure 28 que les résultats comparant les conditions de traitements par ces substances seules (où la survie est considérée de 100%) ou précédées par un traitement à la PHE. J'ai remarqué qu'un prétraitement de 3 jours par la PHE (10 μ M) suivi d'un traitement de puromycine (2 μ M) pendant 12h et 24h, induit une augmentation du pourcentage de survie cellulaire de 40% et 20% respectivement par rapport à la puromycine seule (Figure 28A). De même, un traitement de PHE précédant TRAIL (12h et 24h) induit respectivement 20% et 40% plus de survie cellulaire comparé au traitement de TRAIL seul (Figure 28B).

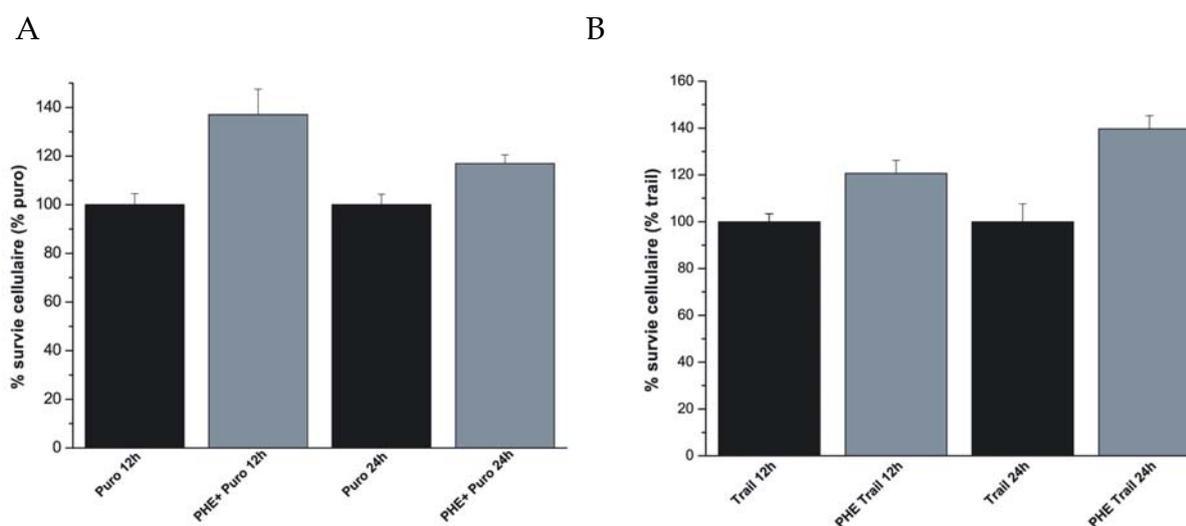


Figure 28. Pourcentage de cellules viables après traitement par la puromycine et TRAIL avec ou sans prétraitement par la PHE

- A. Pourcentage de survie cellulaire des cellules DU145 traitées avec la puromycine (2 μM) pendant 12h et 24h (colonnes noires) (% puro) comparé aux cellules prétraitées pendant 3 jours par la PHE (10 μM) puis par 12h et 24h de puromycine (PHE+Puro) (colonnes grises). Y sont représentées les erreurs standard à la moyenne (sem) de trois expériences.
- B. Pourcentage de survie cellulaire des cellules DU145 traitées avec TRAIL (10 ng/ml) pendant 12h et 24h (colonnes noires) (% trail) comparé aux cellules prétraitées pendant 3 jours par la PHE puis par 12h et 24h de TRAIL (PHE+TRAIL) (colonnes grises). Y sont représentées les erreurs standard à la moyenne (sem) de trois expériences.

Le déclenchement de l'apoptose induit par le détachement cellulaire est connu sous le terme d'anoïkis [Frisch *et al.*, 1994]. L'anoïkis protège à la fois contre la prolifération ectopique des cellules et contre leur migration (événements initiateurs de l'invasion et de la métastase) [Frisch *et al.*, 2001]. En effet, des altérations des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire sont indispensables lors de la formation de métastases [Lawrence *et al.*, 1996 ; Mason *et al.*, 2002]. La cascade métastatique est constituée d'étapes importantes : détachement des cellules des tumeurs primaires, adhésion et invasion de la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins, survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine, adhésion et croissance dans l'organe cible [Fidler, 2003]. Les cellules tumorales arrivant dans la circulation sanguine sont résistantes à l'apoptose (elles surexpriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2) et au détachement et surexpriment certaines molécules d'adhésion (des familles des intégrines, cadhérines et caténines) [Howard *et al.*, 2008]. Concernant les cellules cancéreuses prostatiques, un des mécanismes directement lié à leur potentiel métastatique est la résistance à l'anoïkis [Rennebeck *et al.*, 2005 ; Howard *et*

al., 2008]. Des travaux récemment publiés démontrent la contribution d'une protéine inhibitrice de l'apoptose, la XIAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), dans la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses prostatiques métastatiques [Berezovskaya *et al.*, 2005]. De plus, la surexpression de Bcl-2, de Bcl-XL mais également de la cav-1 dans ces cellules est associée à la résistance à l'anoïkis et la formation de métastases [McDonnell *et al.*, 1992 ; Rothermund *et al.*, 2002 ; Krajewska *et al.*, 1996 ; Coll *et al.*, 2002 ; Castilla *et al.*, 2006 ; Fiucci *et al.*, 2002 ; Ravid *et al.*, 2006].

Une implication dans les mécanismes de métastase prostatique a déjà été décrite pour la noradrénaline *via* les récepteurs β -adrénergiques [Palm *et al.*, 2006]. Les résultats acquis au cours de ma thèse montrent que l'agoniste du α_{1A} -AR (la PHE) induit la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL dans les cellules DU145 (Figure 27). Il est intéressant de noter que les antagonistes des α_1 -AR (doxazosine et terazosine), quant à eux, induisent l'anoïkis et inhibent l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques [Keledjian *et al.*, 2005 ; Keledjian *et al.*, 2003; Tahmatzopoulos *et al.*, 2004]. Pour poursuivre cette étude et montrer si et comment l'activation du α_{1A} -AR est impliquée dans la résistance à l'anoïkis, il serait nécessaire d'étudier l'expression des protéines d'adhésion suite au traitement par la PHE dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes par rapport aux cellules non-traitées. Les données concernant le profil d'expression des protéines d'adhésion dans les cellules à potentiel métastatique sont nombreuses et pourront être utilisées comme références [Pontes-Junior *et al.*, 2009 ; Chu *et al.*, 2008 ; Schmidmaier *et al.*, 2008 ; Rennebeck *et al.*, 2005]. Le potentiel invasif des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes pourrait être évalué en utilisant les chambres de Boyden à gel matriciel. Le passage des cellules d'un compartiment à l'autre, sous l'effet ou non de la PHE, serait ainsi observé après la digestion préalable de la couche séparatrice de gel par les cellules invasives. Le pouvoir d'adhésion des cellules androgéno-indépendantes pourrait être apprécié dans des puits recouverts de protéines matricielles [Kadi *et al.*, 1998].

α_{1A} -AR, cav-1 et cancer de la prostate androgéno-indépendant et neuroendocrine

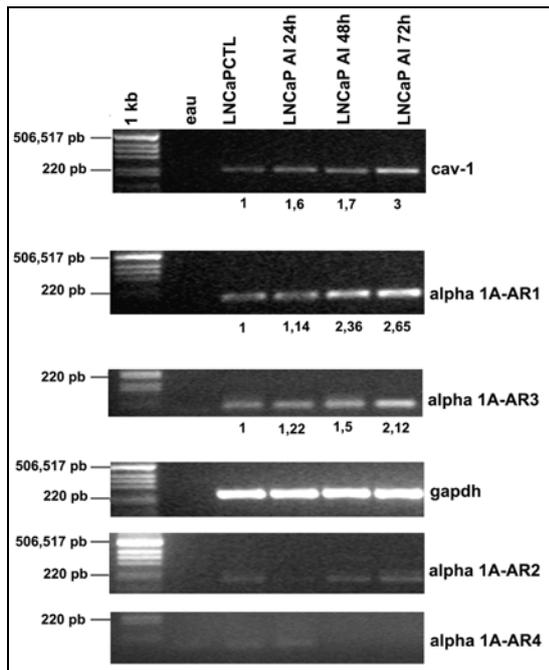
Il est bien établi que l'expression de la cav-1 est étroitement associée à la progression du cancer de la prostate [Yang *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1999 ; Haeusler *et al.*, 2005 ; Karam *et al.*, 2007]. Le gène de la cav-1 est non seulement associé aux métastases mais il participerait à l'augmentation de la survie des cellules prostatiques cancéreuses androgéno-indépendantes [Thompson *et al.*, 1999]. De surcroît, plusieurs publications révèlent l'expression élevée de RCPG et de leurs ligands dans des échantillons prostatiques cancéreux participant à l'initiation et la progression de la pathologie (pour revues [Raj *et al.*, 2002 ; Daaka, 2004]), [Gohji *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2000; Taub *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2003]). Par exemple, une étude récente dans les cellules cancéreuses prostatiques a démontré l'effet anti-apoptotique de l'adrénaline *via* les récepteurs β_2 -AR [Sastry *et al.*, 2007].

Le stade avancé du cancer de la prostate, associé à un mauvais pronostic clinique, est accompagné d'une prévalence de cellules neuroendocrines capables de sécréter, entre autres, des ligands des RCPG tels que la bombésine et la neurotensine [Amorino *et al.*, 2004 ; Bonkhoff *et al.*, 1991]. De plus, il a été démontré que les métastases du cancer prostatique se propagent le long de projections nerveuses qui peuvent être la source de neuropeptides pouvant activer les RCPG [Ayala *et al.*, 2006]. Néanmoins, l'expression du α_{1A} -AR dans la progression pathologique de la prostate est peu explorée. Sachant que le α_{1A} -AR peut être localisé dans les cavéoles (Figure 1, article), il peut être supposé que son expression puisse évoluer comme celle de la cav-1 lors du cancer de la prostate. Mes résultats d'immunolocalisation et de RT-PCR sur des échantillons de tissu cancéreux démontrent, en effet, une corrélation positive entre le niveau d'expression du α_{1A} -AR et les cellules épithéliales luminales et androgéno-indépendantes des stades avancés du cancer de la prostate (Figure 5, article).

Comme il a été exposé dans la partie introductive de ma thèse (§I.5.2a), la progression maligne du cancer de la prostate vers un état androgéno-indépendant s'accompagne d'une transdifférenciation (processus de changement d'un type cellulaire différencié vers un autre type cellulaire ayant une fonction et un phénotype différent) neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques [Yuan *et al.*, 2007]. J'ai étudié par immunofluorescence plusieurs échantillons prostatiques cancéreux à la recherche de cellules neuroendocrines afin d'y étudier le profil d'expression du α_{1A} -AR. De plus, l'évolution de l'expression des ARNm de la cav-1 et des quatre isoformes du α_{1A} -AR a été suivie par RT-PCR lors de l'induction de la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes. J'ai utilisé

ici la lignée LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*, ATCC), isolée à partir de nodules lymphatiques métastasés chez un homme de 50 ans atteint d'un carcinome prostatique, qui exprime le récepteur aux androgènes et des marqueurs de cellules prostatiques tels que le PSA et la PAP [Horoszewicz *et al.*, 1983]. Il est possible d'induire la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP par un traitement augmentant le taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire. Le traitement associe le *dibutyryl-AMPC* (db-AMPC, 1 mM) ou le *8-bromo-AMPC* (8-br-AMPC, 1 mM), des analogues perméants de l'AMPC et l'*isobutylméthylxanthine* (IBMX, 100 μ M), un inhibiteur des phosphodiésterases [Goodin *et al.*, 2002 ; Bang *et al.*, 1994 ; Gackiere *et al.*, 2008]. Tout d'abord, l'expression de l'ARNm de la cav-1 augmente jusqu'à trois fois après 3 jours de traitement induisant la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP (Figure 29A). En ce qui concerne le α_{1A} -AR, l'expression des ARNm des isoformes 1 et 3 augmente d'environ deux fois et demi dans les cellules ayant subi le traitement 8-br-AMPC /IBMX pendant 3 jours par rapport aux cellules androgéno-dépendantes LNCaP (contrôles) (l'expression des ARNm des isoformes 2 et 4 étant trop faible pour être quantifiée). En accord avec ces résultats de RT-PCR, j'ai observé par immunofluorescence sur des coupes de prostate cancéreuse que certains acini cancéreux présentent des foyers de cellules neuroendocrines, exprimant un marqueur spécifique : la sérotonine (5-HT) (Figure 29B, en vert). Ces cellules expriment également le α_{1A} -AR (Figure 29B, en rouge) et la colocalisation des deux protéines est visible en jaune.

A



B

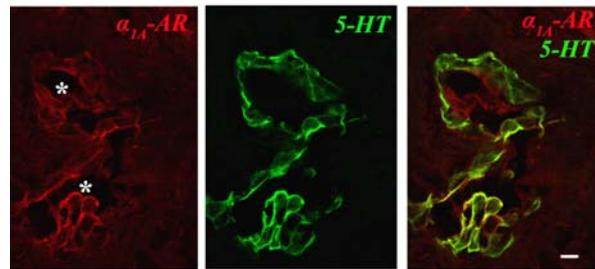


Figure 29. Expression des différentes isoformes du α_{1A} -AR et de la cav-1 dans les cellules prostatiques épithéliales cancéreuses

A. Expression des ARNm des quatre isoformes du α_{1A} -AR et de la cav-1 dans les LNCaP contrôles (CTL) et androgéno-indépendantes (AI) suite au traitement AMPc-IBMX pendant 24h, 48h et 72h. Les quantités d'ARNm sont normalisées par rapport à la GAPDH utilisée comme contrôle interne (valeurs sous gels pour cav-1, α_{1A} -AR isoformes 1 et 3 (α_{1A} -AR 1 et 3)).

B. Colocalisation en microscopie confocale du α_{1A} -AR (en rouge) et de la 5-HT (en vert) un marqueur des cellules neuroendocrines. Ces cellules sont regroupées en foyer dans la lumière de l'acinus prostatique (astérisques). Barre = 5 μ m.

Il est connu que les cellules cancéreuses neuroendocrines n'expriment pas le récepteur aux androgènes et sont alors androgéno-indépendantes [Bonkhoff *et al.*, 1993 ; Komiya *et al.*, 2009]. Dès lors, la différenciation neuroendocrine constitue un des mécanismes majeurs de l'échappement hormonal du cancer de la prostate [Debes *et al.*, 2004]. L'expression du α_{1A} -AR dans les cellules neuroendocrines n'est pas surprenante étant donné qu'elles sont innervées par des neurones adrénergiques [Ventura *et al.*, 2002]. D'ailleurs, il a été publié que la noradrénaline provoque des courants calciques *via* des canaux calciques voltage-dépendants [Kim *et al.*, 2003], canaux qui sont impliqués dans la sécrétion des cellules neuroendocrines cancéreuses prostatiques comme il a été récemment démontré au laboratoire [Gackiere *et al.*, 2008]. Il est connu que les cellules cancéreuses neuroendocrines sécrètent des neurohormones, des neuropeptides tels que la bombésine, la neurotensine, la sérotonine

qui déclenchent des réponses de survie et de croissance dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes [Amorino *et al.*, 2004]. Suite à mes observations sur l'expression du α_{1A} -AR dans les cellules cancéreuses neuroendocrines (Figure 29), il peut être supposé que les catécholamines libérées par les terminaisons nerveuses environnantes activent le récepteur et participent à la résistance à l'apoptose de ces cellules androgéno-indépendantes. De surcroît, il est possible que ces catécholamines soient sécrétées par les cellules neuroendocrines elles-mêmes agissant de façon autocrine et paracrine sur la survie des cellules cancéreuses avoisinantes. Il serait donc indispensable de doser les catécholamines (noradrénaline et adrénaline) sécrétées par les cellules différenciées neuroendocrines, par exemple par HPLC (*Chromatographie Liquide Haute Performance*) suivie de détection électrochimique [Tsai *et al.*, 2000]. Il serait également nécessaire d'étudier l'expression de la cav-1 et de déterminer son rôle dans la signalisation du α_{1A} -AR dans les cellules neuroendocrines cancéreuses.

α_{1A} -AR et ses voies de signalisation

Les résultats des recherches fondamentales et cliniques ont démontré que, dans les carcinomes prostatiques androgéno-indépendants, le récepteur aux androgènes peut toujours être activé malgré les thérapies hormonales consistant à diminuer les niveaux des androgènes circulants [Grossmann *et al.*, 2001]. La surexpression et la présence fréquente de mutations de ce récepteur expliquent, en partie, ces observations [Feldman *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2000]. De façon intéressante, de nombreuses études indiquent que des facteurs autres que les androgènes sont capables d'exercer leurs effets sur les cellules cibles en agissant sur leurs récepteurs membranaires et en activant la transcription de gènes normalement régulés par le récepteur aux androgènes [Raj *et al.*, 2002; Feldman *et al.*, 2001 ; Djakiew, 2000 ; Culig *et al.*, 1994].

L'implication des RCPG dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate est de plus en plus évidente [Raj *et al.*, 2002 ; Pierce *et al.*, 2002 ; Yowell *et al.*, 2002]. Pendant longtemps, il était pensé que la signalisation des RCPG était liée au simple système des seconds messagers mais la complexité des mécanismes moléculaires par lesquels les RCPG propagent leurs signaux est désormais admise [Marinissen *et al.*, 2001 ; Spiegelberg *et al.*, 2007]. Leur activation stimulerait un grand nombre de voies de signalisation interconnectées induisant l'activation de MAPK et jouant un rôle sur le contrôle de l'expression de certains gènes régulant ainsi la différenciation, l'apoptose ou la survie mais aussi la croissance cellulaire aberrante (pour revue [Daaka, 2004]). Ces effets fonctionnels sont le résultat d'un réseau de signalisation complexe, dépendant fortement du niveau d'expression du récepteur, de sa spécificité de couplage ainsi que du répertoire des molécules de signalisation exprimées dans chaque système cellulaire.

Il est établi que les protéines kinases ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) sont surexprimées dans les stades avancés du cancer prostatique et jouent un rôle important dans la tumorigenèse de cet organe [Gioeli *et al.*, 1999 ; Price *et al.*, 1999]. Cette famille de sérine/thréonine kinases transmet des signaux régulant la survie et la croissance cellulaire [Shaul *et al.*, 2007]. Dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes, l'activation de la voie ERK par les RCPG surviendrait par des mécanismes complexes pouvant impliquer non seulement les protéines G_α mais aussi les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ [Gutkind, 2000 ; Bookout *et al.*, 2003].

Très récemment, il a été démontré que le α_{1B} -AR active ERK dans les cellules glandulaires submandibulaires et ceci de façon dépendante du cholestérol, donc dépendante

de l'intégrité des microdomaines membranaires [Bruchas *et al.*, 2008]. Je me suis alors intéressée à l'éventuelle activation de ERK1/ERK2 (ou p44/p42 MAPK) suite à la stimulation du α_{1A} -AR dans les cellules DU145. Pour ce faire, après un traitement à long terme par la PHE, j'ai recherché l'activation de ERK1/2 en Western-blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées, c'est-à-dire actives, de ERK1/2 (Figure 30). Les niveaux endogènes totaux de ERK1/2, détectés à l'aide d'un anticorps spécifique, ont servi de contrôle interne pour la quantification des formes actives. Il est à noter qu'un traitement de 3 jours de PHE induit l'activation par phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules DU145 (Figure 30).

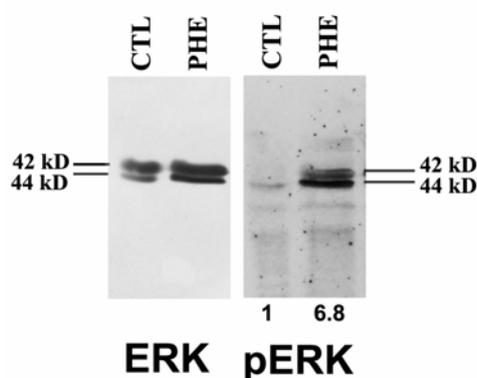


Figure 30. Western-blot de ERK1/ERK2 (p44/p42 MAPK)

Les protéines totales ERK1/2 à 44 kD et 42 kD (**ERK**) ont été détectées dans les cellules DU145 non traitées (CTL) et traitées pendant 3 jours à la phényléphrine à 10 μ M (PHE). Les formes actives donc phosphorylées de ERK1/2 (**pERK**) ont été détectées dans les mêmes conditions. Les valeurs indiquent les densités relatives de ERK1/2 phosphorylées pour la condition traitée à la PHE par rapport au contrôle.

Il est proposé que les facteurs induisant le renouvellement des phosphatidylinositols génèreraient deux voies indépendantes pour activer les MAPK : l'une *via* le Ca^{2+} [Chao *et al.*, 1992 ; Mitchell *et al.*, 1995] et l'autre *via* la signalisation DAG/PKC [Cadwallader *et al.*, 1997]. L'interaction et le fonctionnement (antagoniste/synergique/additif) de ces deux voies ne sont pas connus à ce jour [Chao *et al.*, 1992]. Il est néanmoins connu que l'activation des récepteurs couplés aux protéines $G_{q/11}$ (tels que le α_{1A} -AR) induit la formation du DAG, capable d'activer la PKC [Berridge *et al.*, 1984] qui, à son tour, active ERK [Kolch *et al.*, 1993], (pour revue [Shaul *et al.*, 2007]). En ce qui concerne le α_{1A} -AR, il a été démontré que la libération du Ca^{2+} et l'activation de la PKC ne sont ni nécessaires ni suffisantes pour que le α_{1A} -AR induise l'activation des réponses mitogènes des cellules PC12 [Berts *et al.*, 1999]. Ces données corroborent mes résultats sur l'absence de réponse calcique détectable après

stimulation du α_{1A} -AR par la PHE (voir résultats préalables) tout en observant la surexpression de Bcl-2 et Bcl-XL (Figure 27) ainsi que l'activation de ERK1/2 (Figure 30). Bien évidemment, ces derniers résultats nécessitent d'être approfondis afin de vérifier si la voie ERK est impliquée dans la survie des cellules DU145. Pour cela, des mesures d'apoptose (par cytométrie de flux, comptage au Hœchst et kit de mesure de l'activité des caspases) seront nécessaires tout en utilisant l'inhibiteur spécifique de la phosphorylation de ERK1/2, le PD98059. Il sera également indispensable de déterminer l'implication éventuelle de la PKC dans la voie de résistance à l'apoptose induite par la PHE dans ces cellules. Pour cela, des activateurs (PMA, Phorbol 12-Myristate 13-Acétate, à des concentrations nanomolaires) et des inhibiteurs (Gö6976) de la PKC pourront être utilisés.

α_{1A} -AR et son expression génique

Pour mieux comprendre l'ensemble des données présentées, je vais aborder un autre point capital qui est la régulation de l'expression génique du α_{1A} -AR. Contrairement aux α_{1B} -AR et α_{1D} -AR, qui sont eux exprimés sous la forme de récepteur unique, quatre isoformes du α_{1A} -AR ont été isolées à partir de l'ADNc de prostate humaine mais aussi d'autres tissus comme le foie, le cœur et les reins [Chang *et al.*, 1998]. Les isoformes 2, 3 et 4 diffèrent de l'isoforme 1 au niveau de la longueur et de la séquence de la région C-terminale mais toutes les isoformes possèdent les mêmes profils pharmacologiques et la même capacité à mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire après stimulation par l'agoniste [Chang *et al.*, 1998 ; Hirasawa *et al.*, 1995]. L'importance physiologique de ces variants d'épissage alternatif n'est pas connue pour le moment. Il est simplement suggéré que, puisque ces quatre isoformes ne diffèrent que dans leur région C-terminale, ils peuvent se distinguer par leur préférence de couplage à telle ou telle protéine G. En effet, une telle différence dans la longueur de la partie C-ter est retrouvée au sein des différentes isoformes du récepteur à la prostaglandine EP3 ayant pour conséquence le couplage avec des protéines G spécifiques [Namba *et al.*, 1993]. De plus, il a été mis en évidence l'existence d'isoformes tronquées non fonctionnelles du α_{1A} -AR [Coge *et al.*, 1999]. Leur co-expression avec la forme complète du récepteur (α_{1A-1} -AR) dans les cellules peut avoir plusieurs conséquences sur les fonctions biologiques du récepteur : entre autres sur le trafic du α_{1A-1} -AR vers la membrane plasmique et la capacité de liaison (« binding ») du récepteur avec son agoniste [Coge *et al.*, 1999]. Dans ce travail, il est proposé que par des interactions directes avec α_{1A-1} -AR, les isoformes tronquées pourraient réguler de façon spécifique et précise les propriétés biologiques du récepteur. La régulation génique du α_{1A} -AR ne s'arrête pas là : neuf polymorphismes naturels, SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), ont été décrit pour le gène du α_{1A} -AR chez l'homme [Lei *et al.*, 2005]. Ces variations génétiques seraient responsables d'altérations des fonctions biologiques du récepteur et auraient un rôle très important dans le développement des certaines pathologies impliquant le α_{1A} -AR [Lei *et al.*, 2005].

Je me suis ensuite intéressée à étudier l'expression du α_{1A} -AR au niveau protéique total des cellules DU145 par rapport à son expression au niveau de la membrane plasmique après biotinylation des protéines de surface. Pour rappel, aucune réponse calcique n'a été observée dans ces cellules après stimulation du α_{1A} -AR par son agoniste la PHE (Figure 25). Par contre, dans les cellules Huh-7 issues d'une lignée hépatocytaire, exprimant le α_{1A} -AR de façon endogène, une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire a été enregistrée suite à la stimulation du récepteur (résultats non montrés). Les cellules Huh-7 m'ont donc servies de

contrôle positif. Suite à l'extraction des protéines totales, j'ai observé par Western-blot et grâce à l'utilisation de l'anticorps spécifiquement dirigé contre le α_{1A} -AR, la présence d'une bande à 51,5 kD dans les cellules DU145 et les cellules Huh-7. De plus, seulement dans les cellules DU145 j'ai remarqué la présence d'une bande, faiblement exprimée, à 47 kD (Figure 31, pistes des protéines totales des cellules DU145 et Huh-7). De façon intéressante, après biotinylation de surface des deux lignées cellulaires, j'ai détecté uniquement la bande à 51,5 kD dans les Huh-7 et celle à 47 kD dans les cellules DU145 (Figure 31, pistes des protéines biotinylées des cellules DU145 et Huh-7). Il est connu que la forme à 51,5 kD (466 aa) correspond à la forme complète du α_{1A} -AR, l'isoforme 1 (α_{1A-1} -AR) [Hirasawa *et al.*, 1993]. La forme de 47 kD exprimée à la surface des cellules DU145 pourrait correspondre à l'isoforme 3 du α_{1A} -AR (429 aa) [Chang *et al.*, 1998].

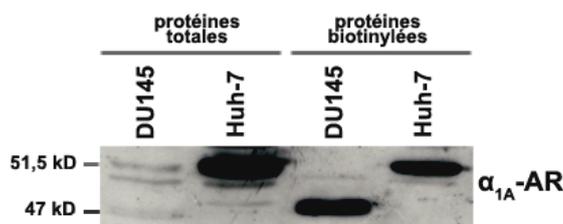


Figure 31. Western-blot du α_{1A} -AR dans les cellules DU145 et Huh-7

Le α_{1A} -AR après extraction des protéines totales dans les cellules DU145 est détecté sous forme d'une bande à 51,5 kD et une bande plus faible à 47 kD. Cette dernière est retrouvée dans les cellules DU145 après biotinylation de surface. Dans les cellules Huh-7 une bande majoritaire est détectée à 51,5 kD que ce soit après extraction des protéines totales ou après biotinylation de surface des Huh-7.

La « signification » de la présence de cette forme de 47 kD à la surface des cellules DU145 nécessite d'être explorée. Dans la Figure 25, la surexpression de la forme complète du α_{1A} -AR (α_{1A-1} -AR) dans les cellules DU145 stimulées par la PHE suffit à induire un influx calcique par opposition aux cellules « contrôles ». Nous suggérons que même si la forme complète du α_{1A} -AR est présente au sein des cellules DU145, le fait de ne retrouver que la forme de 47 kD à la membrane plasmique pourrait signifier une anomalie au niveau du trafic du récepteur complet vers la membrane, comme c'est le cas suite à l'interaction du α_{1A-1} -AR avec certaines isoformes tronquées [Coge *et al.*, 1999]. En outre, étant donné que les isoformes du α_{1A} -AR diffèrent dans leur domaine C-terminal, une autre de nos hypothèses est que la forme de 47 kD pourrait s'associer à une protéine G différente de la protéine $G_{q/11}$ ce qui expliquerait l'absence d'un influx calcique. Des études en biologie moléculaire permettant

le séquençage du α_{1A} -AR seront indispensables afin d'identifier la forme ou l'isoforme du récepteur exprimée à la membrane plasmique des cellules DU145. Des études plus approfondies sur la caractérisation des molécules de signalisation couplées au récepteur seront indispensables pour définir les premières étapes de la voie de transduction de ce récepteur.

L'existence d'un grand nombre d'isoformes (12 décrites à ce jour, [Coge *et al.*, 1999]) pouvant interférer avec le α_{1A-1} -AR suggère que ces isoformes puissent jouer un rôle dans certaines pathologies. Mes résultats sur l'expression des ARNm des quatre isoformes sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les niveaux d'expression des isoformes dans la prostate peuvent varier selon l'état pathologique (par exemple entre prostate normale et cancéreuse à stades différents) apportant ainsi une explication moléculaire pour l'initiation ou le développement de la pathologie [Chang *et al.*, 1998 ; Coge *et al.*, 1999].

CONCLUSION GENERALE

Lorsqu'un nouveau projet est entrepris, son évolution n'est pas prévisible. Le début de ma thèse a été accompagné de résultats allant à l'encontre de l'hypothèse initialement posée qui ont servi, finalement, à tracer la progression de mon sujet. Ma thèse s'est donc structurée grâce à mes résultats expérimentaux, aux données bibliographiques (récentes et plus anciennes) et à l'échange d'idées avec certains collègues.

Les travaux que j'ai réalisés ont contribué à élargir les connaissances sur le récepteur α_{1A} -adrénergique et son rôle au sein des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes DU145. Dans ce modèle cellulaire, j'ai montré que le récepteur α_{1A} -adrénergique : 1) n'est pas associé (fonctionnellement ou physiquement) au canal TRPC6, 2) est majoritairement localisé dans des structures membranaires de type cavéoles, 3) participe à la résistance à l'apoptose cellulaire induite par un stress réticulaire provoqué par la thapsigargine et 4) est surexprimé, avec la cavéoline-1, dans les cellules épithéliales lumineales cancéreuses des stades avancés du cancer de la prostate (article). Mes résultats de thèse renforcent les connaissances sur l'importance des cavéoles dans la progression maligne du cancer prostatique et apportent des preuves quant à leur implication dans la signalisation du récepteur α_{1A} -adrénergique.

Par ailleurs, l'évolution de mon sujet de thèse a soulevé un grand nombre de questions auxquelles de plus amples investigations sont nécessaires afin d'y répondre. De quelle façon le récepteur α_{1A} -adrénergique participe-t-il à la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes ? Quelle est la relation entre les cellules neuroendocrines, le récepteur α_{1A} -adrénergique et ses ligands ? Quelle forme ou isoforme du récepteur α_{1A} -adrénergique, responsable pour la fonction de résistance à l'apoptose, est exprimée dans les cellules androgéno-indépendantes ? Quelle est la cascade de signalisation, indépendante d'une entrée calcique, reliant l'activation du récepteur α_{1A} -adrénergique *via* les cavéoles et les protéines intracellulaires impliquées dans la survie de ces cellules cancéreuses ?

Dans les systèmes cellulaires aussi dérégulés que les cellules cancéreuses, il n'est pas surprenant que de nouvelles voies, régulant la croissance et la survie cellulaire, soient découvertes tous les jours. Ma thèse en constitue un exemple et ouvre de nombreuses perspectives notamment pour une meilleure caractérisation cellulaire et moléculaire du pouvoir de survie des cellules androgéno-indépendantes.

**PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS
PERSONNELLES**

Publications :

Katsogiannou M., El Boustany C., Gackière F., *et al.*, Implication of caveolae in the apoptosis resistance role of the α_{1A} -adrenoceptor in androgen-independent prostate cancer cells. En revision pour publication dans *PLoS ONE*.

Gackiere F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, **Katsogiannou M.**, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoi-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P: CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells, *J Biol Chem* 2008, 283:10162-10173

Florian Gackière, **Maria Katsogiannou.** Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Christian Slommiany, Nathalie Jouy, Morad Roudbaraki, Sandrine Humez, Natalia Prevarsakaya and Pascal Mariot. "Functional coupling between large-conductance potassium channels and CaV3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell proliferation". Soumis à *J Physiol*.

Charbel El Boustany, **Maria Katsogiannou** et al. "Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells". Soumis à *J Biol Chem*.

Communications affichées :

Implication of lipid rafts in calcium signalling in human prostate cells. M. Katsogiannou, A. Crépin, E. Dewailly and C. Slomianny. Workshop EMBO (European Molecular Biology Organization) : « Cell Membrane Organization and Dynamics ». *Juin 2006, Bilbao, Espagne.*

Modification of lipid rafts induced by phenylephrine in human prostate cells. M. Katsogiannou, A. Crépin, E. Dewailly and C. Slomianny. Congrès du « French Society of Cell Biology » : Lipid Functions in Membrane Dynamics, *Novembre 2005, Paris, France.*

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsson, P.A. 1996. Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl.* 6:3-8.
- Abrahamsson, P.A. 1999. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer.* 6:503-19.
- Ambudkar, I.S. 2004. Cellular domains that contribute to Ca²⁺ entry events. *Sci STKE.* 2004:pe32.
- Ambudkar, I.S. 2006. Ca²⁺ signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol Sci.* 27:25-32.
- Ambudkar, I.S., S.C. Brazer, X. Liu, et al. 2004. Plasma membrane localization of TRPC channels: role of caveolar lipid rafts. *Novartis Found Symp.* 258:63-70; discussion 70-4, 98-102, 263-6.
- Amirghofran, Z., A. Monabati, and N. Gholijani. 2004. Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer. *Pathol Oncol Res.* 10:37-41.
- Amorino, G.P., P.D. Deeble, and S.J. Parsons. 2007. Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway. *Oncogene.* 26:745-56.
- Amorino, G.P., and S.J. Parsons. 2004. Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 14:287-300.
- Anderson, R.G. 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10909-13.
- Anderson, R.G. 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem.* 67:199-225.
- Anderson, R.G., and K. Jacobson. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* 296:1821-5.
- Anderson, R.G., B.A. Kamen, K.G. Rothberg, et al. 1992. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science.* 255:410-1.
- Andersson, K.E., H. Lepor, and M.G. Wyllie. 1997. Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity. *Prostate.* 30:202-15.
- Andriole, G., N. Bruchofsky, L.W. Chung, et al. 2004. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 172:1399-403.
- Anglin, I.E., D.T. Glassman, and N. Kyprianou. 2002. Induction of prostate apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 5:88-95.
- Arbuzova, A., L. Wang, J. Wang, et al. 2000. Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry.* 39:10330-9.
- Arnold, J.T., and J.T. Isaacs. 2002. Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr Relat Cancer.* 9:61-73.
- Arver, S., and R. Eliasson. 1982. Zinc and zinc ligands in human seminal plasma. II. Contribution by ligands of different origin to the zinc binding properties of human seminal plasma. *Acta Physiol Scand.* 115:217-24.
- Ash, D. 2005. Advances in radiotherapy for prostate cancer. *Br J Radiol.* 78 Spec No 2:S112-6.
- Ayala, G.E., H. Dai, S.A. Tahir, et al. 2006. Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 66:5159-64.
- Bachmann, I.M., O.J. Halvorsen, K. Collett, et al. 2006. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol.* 24:268-73.

- Bang, Y.J., F. Pirnia, W.G. Fang, et al. 1994. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:5330-4.
- Bartz, R., J. Zhou, J.T. Hsieh, et al. 2008. Caveolin-1 secreting LNCaP cells induce tumor growth of caveolin-1 negative LNCaP cells in vivo. *Int J Cancer*. 122:520-5.
- Battaglia, S., A.M. Casali, and A.R. Botticelli. 1994. Age-related distribution of endocrine cells in the human prostate: a quantitative study. *Virchows Arch*. 424:165-8.
- Beech, D.J. 2005. TRPC1: store-operated channel and more. *Pflugers Arch*. 451:53-60.
- Bender, F.C., M.A. Reymond, C. Bron, et al. 2000. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res*. 60:5870-8.
- Berezovskaya, O., A.D. Schimmer, A.B. Glinskii, et al. 2005. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res*. 65:2378-86.
- Berger, R., P.G. Febbo, P.K. Majumder, et al. 2004. Androgen-induced differentiation and tumorigenicity of human prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 64:8867-75.
- Berridge, M.J. 1981. Phosphatidylinositol hydrolysis and calcium signaling. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 14:289-99.
- Berridge, M.J. 1981. Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. *Mol Cell Endocrinol*. 24:115-40.
- Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361:315-25.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman, and P. Lipp. 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 395:645-8.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:517-29.
- Berridge, M.J., and R.F. Irvine. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*. 312:315-21.
- Berts, A., H. Zhong, and K.P. Minneman. 1999. No role for Ca⁺⁺ or protein kinase C in alpha-1A adrenergic receptor activation of mitogen-activated protein kinase pathways in transfected PC12 cells. *Mol Pharmacol*. 55:296-303.
- Betz, R.C., B.G. Schoser, D. Kasper, et al. 2001. Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet*. 28:218-9.
- Blomme, E.A., Y. Sugimoto, L.K. McCauley, et al. 1998. Stromal and epithelial cells of the canine prostate express parathyroid hormone-related protein, but not the PTH/PTHrP receptor. *Prostate*. 36:110-20.
- Bonkhoff, H., U. Stein, and K. Remberger. 1993. Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 423:291-4.
- Bonkhoff, H., N. Wernert, G. Dhom, et al. 1991. Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate*. 19:91-8.
- Bookout, A.L., A.E. Finney, R. Guo, et al. 2003. Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *J Biol Chem*. 278:37569-73.
- Bracken, A.P., D. Pasini, M. Capra, et al. 2003. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J*. 22:5323-35.
- Brandt-Rauf, P.W., and M.R. Pincus. 1998. Molecular markers of carcinogenesis. *Pharmacol Ther*. 77:135-48.
- Brazer, S.C., B.B. Singh, X. Liu, et al. 2003. Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca²⁺ influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem*. 278:27208-15.

- Breckenridge, D.G., M. Germain, J.P. Mathai, et al. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 22:8608-18.
- Bretscher, M.S., and S. Munro. 1993. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*. 261:1280-1.
- Brown, D.A., and E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:111-36.
- Brown, D.A., and J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 68:533-44.
- Bruchas, M.R., M.L. Toews, C.S. Bockman, et al. 2008. Characterization of the alpha1-adrenoceptor subtype activating extracellular signal-regulated kinase in submandibular gland acinar cells. *Eur J Pharmacol*. 578:349-58.
- Bruckheimer, E.M., and N. Kyprianou. 2000. Apoptosis in prostate carcinogenesis. A growth regulator and a therapeutic target. *Cell Tissue Res*. 301:153-62.
- Bruyere, F., G. Cariou, J.P. Boiteux, et al. 2008. [Acute prostatitis]. *Prog Urol*. 18 Suppl 1:19-23.
- Bunemann, M., K.B. Lee, R. Pals-Rylaarsdam, et al. 1999. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*. 61:169-92.
- Bylund, D.B. 2007. Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293:E1479-81.
- Byrne, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 9:777-94.
- Cabrespine, A., L. Guy, P. Chollet, et al. 2004. [Molecular mechanisms involved in hormone resistance of prostate cancer]. *Bull Cancer*. 91:747-57.
- Cadwallader, K., J. Beltman, F. McCormick, et al. 1997. Differential regulation of extracellular signal-regulated protein kinase 1 and Jun N-terminal kinase 1 by Ca²⁺ and protein kinase C in endothelin-stimulated Rat-1 cells. *Biochem J*. 321 (Pt 3):795-804.
- Capiod, T., Y. Shuba, R. Skryma, et al. 2007. Calcium signalling and cancer cell growth. *Subcell Biochem*. 45:405-27.
- Casey, P.J. 1995. Protein lipidation in cell signaling. *Science*. 268:221-5.
- Castilla, C., B. Congregado, D. Chinchon, et al. 2006. Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology*. 147:4960-7.
- Cato, A.C., A. Nestl, and S. Mink. 2002. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*. 2002:RE9.
- Ceraline, J., M.D. Cruchant, E. Erdmann, et al. 2004. Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer*. 108:152-7.
- Chang, D.J., T.K. Chang, S.S. Yamanishi, et al. 1998. Molecular cloning, genomic characterization and expression of novel human alpha1A-adrenoceptor isoforms. *FEBS Lett*. 422:279-83.
- Chao, T.S., K.L. Byron, K.M. Lee, et al. 1992. Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 267:19876-83.
- Chapple, C.R., R.P. Burt, P.O. Andersson, et al. 1994. Alpha 1-adrenoceptor subtypes in the human prostate. *Br J Urol*. 74:585-9.
- Chiang, C.F., E.L. Son, and G.J. Wu. 2005. Oral treatment of the TRAMP mice with doxazosin suppresses prostate tumor growth and metastasis. *Prostate*. 64:408-18.
- Chien, J., Y. Ren, Y. Qing Wang, et al. 2001. Calcitonin is a prostate epithelium-derived growth stimulatory peptide. *Mol Cell Endocrinol*. 181:69-79.

- Chini, B., and M. Parenti. 2004. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol.* 32:325-38.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 151:10-27.
- Chu, K., C.J. Cheng, X. Ye, et al. 2008. Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res.* 6:1259-67.
- Chun, M., U.K. Liyanage, M.P. Lisanti, et al. 1994. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11728-32.
- Claing, A., S.A. Laporte, M.G. Caron, et al. 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol.* 66:61-79.
- Clinton, S.K., and E. Giovannucci. 1998. Diet, nutrition, and prostate cancer. *Annu Rev Nutr.* 18:413-40.
- Coge, F., S.P. Guenin, A. Renouard-Try, et al. 1999. Truncated isoforms inhibit [3H]prazosin binding and cellular trafficking of native human alpha1A-adrenoceptors. *Biochem J.* 343 Pt 1:231-9.
- Cohen, A.W., R. Hnasko, W. Schubert, et al. 2004. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 84:1341-79.
- Cohen, R.J., G. Glezerson, L.F. Taylor, et al. 1993. The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *J Urol.* 150:365-8.
- Coll, M.L., K. Rosen, V. Ladeda, et al. 2002. Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene.* 21:2908-13.
- Collett, K., G.E. Eide, J. Arnes, et al. 2006. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 12:1168-74.
- Couet, J., M.M. Belanger, E. Roussel, et al. 2001. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv Drug Deliv Rev.* 49:223-35.
- Crepin, A., G. Bidaux, F. Vanden-Abeelee, et al. 2007. Prolactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression. *Biochem J.* 401:49-55.
- Culig, Z., A. Hobisch, M.V. Cronauer, et al. 1994. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 54:5474-8.
- Cunha, G.R., S.W. Hayward, Y.Z. Wang, et al. 2003. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer.* 107:1-10.
- Daaka, Y. 2004. G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE.* 2004:re2.
- de Almeida, R.F., L.M. Loura, A. Fedorov, et al. 2005. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol.* 346:1109-20.
- Debes, J.D., and D.J. Tindall. 2004. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* 351:1488-90.
- Devlin, H.L., and M. Mudryj. 2008. Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett.*
- Di Sant'agnese, P.A. 1991. Endocrine-paracrine (APUD, neuroendocrine) cells in the normal and pathologic prostate. *Bull Assoc Anat (Nancy).* 75:63-7.
- di Sant'Agnes, P.A. 1992. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer.* 70:254-68.
- Dixon, R.A., I.S. Sigal, E. Rands, et al. 1987. Ligand binding to the beta-adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature.* 326:73-7.

- Djakiew, D. 2000. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate*. 42:150-60.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, et al. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 293:2449-52.
- Elzanaty, S., J. Richthoff, J. Malm, et al. 2002. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod*. 17:2904-11.
- Engelman, J.A., C. Chu, A. Lin, et al. 1998. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett*. 428:205-11.
- Engelman, J.A., R.J. Lee, A. Karnezis, et al. 1998. Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J Biol Chem*. 273:20448-55.
- English, H.F., R.J. Santen, and J.T. Isaacs. 1987. Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate*. 11:229-42.
- Escriba, P.V. 2006. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol Med*. 12:34-43.
- Estrada, M., P. Uhlen, and B.E. Ehrlich. 2006. Ca²⁺ oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. *J Cell Sci*. 119:733-43.
- Faber, J.E., C.L. Szymeczek, S. Cotecchia, et al. 2007. Alpha1-adrenoceptor-dependent vascular hypertrophy and remodeling in murine hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292:H2316-23.
- Farnsworth, W.E. 1999. Prostate stroma: physiology. *Prostate*. 38:60-72.
- Fasolato, C., B. Innocenti, and T. Pozzan. 1994. Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci*. 15:77-83.
- Feldman, B.J., and D. Feldman. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 1:34-45.
- Feron, O., T.W. Smith, T. Michel, et al. 1997. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 272:17744-8.
- Fidler, I.J. 1990. Host and tumour factors in cancer metastasis. *Eur J Clin Invest*. 20:481-6.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3:453-8.
- Fielding, C.J., A. Bist, and P.E. Fielding. 1997. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:3753-8.
- Fielding, C.J., and P.E. Fielding. 1997. Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res*. 38:1503-21.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-11.
- Fiucci, G., D. Ravid, R. Reich, et al. 2002. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene*. 21:2365-75.
- Fleisch, M.C., C.A. Maxwell, and M.H. Barcellos-Hoff. 2006. The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocr Relat Cancer*. 13:379-400.
- Foglar, R., K. Shibata, K. Horie, et al. 1995. Use of recombinant alpha 1-adrenoceptors to characterize subtype selectivity of drugs for the treatment of prostatic hypertrophy. *Eur J Pharmacol*. 288:201-7.

- Fong, C.J., E.R. Sherwood, E.J. Braun, et al. 1992. Regulation of prostatic carcinoma cell proliferation and secretory activity by extracellular matrix and stromal secretions. *Prostate*. 21:121-31.
- Ford, A.P., D.V. Daniels, D.J. Chang, et al. 1997. Pharmacological pleiotropism of the human recombinant alpha1A-adrenoceptor: implications for alpha1-adrenoceptor classification. *Br J Pharmacol*. 121:1127-35.
- Fournier, G., A. Valeri, P. Mangin, et al. 2004. [Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology]. *Ann Urol (Paris)*. 38:187-206.
- Fra, A.M., E. Williamson, K. Simons, et al. 1995. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8655-9.
- Frank, P.G., S. Pavlides, M.W. Cheung, et al. 2008. Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295:C242-8.
- Freeman, M.R., B. Cinar, and M.L. Lu. 2005. Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 16:273-9.
- Freeman, M.R., and K.R. Solomon. 2004. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem*. 91:54-69.
- Frisch, S.M., and H. Francis. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. 124:619-26.
- Frisch, S.M., and R.A. Screaton. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 13:555-62.
- Fujimoto, T. 1993. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol*. 120:1147-57.
- Fujimoto, T., S. Nakade, A. Miyawaki, et al. 1992. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol*. 119:1507-13.
- Fujita, T., Y. Toya, K. Iwatsubo, et al. 2001. Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 51:709-16.
- Furuya, Y., S. Krajewski, J.I. Epstein, et al. 1996. Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. *Clin Cancer Res*. 2:389-98.
- Gackiere, F., G. Bidaux, P. Delcourt, et al. 2008. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 283:10162-73.
- Galbiati, F., J.A. Engelman, D. Volonte, et al. 2001. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem*. 276:21425-33.
- Galbiati, F., B. Razani, and M.P. Lisanti. 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell*. 106:403-11.
- Garcia-Sainz, J.A., R. Alcantara-Hernandez, and J. Vazquez-Prado. 1998. Alpha1-adrenoceptor subtype activation increases proto-oncogene mRNA levels. Role of protein kinase C. *Eur J Pharmacol*. 342:311-7.
- Garcia-Sainz, J.A., M.T. Romero-Avila, and M.E. Torres-Marquez. 1995. Characterization of the human liver alpha 1-adrenoceptors: predominance of the alpha 1A subtype. *Eur J Pharmacol*. 289:81-6.
- Garcia-Sainz, J.A., J. Vazquez-Prado, and L. del Carmen Medina. 2000. Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol*. 389:1-12.
- Garrison, J.B., and N. Kyprianou. 2006. Doxazosin induces apoptosis of benign and malignant prostate cells via a death receptor-mediated pathway. *Cancer Res*. 66:464-72.

- Gaspar, R., A. Marki, I. Zupko, et al. 1998. Evidence of non-synaptic regulation of postpartum uterine contractility in the rat. *Life Sci.* 62:1119-24.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285:1028-32.
- Gilman, A.G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 56:615-49.
- Gioeli, D., J.W. Mandell, G.R. Petroni, et al. 1999. Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59:279-84.
- Giovannucci, E., E.B. Rimm, G.A. Colditz, et al. 1993. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 85:1571-9.
- Glenney, J.R., Jr. 1989. Tyrosine phosphorylation of a 22-kD protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem.* 264:20163-6.
- Glenney, J.R., Jr., and D. Soppet. 1992. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:10517-21.
- Glenney, J.R., Jr., and L. Zokas. 1989. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol.* 108:2401-8.
- Goetz, J.G., P. Lajoie, S.M. Wiseman, et al. 2008. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev.*
- Gohji, K., S. Kitazawa, H. Tamada, et al. 2001. Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. *J Urol.* 165:1033-6.
- Goodin, J.L., and C.L. Rutherford. 2002. Identification of differentially expressed genes during cyclic adenosine monophosphate-induced neuroendocrine differentiation in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Mol Carcinog.* 33:88-98.
- Graham, R.M., D.M. Perez, J. Hwa, et al. 1996. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res.* 78:737-49.
- Green, D.R., and G.I. Evan. 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 1:19-30.
- Greenlee, R.T., T. Murray, S. Bolden, et al. 2000. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin.* 50:7-33.
- Griffiths, G., K. Simons, G. Warren, et al. 1983. Immunoelectron microscopy using thin, frozen sections: application to studies of the intracellular transport of Semliki Forest virus spike glycoproteins. *Methods Enzymol.* 96:466-85.
- Grossmann, M.E., H. Huang, and D.J. Tindall. 2001. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93:1687-97.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260:3440-50.
- Guarino, R.D., D.M. Perez, and M.T. Piascik. 1996. Recent advances in the molecular pharmacology of the alpha 1-adrenergic receptors. *Cell Signal.* 8:323-33.
- Guimaraes, S., and D. Moura. 2001. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 53:319-56.
- Gutkind, J.S. 2000. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE.* 2000:RE1.
- Haeusler, J., J. Hoegel, N. Bachmann, et al. 2005. Association of a CAV-1 haplotype to familial aggressive prostate cancer. *Prostate.* 65:171-7.
- Hailstones, D., L.S. Sleer, R.G. Parton, et al. 1998. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res.* 39:369-79.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Hedlund, H., and P. Hedlund. 1999. Treatment of benign prostatic enlargement with alpha-blockers: an updated review. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 203:9-13.

- Heidenberg, H.B., I.A. Sesterhenn, J.P. Gaddipati, et al. 1995. Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J Urol.* 154:414-21.
- Heino, S., S. Lusa, P. Somerharju, et al. 2000. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8375-80.
- Heinsimer, J.A., and R.J. Lefkowitz. 1982. Adrenergic receptors: biochemistry, regulation, molecular mechanism, and clinical implications. *J Lab Clin Med.* 100:641-58.
- Hermabessiere, J., L. Guy, and J.P. Boiteux. 1999. [Human ejaculation: physiology, surgical conservation of ejaculation]. *Prog Urol.* 9:305-9.
- Hieble, J.P. 2007. Subclassification and nomenclature of alpha- and beta-adrenoceptors. *Curr Top Med Chem.* 7:129-34.
- Hieble, J.P., D.B. Bylund, D.E. Clarke, et al. 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev.* 47:267-70.
- Higgins, J.R., and J.A. Gosling. 1989. Studies on the structure and intrinsic innervation of the normal human prostate. *Prostate Suppl.* 2:5-16.
- Hirasawa, A., K. Horie, T. Tanaka, et al. 1993. Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the alpha 1C-adrenergic receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 195:902-9.
- Hirasawa, A., K. Shibata, K. Horie, et al. 1995. Cloning, functional expression and tissue distribution of human alpha 1c-adrenoceptor splice variants. *FEBS Lett.* 363:256-60.
- Hnasko, R., and M.P. Lisanti. 2003. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv.* 3:445-64.
- Hofmann, T., A.G. Obukhov, M. Schaefer, et al. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* 397:259-63.
- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz, et al. 2000. Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med.* 78:14-25.
- Honda, K., A. Miyata-Osawa, and T. Takenaka. 1985. alpha 1-Adrenoceptor subtype mediating contraction of the smooth muscle in the lower urinary tract and prostate of rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 330:16-21.
- Horinouchi, T., Y. Miyake, T. Nishiya, et al. 2007. Characterization of noradrenaline-induced increases in intracellular Ca²⁺ levels in Chinese hamster ovary cells stably expressing human alpha1A-adrenoceptor. *J Pharmacol Sci.* 105:103-11.
- Horoszewicz, J.S., S.S. Leong, E. Kawinski, et al. 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43:1809-18.
- Howard, E.W., S.C. Leung, H.F. Yuen, et al. 2008. Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Exp Metastasis.* 25:497-508.
- Hu, Z.W., X.Y. Shi, R.Z. Lin, et al. 1996. Alpha1 adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. Role in mitogenesis. *J Biol Chem.* 271:8977-82.
- Huang, J., J.L. Yao, P.A. di Sant'Agnese, et al. 2006. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *Prostate.* 66:1399-406.
- Huang, X., and C. Lee. 2003. Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF-beta. *Front Biosci.* 8:s740-9.
- Huang, Y., C.D. Wright, C.L. Merkwon, et al. 2007. An alpha1A-adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes. *Circulation.* 115:763-72.

- Huggins, C., and C.V. Hodges. 2002. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol.* 168:9-12.
- Humez, S., G. Legrand, F. Vanden-Abeelee, et al. 2004. Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNF α . *J Cell Physiol.* 201:201-13.
- Inoue, R., T. Okada, H. Onoue, et al. 2001. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res.* 88:325-32.
- Insel, P.A., B.P. Head, H.H. Patel, et al. 2005. Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem Soc Trans.* 33:1131-4.
- Ishikawa, H. 1968. Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J Cell Biol.* 38:51-66.
- Ismail, A.H., F. Landry, A.G. Aprikian, et al. 2002. Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *Prostate.* 51:117-25.
- Israeli, R.S., C.T. Powell, J.G. Corr, et al. 1994. Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* 54:1807-11.
- Isshiki, M., and R.G. Anderson. 1999. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium.* 26:201-8.
- Isshiki, M., and R.G. Anderson. 2003. Function of caveolae in Ca $^{2+}$ entry and Ca $^{2+}$ -dependent signal transduction. *Traffic.* 4:717-23.
- Jacobson, K., and C. Dietrich. 1999. Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* 9:87-91.
- Jacobson, K., E.D. Sheets, and R. Simson. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science.* 268:1441-2.
- Jain, M.K., and H.B. White, 3rd. 1977. Long-range order in biomembranes. *Adv Lipid Res.* 15:1-60.
- Jewett, M.A., N. Fleshner, L.H. Klotz, et al. 2003. Radical prostatectomy as treatment for prostate cancer. *Cmaj.* 168:44-5.
- Jung, S., R. Strotmann, G. Schultz, et al. 2002. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C347-59.
- Justulin, L.A., Jr., F.K. Delella, and S.L. Felisbino. 2008. Doxazosin reduces cell proliferation and increases collagen fibers in rat prostatic lobes. *Cell Tissue Res.* 332:171-83.
- Kable, J.W., L.C. Murrin, and D.B. Bylund. 2000. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of $\alpha(2)$ -adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 293:1-7.
- Kadi, A., V. Pichard, M. Lehmann, et al. 1998. Effect of microtubule disruption on cell adhesion and spreading. *Biochem Biophys Res Commun.* 246:690-5.
- Kahl, C.R., and A.R. Means. 2003. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev.* 24:719-36.
- Kahl, C.R., and A.R. Means. 2004. Regulation of cyclin D1/Cdk4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *J Biol Chem.* 279:15411-9.
- Kajstura, M., H.D. Halicka, J. Pryjma, et al. 2007. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A.* 71:125-31.
- Kanagawa, K., K. Sugimura, K. Kuratsukuri, et al. 2003. Norepinephrine activates P44 and P42 MAPK in human prostate stromal and smooth muscle cells but not in epithelial cells. *Prostate.* 56:313-8.

- Karam, J.A., Y. Lotan, C.G. Roehrborn, et al. 2007. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *Prostate*. 67:614-22.
- Karlsson, E. 2001. The role of pancreatic chromogranins in islet physiology. *Curr Mol Med*. 1:727-32.
- Kassahun, W.T., B. Gunl, A. Tannapfel, et al. 2005. Alpha1-and beta2-adrenoceptors in the human liver with mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma: density and coupling to adenylate cyclase and phospholipase C. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 372:171-81.
- Kawabe, K., N. Moriyama, S. Yamada, et al. 1994. Rationale for the use of alpha-blockers in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). *Int J Urol*. 1:203-11.
- Keledjian, K., J.B. Garrison, and N. Kyprianou. 2005. Doxazosin inhibits human vascular endothelial cell adhesion, migration, and invasion. *J Cell Biochem*. 94:374-88.
- Keledjian, K., and N. Kyprianou. 2003. Anoikis induction by quinazoline based alpha 1-adrenoceptor antagonists in prostate cancer cells: antagonistic effect of bcl-2. *J Urol*. 169:1150-6.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239-57.
- Kim, J., and G.A. Coetzee. 2004. Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *J Cell Biochem*. 93:233-41.
- Kim, J.H., S.Y. Shin, J.H. Nam, et al. 2003. Adrenergic regulation of the intracellular [Ca²⁺] and voltage-operated Ca²⁺ channel currents in the rat prostate neuroendocrine cells. *Prostate*. 57:99-110.
- Kobilka, B.K., C. MacGregor, K. Daniel, et al. 1987. Functional activity and regulation of human beta 2-adrenergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 262:15796-802.
- Kojima, Y., S. Sasaki, H. Shinoura, et al. 2006. Quantification of alpha1-adrenoceptor subtypes by real-time RT-PCR and correlation with age and prostate volume in benign prostatic hyperplasia patients. *Prostate*. 66:761-7.
- Kolch, W., G. Heidecker, G. Kochs, et al. 1993. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*. 364:249-52.
- Koleske, A.J., D. Baltimore, and M.P. Lisanti. 1995. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:1381-5.
- Komiya, A., H. Suzuki, T. Imamoto, et al. 2009. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol*. 16:37-44.
- Krajewska, M., S. Krajewski, J.I. Epstein, et al. 1996. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol*. 148:1567-76.
- Krijnen, J.L., P.J. Janssen, J.A. Ruizeveld de Winter, et al. 1993. Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry*. 100:393-8.
- Kurzchalia, T.V., P. Dupree, and S. Monier. 1994. VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Lett*. 346:88-91.
- Kurzchalia, T.V., P. Dupree, R.G. Parton, et al. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol*. 118:1003-14.
- Kurzchalia, T.V., and R.G. Parton. 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*. 11:424-31.
- Kyprianou, N. 2000. Induction of apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 3:S24-S25.
- Kyprianou, N. 2003. Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: clinical significance. *J Urol*. 169:1520-5.

- Kyprianou, N., and C.M. Benning. 2000. Suppression of human prostate cancer cell growth by alpha1-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis. *Cancer Res.* 60:4550-5.
- Kyprianou, N., E.M. Bruckheimer, and Y. Guo. 2000. Cell proliferation and apoptosis in prostate cancer: significance in disease progression and therapy. *Histol Histopathol.* 15:1211-23.
- Kyprianou, N., and J.T. Isaacs. 1988. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology.* 122:552-62.
- Kyprianou, N., and S.C. Jacobs. 2000. Induction of apoptosis in the prostate by alpha1-adrenoceptor antagonists: a novel effect of "old" drugs. *Curr Urol Rep.* 1:89-96.
- Kyprianou, N., J.P. Litvak, A. Borkowski, et al. 1998. Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 159:1810-5.
- Kyprianou, N., H. Tu, and S.C. Jacobs. 1996. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol.* 27:668-75.
- Labrecque, L., I. Royal, D.S. Surprenant, et al. 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell.* 14:334-47.
- Lamaze, C., A. Dujancourt, T. Baba, et al. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell.* 7:661-71.
- Langhorst, M.F., A. Reuter, and C.A. Stuermer. 2005. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci.* 62:2228-40.
- Lattion, A.L., D. Diviani, and S. Cotecchia. 1994. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 269:22887-93.
- Lavie, Y., G. Fiucci, and M. Liscovitch. 1998. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem.* 273:32380-3.
- Lawrence, J.A., and P.S. Steeg. 1996. Mechanisms of tumor invasion and metastasis. *World J Urol.* 14:124-30.
- Lee, K.L., and D.M. Peehl. 2004. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 172:1784-91.
- Lee, S.W., C.L. Reimer, P. Oh, et al. 1998. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene.* 16:1391-7.
- Lefkowitz, R.J., and M.G. Caron. 1985. Adrenergic receptors: molecular mechanisms of clinically relevant regulation. *Clin Res.* 33:395-406.
- Lefkowitz, R.J., and M.G. Caron. 1988. Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem.* 263:4993-6.
- Lei, B., D.P. Morris, M.P. Smith, et al. 2005. Novel human alpha1a-adrenoceptor single nucleotide polymorphisms alter receptor pharmacology and biological function. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 371:229-39.
- Leicht, M., W. Briest, and H.G. Zimmer. 2003. Regulation of norepinephrine-induced proliferation in cardiac fibroblasts by interleukin-6 and p42/p44 mitogen activated protein kinase. *Mol Cell Biochem.* 243:65-72.
- Li, K., H. He, C. Li, et al. 1997. Myocardial alpha1-adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sci.* 60:1305-18.
- Li, L., M.P. Haynes, and J.R. Bender. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4807-12.

- Li, L., G. Yang, S. Ebara, et al. 2001. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 61:4386-92.
- Li, S., T. Okamoto, M. Chun, et al. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem.* 270:15693-701.
- Li, W.P., P. Liu, B.K. Pilcher, et al. 2001. Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci.* 114:1397-408.
- Li, Y.C., M.J. Park, S.K. Ye, et al. 2006. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol.* 168:1107-18; quiz 1404-5.
- Lisanti, M.P., P.E. Scherer, J. Vidugiriene, et al. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* 126:111-26.
- Liu, J., X.B. Wang, D.S. Park, et al. 2002. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem.* 277:10661-8.
- Liu, P., W.P. Li, T. Machleidt, et al. 1999. Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nat Cell Biol.* 1:369-75.
- Lockwich, T.P., X. Liu, B.B. Singh, et al. 2000. Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem.* 275:11934-42.
- Lowes, V.L., N.Y. Ip, and Y.H. Wong. 2002. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. *Neurosignals.* 11:5-19.
- Lu, M.L., M.C. Schneider, Y. Zheng, et al. 2001. Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J Biol Chem.* 276:13442-51.
- Mann, T. 1963. Biochemistry of the Prostate Gland and Its Secretion. *Natl Cancer Inst Monogr.* 12:235-46.
- Marengo, S.R., and L.W. Chung. 1994. An orthotopic model for the study of growth factors in the ventral prostate of the rat: effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor. *J Androl.* 15:277-86.
- Marinissen, M.J., and J.S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 22:368-76.
- Marshall, I., R.P. Burt, and C.R. Chapple. 1995. Noradrenaline contractions of human prostate mediated by alpha 1A-(alpha 1c-) adrenoceptor subtype. *Br J Pharmacol.* 115:781-6.
- Mason, M.D., G. Davies, and W.G. Jiang. 2002. Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 41:11-28.
- Matsukawa, Y., S. Semba, H. Kato, et al. 2006. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.* 97:484-91.
- Maxfield, F.R. 2002. Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol.* 14:483-7.
- Mayor, S., and M. Rao. 2004. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* 5:231-40.
- McDonnell, T.J., P. Troncoso, S.M. Brisbay, et al. 1992. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 52:6940-4.
- McIntosh, D.P., X.Y. Tan, P. Oh, et al. 2002. Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis in vivo: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:1996-2001.
- McKenzie, S., and N. Kyprianou. 2006. Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *J Cell Biochem.* 97:18-32.

- McLeod, D.G. 2003. Hormonal therapy: historical perspective to future directions. *Urology*. 61:3-7.
- McNeal, J.E. 1968. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol*. 49:347-57.
- McNeal, J.E. 1972. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J Urol*. 107:1008-16.
- McVary, K.T., K.E. McKenna, and C. Lee. 1998. Prostate innervation. *Prostate Suppl*. 8:2-13.
- Michel, M.C., and W. Vrydag. 2006. Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol*. 147 Suppl 2:S88-119.
- Michelotti, G.A., D.T. Price, and D.A. Schwinn. 2000. Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Ther*. 88:281-309.
- Mickey, D.D., K.R. Stone, H. Wunderli, et al. 1977. Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res*. 37:4049-58.
- Minke, B., and B. Cook. 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev*. 82:429-72.
- Minneman, K.P. 1988. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacol Rev*. 40:87-119.
- Mitchell, F.M., M. Russell, and G.L. Johnson. 1995. Differential calcium dependence in the activation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by muscarinic acetylcholine receptors in rat 1a cells. *Biochem J*. 309 (Pt 2):381-4.
- Molina-Munoz, T., M.T. Romero-Avila, S.E. Avendano-Vazquez, et al. 2008. Phosphorylation, desensitization and internalization of human alpha1B-adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I. *Eur J Pharmacol*. 578:1-10.
- Monier, S., D.J. Dietzen, W.R. Hastings, et al. 1996. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett*. 388:143-9.
- Monier, S., R.G. Parton, F. Vogel, et al. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*. 6:911-27.
- Mori, S., H. Nojiri, N. Yoshizuka, et al. 2007. Rapid desensitization of lipolysis in the visceral and subcutaneous adipocytes of rats. *Lipids*. 42:307-14.
- Moriyama, N., S. Kurimoto, S. Horie, et al. 1996. Detection of alpha 1-adrenoceptor subtypes in human hypertrophied prostate by in situ hybridization. *Histochem J*. 28:283-8.
- Morris, J.B., H. Huynh, O. Vasilevski, et al. 2006. Alpha1-adrenergic receptor signaling is localized to caveolae in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 41:17-25.
- Mouraviev, V., L. Li, S.A. Tahir, et al. 2002. The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer. *J Urol*. 168:1589-96.
- Munaron, L., S. Antoniotti, and D. Lovisolo. 2004. Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *J Cell Mol Med*. 8:161-8.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 115:377-88.
- Munshi, A., T.J. McDonnell, and R.E. Meyn. 2002. Chemotherapeutic agents enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 50:46-52.
- Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, et al. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10339-43.
- Namba, T., Y. Sugimoto, M. Negishi, et al. 1993. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature*. 365:166-70.
- Nandeesh, H. 2008. Benign prostatic hyperplasia: dietary and metabolic risk factors. *Int Urol Nephrol*. 40:649-56.

- Nantermet, P.V., J. Xu, Y. Yu, et al. 2004. Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *J Biol Chem.* 279:1310-22.
- Nasu, K., N. Moriyama, K. Kawabe, et al. 1996. Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. *Br J Pharmacol.* 119:797-803.
- Nasu, Y., T.L. Timme, G. Yang, et al. 1998. Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med.* 4:1062-4.
- Nelson, C.P. 2008. The alpha(1L)-adrenoceptor is an alternative phenotype of the alpha(1A)-adrenoceptor. *Br J Pharmacol.*
- Nelson, J., A. Bagnato, B. Battistini, et al. 2003. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:110-6.
- Nelson, J.B. 1998. Alternatives to death: understanding androgen-independent prostate cancer. *Nat Med.* 4:1011-2.
- Neumann-Giesen, C., B. Falkenbach, P. Beicht, et al. 2004. Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J.* 378:509-18.
- Nichols, B. 2003. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci.* 116:4707-14.
- Nichols, B. 2005. Cell biology: without a raft. *Nature.* 436:638-9.
- Nishiyama, K., B.D. Trapp, T. Ikezu, et al. 1999. Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 19:6538-48.
- Oh, H.Y., E.J. Lee, S. Yoon, et al. 2007. Cholesterol level of lipid raft microdomains regulates apoptotic cell death in prostate cancer cells through EGFR-mediated Akt and ERK signal transduction. *Prostate.* 67:1061-9.
- Oh, P., D.P. McIntosh, and J.E. Schnitzer. 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol.* 141:101-14.
- Okada, H., A. Tsubura, A. Okamura, et al. 1992. Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 421:157-61.
- Okamoto, T., A. Schlegel, P.E. Scherer, et al. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 273:5419-22.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:552-65.
- Orsini, J.C. 1982. Androgen influence on lateral hypothalamus in the male rat: possible behavioral significance. *Physiol Behav.* 29:979-87.
- Ostrom, R.S., and P.A. Insel. 2004. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol.* 143:235-45.
- Palm, D., K. Lang, B. Niggemann, et al. 2006. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer.* 118:2744-9.
- Pande, G., N.A. Kumar, and P.S. Manogaran. 1996. Flow cytometric study of changes in the intracellular free calcium during the cell cycle. *Cytometry.* 24:55-63.
- Pang, A., W.Y. Au, and Y.L. Kwong. 2004. Caveolin-1 gene is coordinately regulated with the multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic bone marrow. *Leuk Res.* 28:973-7.

- Pani, B., H.L. Ong, X. Liu, et al. 2008. Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). *J Biol Chem.* 283:17333-40.
- Parekh, A.B., and J.W. Putney, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85:757-810.
- Park, D.S., A.W. Cohen, P.G. Frank, et al. 2003. Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry.* 42:15124-31.
- Park, D.S., H. Lee, P.G. Frank, et al. 2002. Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade. *Mol Biol Cell.* 13:3416-30.
- Partin, A.W., J.E. Oesterling, J.I. Epstein, et al. 1991. Influence of age and endocrine factors on the volume of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 145:405-9.
- Partin, J.V., I.E. Anglin, and N. Kyprianou. 2003. Quinazoline-based alpha 1-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via TGF-beta signalling and I kappa B alpha induction. *Br J Cancer.* 88:1615-21.
- Parton, R.G. 2001. Cell biology. Life without caveolae. *Science.* 293:2404-5.
- Parton, R.G. 2003. Caveolae--from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:162-7.
- Parton, R.G., M. Hanzal-Bayer, and J.F. Hancock. 2006. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci.* 119:787-96.
- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:185-94.
- Paunesku, T., S. Mittal, M. Protic, et al. 2001. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol.* 77:1007-21.
- Paz, G.F., A. Sofer, Z.T. Homonnai, et al. 1977. Human semen analysis: seminal plasma and prostatic fluid compositions and their interrelations with sperm quality. *Int J Fertil.* 22:140-7.
- Pearse, A.G. 1969. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 17:303-13.
- Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 3:473-83.
- Penn, R.B., A.N. Pronin, and J.L. Benovic. 2000. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med.* 10:81-9.
- Pennefather, J.N., W.A. Lau, F. Mitchelson, et al. 2000. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *J Auton Pharmacol.* 20:193-206.
- Pennock, S., and Z. Wang. 2003. Stimulation of cell proliferation by endosomal epidermal growth factor receptor as revealed through two distinct phases of signaling. *Mol Cell Biol.* 23:5803-15.
- Perez, D.M., M.B. DeYoung, and R.M. Graham. 1993. Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol.* 44:784-95.
- Piascik, M.T., E.E. Soltis, M.M. Piascik, et al. 1996. Alpha-adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates. *Pharmacol Ther.* 72:215-41.
- Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:639-50.
- Pike, L.J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 44:655-67.

- Pontes-Junior, J., S.T. Reis, M. Dall'oglio, et al. 2009. Evaluation of the expression of integrins and cell adhesion molecules through tissue microarray in lymph node metastases of prostate cancer. *J Carcinog.* 8:3.
- Popescu, L.M., I. Diculescu, U. Zelck, et al. 1974. Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell Tissue Res.* 154:357-78.
- Prevarskaya, N., M. Flourakis, G. Bidaux, et al. 2007. Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans.* 35:133-5.
- Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba. 2004. Ca²⁺ homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 322:1326-35.
- Price, D.T., G. Della Rocca, C. Guo, et al. 1999. Activation of extracellular signal-regulated kinase in human prostate cancer. *J Urol.* 162:1537-42.
- Price, D.T., D.A. Schwinn, J.W. Lomasney, et al. 1993. Identification, quantification, and localization of mRNA for three distinct alpha 1 adrenergic receptor subtypes in human prostate. *J Urol.* 150:546-51.
- Price, R.R., D.P. Morris, G. Biswas, et al. 2002. Acute agonist-mediated desensitization of the human alpha 1a-adrenergic receptor is primarily independent of carboxyl terminus regulation: implications for regulation of alpha 1aAR splice variants. *J Biol Chem.* 277:9570-9.
- Prowatke, I., F. Devens, A. Benner, et al. 2007. Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer.* 96:82-8.
- Puceat, M., O. Clement-Chomienne, A. Terzic, et al. 1993. Alpha 1-adrenoceptor and purinoceptor agonists modulate Na-H antiport in single cardiac cells. *Am J Physiol.* 264:H310-9.
- Putney, J.W., Jr. 2005. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol.* 169:381-2.
- Quest, A., J.L. Gutierrez-Pajares, and V. Torres. 2008. Caveolin-1, an ambiguous partner in cell signaling and cancer. *J Cell Mol Med.*
- Racine, C., M. Belanger, H. Hirabayashi, et al. 1999. Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 255:580-6.
- Raghavan, D. 1988. Non-hormone chemotherapy for prostate cancer: principles of treatment and application to the testing of new drugs. *Semin Oncol.* 15:371-89.
- Raj, G.V., L. Barki-Harrington, P.F. Kue, et al. 2002. Guanosine phosphate binding protein coupled receptors in prostate cancer: a review. *J Urol.* 167:1458-63.
- Ramberg, H., T. Eide, K.A. Krobert, et al. 2008. Hormonal regulation of beta2-adrenergic receptor level in prostate cancer. *Prostate.* 68:1133-42.
- Rao, R.V., H.M. Ellerby, and D.E. Bredesen. 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 11:372-80.
- Ravid, D., S. Maor, H. Werner, et al. 2006. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul.* 46:163-75.
- Razani, B., Y. Altschuler, L. Zhu, et al. 2000. Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. *Biochemistry.* 39:13916-24.
- Razani, B., T.P. Combs, X.B. Wang, et al. 2002. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem.* 277:8635-47.
- Razani, B., C.S. Rubin, and M.P. Lisanti. 1999. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem.* 274:26353-60.

- Razani, B., X.B. Wang, J.A. Engelman, et al. 2002. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol.* 22:2329-44.
- Razani, B., S.E. Woodman, and M.P. Lisanti. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* 54:431-67.
- Reed, J.C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 124:1-6.
- Reed, J.C. 1995. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am.* 9:451-73.
- Rennebeck, G., M. Martelli, and N. Kyprianou. 2005. Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis? *Cancer Res.* 65:11230-5.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology.* 17:208-214.
- Richard, F. 1994. [Epidemiology of prostate cancer and its implications in public health]. *Rev Prat.* 44:575-9.
- Rizzuto, R., and T. Pozzan. 2006. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 86:369-408.
- Robinson, E.J., D.E. Neal, and A.T. Collins. 1998. Basal cells are progenitors of luminal cells in primary cultures of differentiating human prostatic epithelium. *Prostate.* 37:149-60.
- Rodal, S.K., G. Skretting, O. Garred, et al. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10:961-74.
- Roderick, H.L., and S.J. Cook. 2008. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer.* 8:361-75.
- Rojas-Corona, R.R., L.Z. Chen, and P.S. Mahadevia. 1987. Prostatic carcinoma with endocrine features. A report of a neoplasm containing multiple immunoreactive hormonal substances. *Am J Clin Pathol.* 88:759-62.
- Rong, Y., and C.W. Distelhorst. 2008. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 70:73-91.
- Ross, D.T., U. Scherf, M.B. Eisen, et al. 2000. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 24:227-35.
- Rothberg, K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, et al. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68:673-82.
- Rothberg, K.G., Y.S. Ying, J.F. Kolhouse, et al. 1990. The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J Cell Biol.* 110:637-49.
- Rothermund, C.A., D. Kondrikov, M.F. Lin, et al. 2002. Regulation of Bcl-2 during androgen-unresponsive progression of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 5:236-45.
- Rudner, X.L., D.E. Berkowitz, J.V. Booth, et al. 1999. Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation.* 100:2336-43.
- Salatino, M., W. Beguelin, M.G. Peters, et al. 2006. Progesterone-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation. *Oncogene.* 25:7723-39.
- Salido, M., J. Larran, A. Lopez, et al. 1999. Etoposide sensitivity of human prostatic cancer cell lines PC-3, DU 145 and LNCaP. *Histol Histopathol.* 14:125-34.
- Sanan, D.A., and R.G. Anderson. 1991. Simultaneous visualization of LDL receptor distribution and clathrin lattices on membranes torn from the upper surface of cultured cells. *J Histochem Cytochem.* 39:1017-24.

- Sargiacomo, M., P.E. Scherer, Z. Tang, et al. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9407-11.
- Sastry, K.S., Y. Karpova, S. Prokopovich, et al. 2007. Epinephrine protects cancer cells from apoptosis via activation of cAMP-dependent protein kinase and BAD phosphorylation. *J Biol Chem*. 282:14094-100.
- Schaak, S., D. Cussac, C. Cayla, et al. 2000. Alpha(2) adrenoceptors regulate proliferation of human intestinal epithelial cells. *Gut*. 47:242-50.
- Schally, A.V. 2005. [The discovery of hypothalamic hormones and the development of antitumor analogs]. *Ann Urol (Paris)*. 39 Suppl 3:S46-50.
- Scherer, P.E., T. Okamoto, M. Chun, et al. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:131-5.
- Scherer, P.E., Z. Tang, M. Chun, et al. 1995. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem*. 270:16395-401.
- Schmechel, D.E., M.W. Brightman, and P.J. Marangos. 1980. Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain Res*. 190:195-214.
- Schmid, K.W., B. Helpap, M. Totsch, et al. 1994. Immunohistochemical localization of chromogranins A and B and secretogranin II in normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Histopathology*. 24:233-9.
- Schmidmaier, R., and P. Baumann. 2008. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Curr Med Chem*. 15:978-90.
- Schnitzer, J.E. 2001. Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*. 49:265-80.
- Schnitzer, J.E., and P. Oh. 1994. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J Biol Chem*. 269:6072-82.
- Schnitzer, J.E., P. Oh, B.S. Jacobson, et al. 1995. Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:1759-63.
- Schnitzer, J.E., P. Oh, and D.P. McIntosh. 1996. Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science*. 274:239-42.
- Schroder, F.H., P. Hermanek, L. Denis, et al. 1992. The TNM classification of prostate cancer. *Prostate Suppl*. 4:129-38.
- Schubert, W., P.G. Frank, S.E. Woodman, et al. 2002. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem*. 277:40091-8.
- Schwab, W., F. Galbiati, D. Volonte, et al. 1999. Characterisation of caveolins from cartilage: expression of caveolin-1, -2 and -3 in chondrocytes and in alginate cell culture of the rat tibia. *Histochem Cell Biol*. 112:41-9.
- Schwinn, D.A., S.O. Page, J.P. Middleton, et al. 1991. The alpha 1C-adrenergic receptor: characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol Pharmacol*. 40:619-26.
- Schwinn, D.A., and C.G. Roehrborn. 2008. Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int J Urol*. 15:193-9.
- Scofield, M.A., J.D. Deupree, and D.B. Bylund. 2002. Adrenergic receptor genes: cDNA and genomic library construction. *Mol Biotechnol*. 21:171-97.

- See, V., N.K. Rajala, D.G. Spiller, et al. 2004. Calcium-dependent regulation of the cell cycle via a novel MAPK--NF-kappaB pathway in Swiss 3T3 cells. *J Cell Biol.* 166:661-72.
- Serkova, N.J., E.J. Gamito, R.H. Jones, et al. 2008. The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Prostate.* 68:620-8.
- Shah, G.V., W. Rayford, M.J. Noble, et al. 1994. Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and cytoplasmic Ca²⁺ transients. *Endocrinology.* 134:596-602.
- Shaul, P.W., and R.G. Anderson. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol.* 275:L843-51.
- Shaul, P.W., E.J. Smart, L.J. Robinson, et al. 1996. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem.* 271:6518-22.
- Shaul, Y.D., and R. Seger. 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta.* 1773:1213-26.
- Shaw, A.S. 2006. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol.* 7:1139-42.
- Shenoy-Scaria, A.M., D.J. Dietzen, J. Kwong, et al. 1994. Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol.* 126:353-63.
- Sherwood, E.R., G. Theyer, G. Steiner, et al. 1991. Differential expression of specific cytokeratin polypeptides in the basal and luminal epithelia of the human prostate. *Prostate.* 18:303-14.
- Short, A.D., J. Bian, T.K. Ghosh, et al. 1993. Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4986-90.
- Simionescu, M., and N. Simionescu. 1991. Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev.* 25:1-78.
- Simionescu, N., M. Simionescu, and G.E. Palade. 1975. Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol.* 64:586-607.
- Simons, K., and R. Ehehalt. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 110:597-603.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-72.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:31-9.
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175:720-31.
- Skryma, R., P. Mariot, X.L. Bourhis, et al. 2000. Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol.* 527 Pt 1:71-83.
- Smart, E.J., G.A. Graf, M.A. McNiven, et al. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 19:7289-304.
- Smart, E.J., Y. Ying, W.C. Donzell, et al. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 271:29427-35.
- Smart, E.J., Y.S. Ying, P.A. Conrad, et al. 1994. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol.* 127:1185-97.
- Smiley, R.M., M.M. Kwatra, and D.A. Schwinn. 1998. New developments in cardiovascular adrenergic receptor pharmacology: molecular mechanisms and clinical relevance. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 12:80-95.
- Smith, M.S., U.B. Schambra, K.H. Wilson, et al. 1999. Alpha1-adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding alpha1-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. *Brain Res Mol Brain Res.* 63:254-61.

- Smith, P., N.P. Rhodes, Y. Ke, et al. 2000. Modulating effect of estrogen and testosterone on prostatic stromal cell phenotype differentiation induced by noradrenaline and doxazosin. *Prostate*. 44:111-7.
- Sonveaux, P., P. Martinive, J. DeWever, et al. 2004. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res*. 95:154-61.
- Spiegelberg, B.D., and H.E. Hamm. 2007. Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription. *Curr Opin Genet Dev*. 17:40-4.
- Stern, J.A., and A.J. Schaeffer. 2000. Chronic prostatitis. *West J Med*. 172:98-101.
- Stone, K.R., D.D. Mickey, H. Wunderli, et al. 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*. 21:274-81.
- Suzuki, H., N. Kamiya, T. Imamoto, et al. 2008. Current topics and perspectives relating to hormone therapy for prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. 13:401-10.
- Suzuki, T., H. Sasano, T. Nisikawa, et al. 1992. Discerning malignancy in human adrenocortical neoplasms: utility of DNA flow cytometry and immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 5:224-31.
- Tahir, S.A., A. Frolov, T.G. Hayes, et al. 2006. Preoperative serum caveolin-1 as a prognostic marker for recurrence in a radical prostatectomy cohort. *Clin Cancer Res*. 12:4872-5.
- Tahir, S.A., C. Ren, T.L. Timme, et al. 2003. Development of an immunoassay for serum caveolin-1: a novel biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 9:3653-9.
- Tahir, S.A., G. Yang, S. Ebara, et al. 2001. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res*. 61:3882-5.
- Tahir, S.A., G. Yang, A.A. Goltsov, et al. 2008. Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. *Cancer Res*. 68:731-9.
- Tahmatzopoulos, A., and N. Kyprianou. 2004. Apoptotic impact of alpha1-blockers on prostate cancer growth: a myth or an inviting reality? *Prostate*. 59:91-100.
- Takeda, M., A. Hatano, K. Arai, et al. 1999. alpha1- and alpha2-adrenoceptors in BPH. *Eur Urol*. 36 Suppl 1:31-4; discussion 65.
- Tang, Z., P.E. Scherer, T. Okamoto, et al. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem*. 271:2255-61.
- Taub, J.S., R. Guo, L.M. Leeb-Lundberg, et al. 2003. Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer Res*. 63:2037-41.
- Thebault, S., M. Flourakis, K. Vanoverberghe, et al. 2006. Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res*. 66:2038-47.
- Thebault, S., M. Roudbaraki, V. Sydorenko, et al. 2003. Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest*. 111:1691-701.
- Theodore, C. 2004. [Hormone therapy for prostate cancer]. *Bull Cancer*. 91:69-74.
- Thiele, C., M.J. Hannah, F. Fahrenholz, et al. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol*. 2:42-9.
- Thomas, C.M., and E.J. Smart. 2008. Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med*. 12:796-809.
- Thompson, T.C., T.L. Timme, L. Li, et al. 1999. Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis*. 4:233-7.
- Thompson, T.C., H.Y. Zhau, and L.W. Chung. 1987. Catecholamines are involved in the growth and expression of prostatic binding protein by rat ventral prostatic tissues. *Prog Clin Biol Res*. 239:239-48.

- Thompson, T.E., and T.W. Tillack. 1985. Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 14:361-86.
- Thorpe, J.F., S. Jain, T.H. Marcylo, et al. 2007. A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention. *Ann R Coll Surg Engl.* 89:207-11.
- Timme, T.L., A. Goltsov, S. Tahir, et al. 2000. Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene.* 19:3256-65.
- Tokuyasu, K.T. 1973. A technique for ultracryotomy of cell suspension and tissues. *Journal of Cell Biology.* 57:551-565.
- Tolis, G., D. Ackman, A. Stellos, et al. 1982. Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:1658-62.
- Tomai, F., F. Crea, L. Chiariello, et al. 1999. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation.* 100:559-63.
- Tsai, C.C., I.M. Liu, and J.T. Cheng. 2000. Stimulatory effect of trans-cinnamaldehyde on norepinephrine secretion in cultured pheochromocytoma (PC-12) cells. *Acta Pharmacol Sin.* 21:1174-8.
- Tsuji, T., H. Azuma, T. Yamaguchi, et al. 1992. A possible role of decreased relaxation mediated by beta-adrenoceptors in bladder outlet obstruction by benign prostatic hyperplasia. *Br J Pharmacol.* 107:803-7.
- Tsujimoto, Y., and S. Shimizu. 2000. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466:6-10.
- Untergasser, G., M. Hermann, H. Rumpold, et al. 2000. An unusual member of the human growth hormone/placental lactogen (GH/PL) family, the testicular alternative splicing variant hPL-A2: recombinant expression revealed a membrane-associated growth factor molecule. *Mol Cell Endocrinol.* 167:117-25.
- van Biesen, T., L.M. Luttrell, B.E. Hawes, et al. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 17:698-714.
- Vanoverberghe, K., P. Mariot, F. Vanden Abeele, et al. 2003. Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium.* 34:75-85.
- Vanoverberghe, K., F. Vanden Abeele, P. Mariot, et al. 2004. Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 11:321-30.
- Varambally, S., S.M. Dhanasekaran, M. Zhou, et al. 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 419:624-9.
- Vazquez-Prado, J., L.C. Medina, M.T. Romero-Avila, et al. 2000. Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem.* 275:6553-9.
- Vazquez, G., B.J. Wedel, O. Aziz, et al. 2004. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta.* 1742:21-36.
- Ventura, S., J. Pennefather, and F. Mitchelson. 2002. Cholinergic innervation and function in the prostate gland. *Pharmacol Ther.* 94:93-112.
- Verhagen, A.P., T.W. Aalders, F.C. Ramaekers, et al. 1988. Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate.* 13:25-38.
- Volonte, D., F. Galbiati, S. Li, et al. 1999. Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J Biol Chem.* 274:12702-9.
- Waldron, R.T., A.D. Short, J.J. Meadows, et al. 1994. Endoplasmic reticulum calcium pump expression and control of cell growth. *J Biol Chem.* 269:11927-33.

- Wang, L., C.G. Radu, L.V. Yang, et al. 2005. Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A. *Mol Biol Cell*. 16:2234-47.
- Wang, X.Q., and A.S. Paller. 2006. Lipid rafts: membrane triage centers. *J Invest Dermatol*. 126:951-3.
- Wary, K.K., A. Mariotti, C. Zurzolo, et al. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 94:625-34.
- Williams, T.M., and M.P. Lisanti. 2004. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med*. 36:584-95.
- Wong, Y.C., and Y.Z. Wang. 2000. Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. *Int Rev Cytol*. 199:65-116.
- Woodcock, E.A., X.J. Du, M.E. Reichelt, et al. 2008. Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res*. 77:452-62.
- Wu, X.X., Y. Kakehi, Y. Mizutani, et al. 2002. Doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol*. 20:949-54.
- Wyse, D.G. 1988. Vasoactive responses of a human cystic artery: adrenoceptor characterization. *Br J Clin Pharmacol*. 25:741-9.
- Xu, L.L., B.G. Stackhouse, K. Florence, et al. 2000. PSGR, a novel prostate-specific gene with homology to a G protein-coupled receptor, is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 60:6568-72.
- Xue, Y., F. Smedts, F.M. Debruyne, et al. 1998. Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate. *Prostate*. 34:292-301.
- Yamada, E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1:445-58.
- Yang, C.P., F. Galbiati, D. Volonte, et al. 1998. Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in Taxol-resistant A549 cells. *FEBS Lett*. 439:368-72.
- Yang, G., J. Addai, M. Ittmann, et al. 2000. Elevated caveolin-1 levels in African-American versus white-American prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 6:3430-3.
- Yang, G., L.D. Truong, T.L. Timme, et al. 1998. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res*. 4:1873-80.
- Yang, G., L.D. Truong, T.M. Wheeler, et al. 1999. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res*. 59:5719-23.
- Yowell, C.W., and Y. Daaka. 2002. G protein-coupled receptors provide survival signals in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 1:177-81.
- Yu, J., Q. Cao, R. Mehra, et al. 2007. Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. *Cancer Cell*. 12:419-31.
- Yuan, C., J. Furlong, P. Burgos, et al. 2002. The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys J*. 82:2526-35.
- Yuan, T.C., S. Veeramani, F.F. Lin, et al. 2006. Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocr Relat Cancer*. 13:151-67.
- Yuan, T.C., S. Veeramani, and M.F. Lin. 2007. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*. 14:531-47.
- Zegarra-Moro, O.L., L.J. Schmidt, H. Huang, et al. 2002. Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells. *Cancer Res*. 62:1008-13.

- Zhao, X.Y., P.J. Malloy, A.V. Krishnan, et al. 2000. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med.* 6:703-6.
- Zhou, J.R., L. Yu, L.F. Zerbini, et al. 2004. Progression to androgen-independent LNCaP human prostate tumors: cellular and molecular alterations. *Int J Cancer.* 110:800-6.
- Zhu, B., and N. Kyprianou. 2005. Transforming growth factor beta and prostate cancer. *Cancer Treat Res.* 126:157-73.
- Zhuang, L., J. Kim, R.M. Adam, et al. 2005. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest.* 115:959-68.
- Zhuang, L., J. Lin, M.L. Lu, et al. 2002. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62:2227-31.
- Zurzolo, C., G. van Meer, and S. Mayor. 2003. The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae. *EMBO Rep.* 4:1117-21.