Impact de la surexpression de la protéine nucléophosmine (NPM1) sur la progression des cancers de la prostate

Gaëlle Loubeau

▶ **To cite this version:**

Gaëlle Loubeau. Impact de la surexpression de la protéine nucléophosmine (NPM1) sur la progression des cancers de la prostate. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22319 . tel-00870415

HAL Id: tel-00870415

https://theses.hal.science/tel-00870415

Submitted on 7 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL **UNIVERSITE D'AUVERGNE**
N° D.U. : 2319 **Année 2012**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 597

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires

Présentée et soutenue publiquement
par

Gaëlle LOUBEAU

Le 14 Décembre 2012

IMPACT DE LA SUREXPRESSION DE LA PROTEINE NUCLEOPHOSMINE (NPM1) SUR LA PROGRESSION DES CANCERS DE LA PROSTATE

Président :	**Pr. Laurent GUY**, Service d'urologie, CHU Clermont-Ferrand
Rapporteurs :	**Dr. Palma ROCCHI**, UMR 1068, INSERM, CRCM, Marseille **Dr. Sylvie GAZZERI**, U823, INSERM, Grenoble **Dr. Olivier CUVILLIER**, UMR 5089, CNRS, IPBS, Toulouse
Examinateur:	**Dr. Nicolas FORAY**, U1052, INSERM, CRCL, Lyon
Directeurs de thèse :	**Pr. Laurent MOREL**, UMR CNRS 6293, GReD, Clermont Ferrand **Pr. Pierre VERRELLE**, EA 7283, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand

A ma famille,
A Ludovic,

Je voudrais tout d'abord remercier très chaleureusement le Pr Laurent Morel de m'avoir accueilli au sein de son équipe il y a 3 ans et de m'avoir fait confiance pour ce sujet de thèse. Merci pour son immense patience, son écoute et le temps accordé à toutes nos discussions enrichissantes. Merci de m'avoir permis de finaliser ce doctorat, malgré les obstacles et les difficultés rencontrées. Merci également pour sa bonne humeur et son optimisme de tous les instants.

Un grand merci également au Pr Pierre Verrelle, mon co-directeur de thèse, de m'avoir fait confiance, pour son regard critique important sur mon travail et pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues pour atteindre les objectifs. N'oublions pas que le retour à la thérapie est très important !

Je tiens à remercier le Dr Palma Rocchi, le Dr Sylvie Gazzeri et le Dr Olivier Cuvillier, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Merci au Dr Nicolas Foray, pour son œil critique lors des deux comités de thèse effectués au cours de ces 3 années, ainsi que pour sa présence au sein de mon jury.

Merci au Pr Laurent Guy, pour l'aide et le soutien clinique qu'il apporte à ce projet par l'initiation d'un travail collaboratif, qui, je n'en doute pas, sera prometteur. Malheureusement je n'aurais pas la chance de poursuivre moi-même cette étude. Merci également d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci à Claude, pour les discussions que nous avons eu pendant ces 3 années, en réunion, au café, entre deux portes, au bureau, bref toutes les occasions sont idéales pour parler « science » !

Merci à toi, Corinne, pour ton aide dans la rédaction de mon article et ton œil avisé, j'espère que ce travail sera très rapidement payant. Mais surtout merci d'avoir apporté le soutien féminin au sein de cette équipe d'hommes !!

Merci également à Cyrille, le « petit » nouveau de l'équipe, pour les discussions et ton aide lors de ces derniers mois. Bon courage pour la suite, les étudiantes savent ne pas être tendres !

Pour terminer au sein de l'équipe, merci à Rafik, mon « compagnon » de galère sur cette protéine de malheur ! Je te laisse en bonne compagnie,…... celle des contaminations de la salle de culture, ah que de galères avec ces cellules, enfin s'il y avait que ça… Bref, bon courage pour la fin de ta thèse, et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci également à Sabrina Maquaire, Michelle Manin, et Georges Alves qui sont partis au cours de ma thèse, mais avec lesquels les relations aussi bien

scientifiques qu'humaines ont permis de rendre ce travail au sein du laboratoire fructueux et agréable.

Un immense merci à Angélique de Haze, pour son aide et ses conseils techniques ainsi que ses petites astuces pour améliorer le rendement et la qualité des résultats. Sans toi le clonage aurait été bien compliqué. Merci également à Jean Paul Saru pour son aide pour les Western Blot quand je suis arrivée au laboratoire et pour les manips avancées pendant les enseignements.

Merci à Emmanuel Chautard, alias « Dr Manu », pour les discussions que nous avons eues, pendant ma thèse et même avant en Master ainsi que pour ta bonne humeur et ton optimisme. Merci de m'avoir permis de faire mes manips « rayons » au Centre Jean Perrin. Et au fait, « J'ai une question…. » !

Merci aux « filles », parties ou présentes jusqu'à la fin :
Emilie V., je te souhaite tout le meilleur j'espère que ton périple américain continuera aussi bien qu'il a commencé. Quand tu reviendras en France, ce que je te souhaite, fait signe, à nous toutes, et on se rappellera nos années labo.
Emilie P., bon courage pour cette fin de thèse, j'espère qu'elle se passera au plus prés de ce que tu souhaite et pour être passée par là, tout se décante la dernière année.
Annabel, tu viens de soutenir ta thèse, ça c'est fait ! J'espère que la suite sera aussi gratifiante et récompensée que tes 3 années de thèse, même si celles-ci n'ont pas été toutes roses non plus. Mais je ne me fais pas de soucis, tu as les moyens d'aller très très loin.
Julie, ton enthousiasme à l'idée de rencontrer Brad et même de l'épouser, va me manquer, saches que dorénavant je ne ferais plus jamais un dosage de protéine de la même manière. Ta dernière ligne droite s'est bien passée aussi, c'est l'essentiel, tu mérites bien ça après ce que les souris et autres manips t'ont fait voir !! Je te souhaite un bon déménagement (Enfin !), une bonne installation à Lyon et pleins de bonheur…
A vous toutes merci pour ces moments de décompression au repas de 11h30 tapante, pour les éclats de rires et autres moments de détente, mais également, pour les discussions scientifiques plus sérieuses et oui, on travaille !!!

Je souhaite bon courage et tout le meilleur pour les « nouveaux » thésard : Marine, Coralie, Emmanuelle, ainsi que les M2, Rosine bon courage pour la suite.

Merci à nos amis, Sandra, Céline, Nico, Eric, et Dudu, pour nos petites soirées qui m'ont permis de me changer les idées, de penser à autre chose un court instant pendant nos parties karaoké et ces moments déguisements pour des occasions très spéciales !!!

Avant de terminer, je voudrais dire un énorme merci, et encore le mot n'est pas assez fort, à ma famille, pour leurs encouragements tout au long de ces huit années universitaires, pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles, et il y en a eus !! Merci à mes parents, ainsi qu'à mes grands-parents pour avoir cru en moi et m'avoir donné la force de me battre tout les jours pour aboutir ce projet. Sans eux la guerre aurait été beaucoup plus difficile !! Un énorme merci !!!!!

Enfin, merci à toi, Ludovic, pour ton soutien dans cette dernière ligne droite, qui ne fût pas des plus facile. Merci d'avoir cru en moi et pour m'avoir soutenue dans les moments de galère, merci de m'avoir donné confiance, pour ta patience et ton aide très précieuse,……. Cette réussite, je te la dois et c'est un peu la nôtre !! Maintenant que ce chapitre est terminé, ensemble on écrit autre chose,…….. .

Résumé

La prolifération, la migration et l'invasion sont des processus cellulaires biologiques fondamentaux qui sont régulés par une multitude de signaux extracellulaires. L'intégration de ces stimuli au niveau de différentes voies de signalisation intracellulaires permet d'adapter les capacités des cellules à exercer ces fonctions aux conditions du milieu extérieur. Outre des évènements génétiques tels que les mutations ou les translocations chromosomiques, des dérégulations des capacités de prolifération, de migration et d'invasion des cellules sont retrouvées lors de la mise en place d'un processus tumoral. La protéine nucléophosmine (NPM1) est un acteur important dans le contrôle de la balance prolifération/apoptose. Initialement décrite pour son rôle dans la biogénèse des ribosomes, NPM1 participe à de multiples processus cellulaires comme la duplication des centrosomes, la progression du cycle cellulaire et la transcription génique. NPM1 est ainsi fréquemment surexprimée dans les tumeurs solides d'origines histologiques variées, parmi lesquelles les cancers du colon, du poumon ou encore les tumeurs ovariennes. Les travaux antérieurs de l'équipe ont mis également en évidence que la protéine NPM1 est surexprimée dans les tissus de carcinomes prostatiques en comparaison avec le tissu adjacent sain.

Mon travail de thèse avait pour objectif d'étudier l'impact d'une surexpression de NPM1 dans la progression des cancers de la prostate. Nous avons dans un premier temps analysé, *in vitro* et *in vivo*, les capacités invasives de cellules caractéristiques d'un stade avancé de cancers de la prostate en fonction du niveau d'accumulation de NPM1. Les résultats obtenus suggèrent que la protéine NPM1 intervient dans le processus tumoral en activant des mécanismes prolifératifs, migratoires et invasifs des cellules tumorales de prostate. Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer la nature des gènes dont la transcription était susceptible d'être affectée par l'expression de NPM1. L'analyse en qPCR array met en évidence que l'expression du facteur de croissance EGF est diminuée dans un contexte d'inhibition de NPM1, ainsi que l'activation de la voie de prolifération en aval ERK1/2. Enfin, l'activation constitutive de cette voie révèle que le rôle de NPM1 se situe en aval du récepteur EGFR et en amont de l'effecteur MEKK1, activateur de la voie ERK1/2.

Ces données indiquent que NPM1 pourrait conférer un avantage prolifératif et invasif aux cellules tumorales de prostate. En revanche, cette protéine ne serait pas un initiateur de la tumorigénèse mais un potentialisateur de la progression des cancers de la prostate suite à des évènements génétiques initiateurs. Dans ce contexte et sur la base de nos travaux, nous proposons comme perspective que l'inhibition de l'accumulation de NPM1, protéine qui active la voie de survie ERK1/2 et qui agit parallèlement sur la disponibilité de contrôleurs du cycle cellulaire et de l'apoptose (e.g. P53), puisse potentialiser l'action d'agents thérapeutiques déjà utilisés comme des inhibiteurs de tyrosines kinases (gefitinib®).

Abstract

The chaperone nucleophosmin (NPM1) is over-expressed in the epithelial compartment of tumoral prostate glands compared to adjacent healthy tissue and may represent one of the key actors that support the neoplastic phenotype of prostate adenocarcinoma cells. Yet, the mechanisms that underlie NPM1 mediated phenotype remain elusive in the prostate. NPM1 is a major multifunctional nucleolar phospho-protein expressed at high level in the granular region of the nucleolus with capacities of shuttling between the nucleolus and the cytoplasm. Initially identified as a major regulator of the ribosome biogenesis, it was more recently demonstrated to bind to histones, to mediate nucleosome formation and to relax chromatin, thereby controlling gene expression. Furthermore, NPM1 was shown to interact with and to inhibit the tumour suppressor proteins P53 and Rb, and consequently to potentiate cell growth and proliferation. All these data emphasize a proto-oncogenic function of NPM1 although some authors described a tumour suppressive function for NPM1 as it acts as a regulator of centrosome duplication and thus may lead to cell apoptosis. All this studies revealed that NPM1 acts as both tumour suppressor and proto-oncogene during tumourigenesis. Although NPM1 detailed functions are starting to be clarified, the role of NPM1 in solid tumours remains to be determined. Here we addressed the question whether NPM1 could potentiate proliferation, migration and invasion capacities of prostate cancer cells and deciphered the mechanism by which it exerts such a control on tumour cell behaviour. Our results show that NPM1 favors cell migration, cell invasion and colony forming of prostate tumor cells. Furthermore, in vivo knock-down of NPM1 leads to a decrease in the growth of LNCaP-derived tumors grafted in nude mice. Such oncogenic-like properties are exerted via a positive regulation of NPM1 on the ERK1/2 kinase phosphorylation in response to EGF stimuli, stimuli which are emphasized in prostate tumours following the setting of an autonomous production of the growth factor.

NPM1 could be a target to switch off specifically ERK1/2 pathway activation in order to decrease or inhibit proliferation and to potentiate actual targeted therapies based on EGFR specific inhibition.

Abréviations

A

ADN: Acide DésoxyriboNucléotique

ADT: Androgen Depletion Therapy

AIGF: Androgen-Induced Growth Factor

An: Androgens

ALCL: Anaplastic Large Cell Lymphoma

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase

AP2α: Activating Protein transcription factor 2α

APL: Acute Promyelocytic Leukaemia

AR: AmphiReguline

AR: Androgen Receptor

ARF: Alternate Reading Frame

ARN: Acide RiboNucléique

ARNr: Acide RiboNucleique ribosomal

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP: Adenosine TriPhosphate

ATR: Ataxia Telangiectasia Related

B

BAD: BCL2-Associated agonist of cell Death

BARD1: Breast Cancer 1-Associated RING Domain protein 1

BAX: Bcl-2 Associated X

Bcl-2: B-Cell Lymphoma 2

Bcl-xl: BCL2-Like1

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor

BRCA1: Breast Cancer 1

BTC: β-Celluline

C

CaP: Cancers Prostatiques

Cbl: Casitas B-lineage Lymphoma

Cdc2 : Cell Division Control 2

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

CDKi : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor

CgA : Chromogranine A

CIS: Carcinoma *in situ*

CK: CytoKeratin

CK2: Caseine Kinase 2

CPHR: Cancer de la Prostate HormonoRésistant

CR1/2: Cystein-Rich1/2

CRM1: ChRomosome Maintenance region 1

Cre: Cellular recombinase

CYP17: CYtochrome P-450c 17α

D

DAG: DiAcylGlycerol

DBD: DNA Binding Domain

DHT: DiHydroxyTestostérone

$\mathcal{E}$

ED: Epithelial Dysplasia

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EIF2α: Eukaryotic translation Initiation Factor 2α

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition

EPG: EPiGène

EPR: EPiRéguline

ER: Estrogen Receptor

ERG: Ets Related Gene

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases

ES (ES cells): Embryonic stem (cells)

ETS: External Transcribed Spacer

$\mathcal{F}$

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

FOXM1: FOrkhead boX M1

$\mathcal{G}$

Gab1: Grb2 associated binding protein 1

GBM: GlioBlastoMa

GDP: Guanosine DiPhosphate

GFP: Green Fluorescent Protein

Grb2: Growth factor receptor-bound protein

GRIP1: Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3

GTP: Guanosine TriPhosphate

$\mathcal{H}$

H2AX: H2A histone family member X

HB-EGF: Heparin Binding Growth Factor

HBP: Hypertrophie Bénigne de la Prostate

HD: Heterodimerization Domain

HDAC: Histone DeACetylase

HDM2: Human Double Minute 2

HE: Hématoxyline/Eosine

HEMIM1: Hexamethylene bis-acetamide inducible 1

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HGPIN: High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia

HIF: Hypoxia Inductible Factor

HIFU: Hight-Intensity Focused Ultrasound

HPC1: Hereditary Prostate Cancer 1

$\mathcal{I}$

IFIs: Inducible Feedback Inhibitors

IGFs: Insulin-like Growth Factor

IGF-BP: Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IGFR: Insulin-like Growth Factor Receptor

IL: InterLeukin

INα2: INtegrin α2

IP3: Inositol 1,4,5-triPhosphate

IRF1: Interferon Regulatory Factor 1

ITS: Internal Transcribed Spacer

$\mathcal{J}$

JAK: JAnus Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

$\mathcal{K}$

kDa: kiloDalton

KGF: Keratinocyte Growth Factor

$\mathcal{L}$

LHRH: Luteinizing Hormon-Releasing Hormone

LNCaP: Lymph Node Carcinoma of the Prostate

LRIG1: Leucin-Rich and ImmunoGlobulin-like domain protein 1

$\mathcal{M}$

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MCL-1: Myeloid Cell Leukemia 1

MDM2: Mouse Double Minute 2

MEK =MAPKK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast

MLF1: Myelodysplasia-Myeloid Leukemia Factor 1

MMPs: Matrix MetalloProteinases

MDS: MyeloDysplastic Syndrome

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

MXI1: MAX-Interacting protein 1

$\mathcal{N}$

NE: NeuroEndocrienne

NES: Nuclear Export Signal

NFκB: Nuclear Factor kappa B

NGF: Nerve Growth Factor

NK: Natural Killer

Nkx3.1: NK homeobox3.1

NoLS : Nucleolar Localisation Signal

NPM1 : NucleoPhosMin 1

NRG : NeuRéGuline

NSE : Neuron-Specific Enolase

NuLS : Nuclear Localisation Signal

$\mathcal{O}$

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

$\mathcal{P}$

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PDK1: PI3K-Dependent serine/thréonine Kinases 1

PG1: Prostate cancer susceptibility Gene 1

PI3K: PhosphoInositide 3-OH Kinase

PIAS: Protein Inhibitors of Activated STAT

PIN: Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PIP2: PhosphatidylInositol-4,5-bisPhosphate

PIP3: PhosphatidylInositol-3,4,5-triPhosphate

PKA, B, C: Protein Kinase A, B, C

PKR: Protein Kinase RNA-activated

PLCγ: PhosphoLipase C gamma

Plk1: Polo-like kinase 1

PrGF: Prostate Growth Factor

PSA: Prostate Specific Antigen

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

PTP: Protein Tyrosine Phosphatase

$\mathcal{R}$

RALT: Receptor-Associated Late Transducer

RARα: Retinoid Acid Receptor α

Rb: Retinoblastoma

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

$\mathcal{S}$

SH2: Src Homology 2

SAPK: Stress-Activated Protein Kinase

SCC: Squamous Cell Carcinoma

SCR: SCRambled

Sh: short hairpin

SIRT1: SIRTuin 1

SL-1: SeLectivity factor 1

SNBP: Sperm Nuclear Binding Protein

SOCS 4/5: Suppressors Of Cytokine Signaling 4/5

SOS: Son Of Sevenless

STAT3: Signal Transducers and Activators of Transcription 3

SUMO-1: Small Ubiquitin-related Modifier 1

$\mathcal{T}$

TFM: Testicular Feminized Mouse

TGF: Transforming Growth Factor

TIF2: Transcriptional mediators-Intermediary Factor 2

TIMP-1: Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase 1

TMPRSS2: TransMembrane PRoteaSe Serine 2

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor

TNM: Tumeur, Node, Métastatse

TTF1: Terminaison Transcription Factor 1

$\mathcal{U}$

UBF: Upstream Binding Factor

UGE: UroGenital sinus Epithelium

UGM: UroGenital sinus Mesenchyme

UGS: UroGenital Sinus

$\mathcal{V}$

VDEC: *vas deferens* Epithelial Cells

VEGF: Vascular Endothelial Growth factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

w

WT: Wild Type

x

XRT: External beam Radiation Therapy

Table des figures

Figure 1 : Localisation et anatomie de la prostate humaine ---------- 12

Figure 2 : Modèle de lignage des cellules épithéliales dans la prostate ---------- 14

Figure 3 : Cinétique d'évolution de la morphogenèse de la prostate chez l'homme ---------- 16

Figure 4 : Localisation et expression des récepteurs des stéroïdes au cours du développement de la prostate chez la souris ---------- 18

Figure 5 : Contribution du mésenchyme et de l'épithélium dans le développement de la prostate -- 20

Figure 6 : Répartition des cancers les plus fréquents chez l'homme ---------- 24

Figure 7 : Prévalence des cancers de la prostate chez l'homme en France ---------- 26

Figure 8 : Stades d'évolution du cancer de la prostate ---------- 30

Figure 9 : Régulation de la progression du cycle cellulaire ---------- 38

Figure 10: Accélérateur de particules utilisé pour la radiothérapie externe ---------- 48

Figure 11 : Traitement d'un cancer de la prostate par brachythérapie (ou curiethérapie) ---------- 50

Figure 12 : Traitement d'un cancer de la prostate par cryothérapie ---------- 50

Figure 13 : Mode d'action des facteurs de croissance dans les cellules prostatiques saines et tumorales ---------- 52

Figure 14 : Mécanisme d'activation des voies de signalisation dépendantes des TGFβs ---------- 58

Figure 15 : Rôle des IGF-BPs dans le contrôle de la prolifération des cellules prostatiques saines et tumorales ---------- 60

Figure 16 : Voies de signalisation induites par la cytokine IL-6 après fixation sur son récepteur ------ 62

Figure 17 : Mode d'action du VEGF dans la croissance des tumeurs prostatiques ---------- 64

Figure 18 : Structure schématique du récepteur de la famille ErbB ---------- 68

Figure 19 : Diagramme de Venn de la répartition des ligands des récepteurs de la famille ErbB ------ 70

Figure 20: Représentation schématique des sites d'interaction des protéines adaptatrices sur les tyrosines phosphorylées des récepteurs ErbB ---------- 72

Figure 21 : Voies de transduction médiées par EGFR ---------- 76

Figure 22 : Mécanisme d'inhibition de l'activité de EGFR par internalisation ---------- 78

Figure 23 : Structure des inhibiteurs rétroactifs inductibles contrôlant l'activité de EGFR ---------- 80

Figure 24 : Mécanismes d'inhibition de EGFR par LRIG1, SOCS4 et SOCS5 ---------- 82

Figure 25 : Mécanisme d'inhibition de EGFR par RALT ---------- 82

Figure 26 : Régulation de la signalisation EGFR par le récepteur des androgènes ---------- 92

Figure 27 : Activation de la transcription dépendante de AR en absence d'androgènes ---------- 94

Figure 28 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille NPM ---------- 98

Figure 29 : Organisation structurelle et fonctionnelle des domaines de la protéine NPM1 ----------102

Figure 30 : Sites de phosphorylation et d'acétylation de NPM1 ----------104

Figure 31 : Effet de l'inactivation génique de *npm1* sur le développement embryonnaire----------106

Figure 32 : Structure du nucléole ----------106

Figure 33 : Etapes de maturation du pré-ARN 47S en ARNr 18S, 5.8S et 28S ----------108

Figure 34 : Schéma des différentes phases constituant le cycle cellulaire ----------110

Figure 35 : Rôle de NPM1 dans la duplication des centrosomes ----------110

Figure 36 : Rôle de l'interaction NPM1-ARF dans le contrôle de la croissance cellulaire et la prolifération ----------116

Figure 37 : Niveaux d'expression de NPM dans des échantillons de biopsies humaines ----------128

Figure 38 : Activité transcriptionnelle de AR en fonction des niveaux d'expression de NPM1 --------128

Figure 39 : Niveaux d'expression de NPM1 dans les cellules de canal déférent de souris (VDEC) ----130

Figure 40 : Analyse de la clonogénicité des cellules tumorales de prostate suite à la surexpression de NPM1 ----------140

Figure 41 : Analyse des marqueurs de réparation dans les cellules LNCaP contrôles et inhibées pour NPM1 ---------- 142

Figure 42 : Modèle d'action de NPM1 dans les cellules tumorales prostatiques---------- 150

Figure 43 : Modèle de régulation des fonctions de k-Ras par NPM1 ----------152

Figure 44 : Analyse histologique de la prostate des souris Wild Type ou surexprimant NPM1 --------154

Figure 45 : Caractérisation des souris transgéniques qui surexpriment NPM1 ----------156

Figure 46 : Analyse de l'état d'accumulation du marqueur de différenciation Nkx3.1 dans les souris transgéniques ----------158

Figure 47 : Niveaux d'expression de marqueurs de différenciation suite à l'inhibition de NPM1 ----158

Figure 48 : Mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire suite à la présence de dommages à l'ADN après irradiation ----------160

Figure 49 : Caractéristiques cellulaires mises en place au cours de la tumorigénèse ----------164

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification TNM des cancers de la prostate définie par l'OMS ---------- 42

Tableau 2 : Caractéristiques histopathologiques permettant de déterminer le grade des tumeurs prostatiques ---------- 44

Tableau 3 : Récapitulatif des mutations des récepteurs ErbB ou de leurs ligands et les conséquences associées ---------- 84

Tableau 4 : Fréquence de surexpression de EGFR dans les tumeurs humaines ---------- 84

Tableau 5 : Effet des modifications post-traductionnelles sur l'activité de NPM1 ----------104

Tableau 6 : Récapitulatif des différentes protéines qui interagissent avec NPM1 ----------112

Tableau 7 : Principales altérations de NPM1 dans les cancers humains ----------120

Sommaire

Sommaire 1

Introduction bibliographique 11

Chapitre 1 : Physiologie et physiopathologie de la prostate 13

1) Physiologie de la prostate 133

a. Description structurelle et fonctionnelle de la glande prostatique 133

b. Morphogénèse de la glande prostatique 155

1. Les étapes du développement 155

2. Rôle des stéroïdes dans la physiologie de la prostate et importance dans le développement 177

3. Rôle des interactions épithélium-mésenchyme dans le développement de la prostate et la réponse aux androgènes 199

2) Physiopathologie de la prostate : le cancer de la prostate 233

a. Généralités sur les pathologies prostatiques 233

1. Les prostatites 233

2. L'hyperplasie bénigne de la prostate 255

b. Epidémiologie et facteurs de risques de cancer de la prostate 255

1. L'âge 255

2. L'appartenance ethnique 277

3. Les antécédents familiaux 277

4. L'alimentation 299

5. Le statut hormonal 299

c. La carcinogénèse prostatique 31

1. Stades d'évolutions de la maladie 333

2. Facteurs impliqués dans l'initiation 333

3. Facteurs impliqués dans les phases de promotion et de progression 355

d. Classification histologique des tumeurs prostatiques 41

1. La classification TNM 433

2. La classification synthétique, dite d'Amico 433

3. La classification histologique : le système de Gleason 433

e. Le diagnostic 455

f. Les traitements 477

1. Traitements dans le cas d'un cancer de la prostate localisé 477

2. Traitements dans le cas d'un cancer de la prostate avancé 499

Chapitre 2 : Implication des voies de signalisations des facteurs de croissance dans le cancer de la prostate 555

1) Les facteurs de croissance.....555

2) Principaux facteurs de croissance impliqués dans la physiologie et la pathologie de la prostate 577

a. Fibroblast growth factors 577

b. Transforming growth factor-beta family..... 577

c. Insulin-like growth factor family 599

d. IL-6 et autres cytokines 61

1. IL-6 et cancer de la prostate..... 61

2. Autres cytokines 633

e. Vascular endothelial growth factor family 655

f. Epidermal growth factor family..... 677

3) La voie EGFR/EGF 699

a. Le récepteur EGFR 699

1. Structure du récepteur..... 699

2. Ligands et activation du récepteur..... 71

3. Transduction du signal médiée par EGFR..... 733

4. Régulation de l'activité de EGFR..... 799

5. Le système récepteur/ligands dans le développement 81

6. EGFR et oncogenèse..... 833

b. EGF et mobilité cellulaire dans le processus d'invasion tumorale 877

4) Implication de la transduction initiée par le complexe EGF/EGFR dans le cancer de la prostate 899

a. Dérégulation de EGF dans le cancer de la prostate et ses conséquences 899

b. EGF et AR dans le cancer de la prostate..... 91

1. Régulation de la signalisation dépendante de EGFR par le récepteur des androgènes ... 91

2. Régulation du récepteur des androgènes et de sa transactivation par EGF..... 933

Chapitre 3 : La protéine chaperonne Nucléophosmine 977

1) Généralités.....977

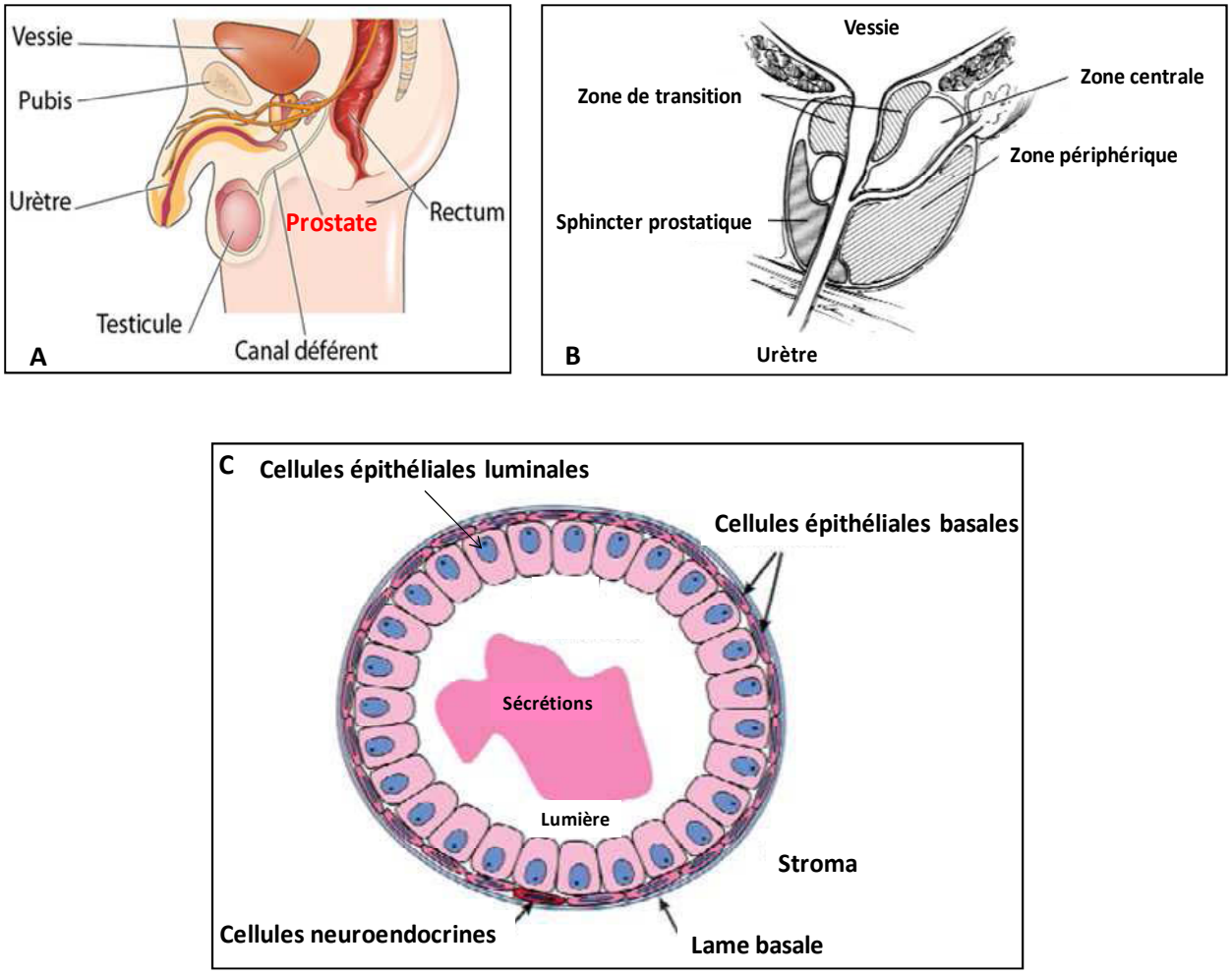
2) La famille Nucléophosmine/Nucléoplasmine 977

a. Membres de la famille..... 977

b. Conservation au cours de l'évolution 999
c. Organisation structurelle et fonctionnelle de NPM1 101
1. Structure et domaines fonctionnels 101
2. Modifications post-traductionnelles de NPM1 1033
3) Les fonctions physiologiques de NPM1 1077
a. Rôle de NPM1 dans le développement embryonnaire 1077
b. Rôle de NPM1 dans la biogenèse des ribosomes 1077
c. Rôle de NPM1 dans le cycle cellulaire 11111
d. Rôle de NPM1 dans l'organisation de la chromatine et la transcription génique 1133
4) NPM1 et cancer 1155
a. Controverse entre suppresseur de tumeur et proto-oncogène 1155
1. NPM1 est-elle un suppresseur de tumeur ? 1155
2. NPM1 est-elle un proto-oncogène ? 1199
b. Principales altérations génétiques de NPM1 dans les physiopathologies et les cancers 12121
1. Altérations de NPM1 dans les tumeurs hématopoïétiques 12121
2. Altérations de NPM1 dans les tumeurs solides 1233
Présentation du sujet 127
Résultats 133
1) Présentation succinte du contexte de recherche 1355
2) Article: Nucleophosmin/B23 enhances migration and invasion by activating the ERK1/2 pathway in prostate cancer cells 1399
3) Résultat complémentaire à l'article en cours de soumission 14141
4) Résultats complémentaires 1433
Discussions & Perspectives 145
1) Rôle de la Nucléophosmine dans les processus invasifs des cellules tumorales de prostate 1477
2) Rôle de la Nucléophosmine dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN et cible thérapeutique potentielle. 16161
3) Conclusion générale 1655
Annexes 167

Références bibliographiques..... 171

Introduction bibliographique



<u>Figure 1 :</u> Localisation et anatomie de la prostate humaine

A : Schéma de localisation de la prostate au sein de l'appareil génital mâle.

B : Schéma de l'anatomie et de la zonation de la prostate humaine, coupe sagittale (d'après (Abate-Shen & Shen, 2000).

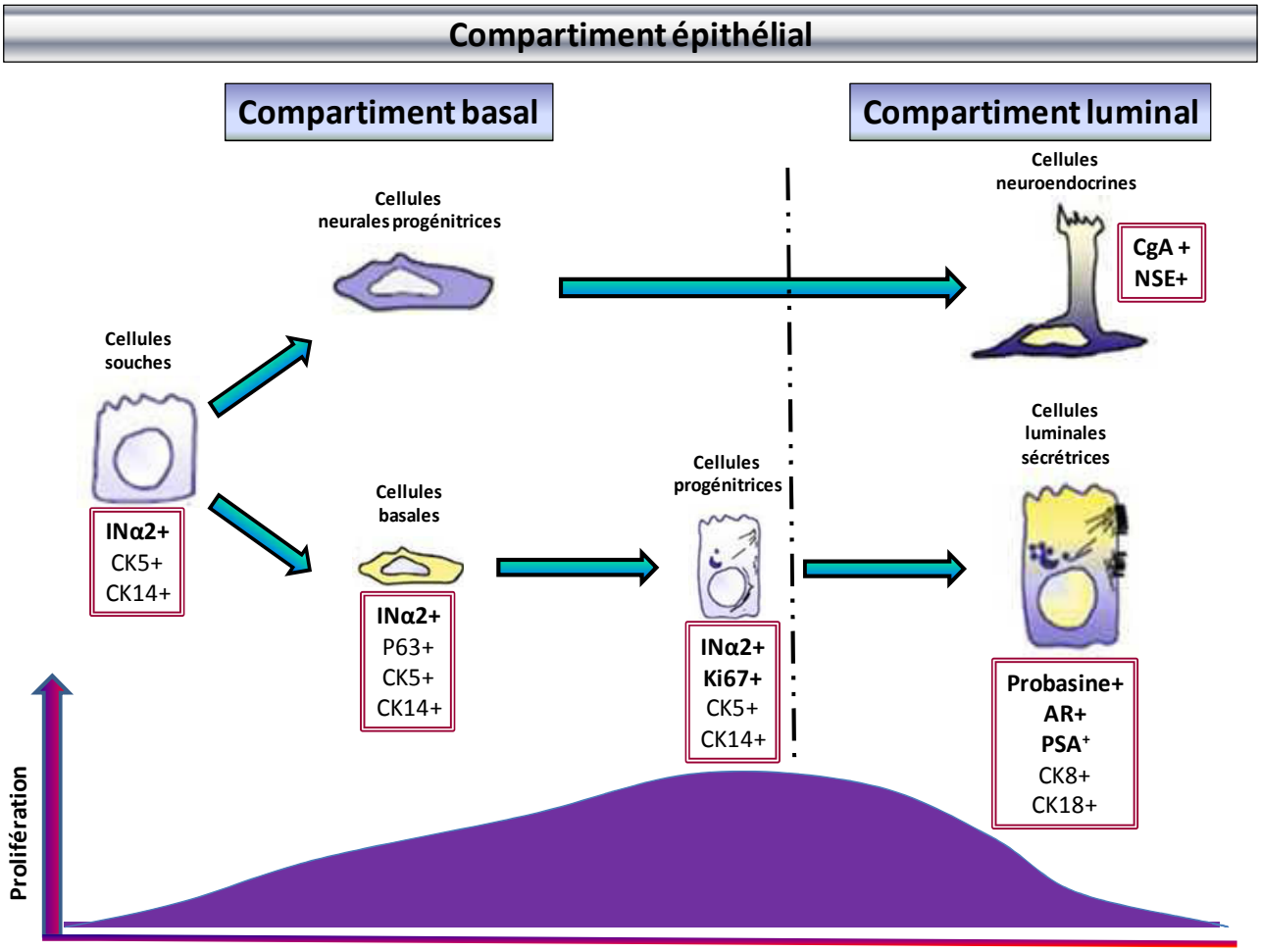
C : Représentation des différents types cellulaires formant une glande prostatique humaine. Il est important de noter que les cellules neuroendocrines ne se distinguent pas morphologiquement des cellules du compartiment basal (d'après (Abate-Shen & Shen, 2000).

Chapitre 1 : Physiologie et physiopathologie de la prostate

1) Physiologie de la prostate

a. Description structurelle et fonctionnelle de la glande prostatique

La prostate est une glande exocrine appartenant à l'appareil génital masculin, située sous la vessie et entourant l'urètre **(figure 1A).** A la naissance, la prostate a la taille d'un pois et augmente rapidement de volume au cours de la puberté, pour atteindre à l'âge adulte au maximum 4cm de diamètre et peser 15 à 20g. La glande prostatique comporte trois lobes : deux lobes latéraux réunis en avant par un isthme et en arrière par le lobe médian situé, lui, au-dessus de l'abouchement des canaux éjaculateurs qui amènent le sperme dans l'urètre prostatique. La prostate n'est pas une glande uniforme, elle est formée de trois zones principales : la zone centrale, la zone de transition et la zone périphérique. La zone de transition est glandulaire, elle se trouve en contact direct avec l'urètre et l'entoure dans sa traversée de la glande. La zone centrale entoure la zone de transition, c'est une portion non glandulaire composée d'un stroma dense. La zone périphérique, quant à elle, est une partie glandulaire postérieure de la prostate et se trouve au contact du rectum. Elle représente environ 80% du volume de la glande prostatique **(figure 1B)**. A ces trois zones principales, on peut ajouter une zone antérieure qui se trouve être la région de la prostate la plus proche de l'abdomen. Elle est composée d'un tissu fibro-musculaire non glandulaire. Le tissu prostatique est formé d'une cinquantaine de lobules, ou acini, soutenus par un stroma constitué d'un tissu fibro-musculaire : ces lobules sont des unités fonctionnelles dont les sécrétions sont drainées par de multiples conduits à l'urètre. Les acini sont bordés par un épithélium bi-stratifié composé de différentes cellules épithéliales. Chaque glande (ou acinus) est composée d'une couche de cellules épithéliales luminales sécrétrices qui bordent la lumière des canaux. Celles-ci reposent sur une couche discontinue de cellules épithéliales basales, aplaties le long de la membrane basale, entre lesquelles s'intercalent des cellules souches et neuroendocrines **(figure 1C)**. L'épithélium contient également des cellules progénitrices et des cellules transitoires qui sont à un niveau de différenciation intermédiaire entre les cellules basales et les cellules luminales (Tran *et al.*, 2002). Au cours du processus de différenciation cellulaire, les cellules basales vont dans un premier temps se différencier en cellules progénitrices (ou intermédiaires) qui ont la particularité de posséder un



<u>Figure 2:</u> Modèle de lignage des cellules épithéliales dans la prostate

Les cellules souches basales peuvent se différencier en cellules progénitrices, qui vont être à l'origine des cellules luminales sécrétrices, ou en cellules neurales progénitrices à l'origine des cellules neuroendocrines. Chaque population cellulaire exprime des marqueurs spécifiques permettant de les différencier et attribués à leur fonction.

(D'après (Kasper, 2008; Zenzmaier *et al.*, 2008)

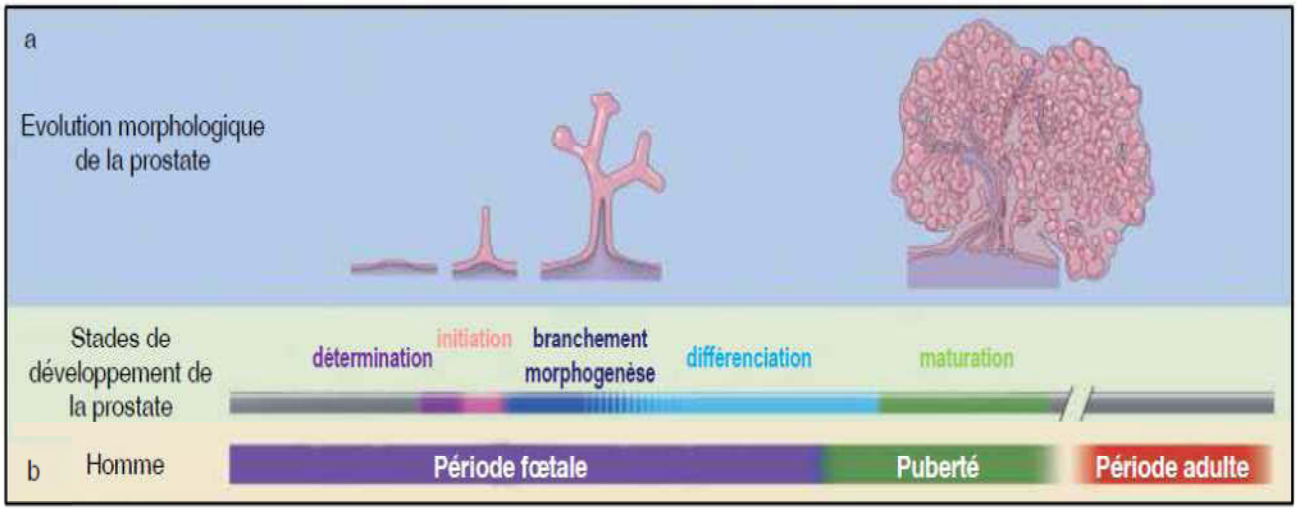
potentiel prolifératif important. Ces cellules vont exprimer des marqueurs spécifiques comme le Ki67 et l'intégrine α2 (INα2). Dans la prostate saine, les cellules progénitrices vont se différencier en cellules épithéliales luminales exprimant le marqueur probasine, ou en cellules neuroendocrines qui expriment spécifiquement la chromogranine A. Ces cellules ont, quant à elles, de faibles capacités prolifératives. Chaque sous-population de cellules épithéliales exprime également des gènes dont les produits peuvent être utilisés comme marqueurs spécifiques d'identification. Ainsi, les cytokératines 5, 8, 14 et 18, principalement exprimées par paires, auront des profils d'expression différents selon le stade de différenciation auquel se trouve la cellule. Le récepteur des androgènes (AR) et la protéine p63 sont également des marqueurs des cellules épithéliales luminales et basales, respectivement **(figure 2)**. Les cellules du stroma fibro-musculaire entourant les acini sont responsables de la production de facteurs de croissance, tels que l'IGF (Insulin-like Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGFα (Transforming Growth Factor α) en réponse aux androgènes.

L'une des principales fonctions de la glande prostatique est la sécrétion, par les cellules épithéliales, du fluide prostatique qui entre dans la composition du sperme. Ce fluide a un rôle dans la motilité des spermatozoïdes par la présence des prostasomes, petites vésicules lipidiques, qui présentent des propriétés immunosuppressives et anti-oxydantes (Fabiani *et al.*, 1994; Kelly, 1999). Il a également un rôle nourricier et protecteur des spermatozoïdes lors de leur migration dans les voies génitales femelles contre les agents pathogènes (Sitaram & Nagaraj, 1995). Outre le liquide prostatique, qui constitue la partie la plus importante de l'éjaculat, la prostate sécrète aussi des protéines comme l'antigène spécifique de prostate (PSA : Prostate Specific Antigen) qui est une glycoprotéine produite uniquement par les cellules épithéliales de la prostate. La PSA est responsable de la liquéfaction du sperme.

b. Morphogénèse de la glande prostatique

1. Les étapes du développement

Contrairement à la plupart des glandes annexes mâles dont le développement se fait à partir des canaux de Wolff d'origines mésodermiques, la glande prostatique provient du sinus urogénital (UGS : UroGenital Sinus) qui est une structure endodermique. Bien que le développement de la prostate soit un processus continu, il peut être classé en cinq étapes bien distinctes: la détermination, l'initiation (ou bourgeonnement), la morphogenèse des branches, la différenciation et la maturation à la puberté **(figure 3)** (Prins & Putz, 2008). Chez l'homme ce processus de développement se déroule chez le fœtus pendant les deuxième et troisième trimestres de grossesse et se termine au moment de la naissance (Prins & Putz, 2008). Le développement de la prostate commence à partir de



<u>Figure 3</u> : Cinétique d'évolution de la morphogenèse de la prostate chez l'homme

A : Illustration des cinq étapes du développement de la prostate : la détermination des cellules qui formeront une prostate, l'initiation et la formation des bourgeons, la morphogenèse de branchement, la différenciation cellulaire et la maturation des glandes prostatiques.

B : Cinétique de mise en place des différentes étapes de développement au cours de la période fœtale, pubertaire puis adulte chez l'homme.

(D'après (Prins & Putz, 2008)

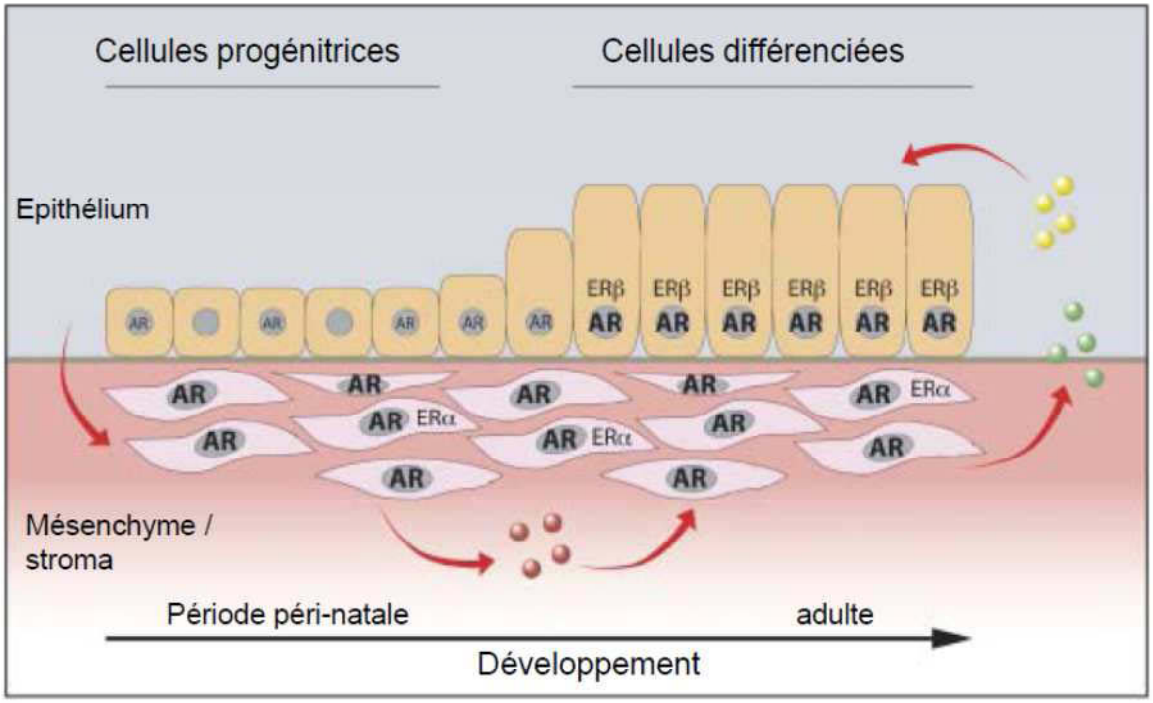
la 10ème semaine de gestation. Les excroissances vont ensuite former des cellules épithéliales organisées en cordon (étape d'initiation) qui, au stade de la morphogenèse, vont s'allonger et former les branchements qui vont donner naissance à des canaux. Sous l'influence des androgènes, ces canaux vont former la lumière en fin de vie foetale. Les cellules de l'épithélium qui bordent les acini vont se différencier en cellules épithéliales basales ou luminales et/ou en cellules neuroendocrines avant de synthétiser divers produits de sécrétion (Timms, 2008). Il s'agit là de l'étape de différenciation. A la naissance, les glandes entrent dans une phase de latence. A la puberté, la prostate est mature et les cellules épithéliales luminales sécrètent l'ensemble des composants du fluide prostatique.

2. *Rôle des stéroïdes dans la physiologie de la prostate et importance dans le développement*

✓ Les androgènes

Les étapes de détermination et d'initiation du développement prostatique sont entièrement dépendantes de l'action des androgènes produits au cours de la vie fœtale, à partir de la 8ème semaine. La castration chez la souris, pendant la vie fœtale, entraine une inhibition du développement prostatique (Cunha, 1973). Des études de cultures d'explants d'UGS issus d'embryons de souris à différents stades de développement, en absence ou en présence d'androgènes, ont montré que ces derniers sont essentiels aux étapes de détermination et d'initiation et que les bourgeons prostatiques déjà imprégnés par les androgènes, peuvent se développer en absence d'androgènes (Cunha, 1973). En revanche, ces explants, bien qu'imprégnés par les androgènes, nécessitent l'ajout d'hormones dans le milieu de culture pour parvenir au stade de différenciation terminale (Lipschutz *et al.*, 1997). Les androgènes sont donc essentiels dans l'initiation et le bon développement de la prostate jusqu'à un stade adulte.

L'androgène actif responsable du développement de la prostate est la DiHydroTestostérone (DHT), qui résulte de la conversion de la testostérone par la 5α-réductase dans l'épithélium prostatique (Wilson & Gloyna, 1970). L'action et l'importance de la DHT ont été mises en évidence par l'étude de patients atteints du syndrome de déficience de la 5α-réductase, pour lesquels on constate une absence complète de morphogenèse prostatique mais un développement normal des vésicules séminales et des canaux déférents (Siiteri & Wilson, 1974). Bien que les androgènes soient essentiels au développement de la glande prostatique, le récepteur des androgènes (AR) est tout aussi essentiel. L'action des androgènes, et donc de la testostérone, est possible que par son



<u>Figure 4</u> : Localisation et expression des récepteurs des stéroïdes au cours du développement de la prostate chez la souris

Au cours de la période périnatale, le récepteur des androgènes (AR) est fortement exprimé dans les cellules mésenchymateuses et faiblement ou pas exprimé dans les cellules progénitrices du compartiment épithélial. En réponse aux androgènes circulants, les cellules mésenchymateuses vont produire de manière autocrine et paracrine des facteurs de croissance et de différenciation qui permettent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Lorsque les cellules épithéliales sont différenciées, elles expriment fortement AR. Les cellules répondent à leur tour aux androgènes et sécrètent des facteurs à effet autocrines et paracrines permettant la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules de muscle lisse. Au cours du développement d'autres récepteurs stéroïdiens, tels que ERα dans le mésenchyme à des stades précoces, ou ERβ dans les cellules épithéliales luminales sont exprimés (après la différenciation).

(D'après (Prins & Putz, 2008)

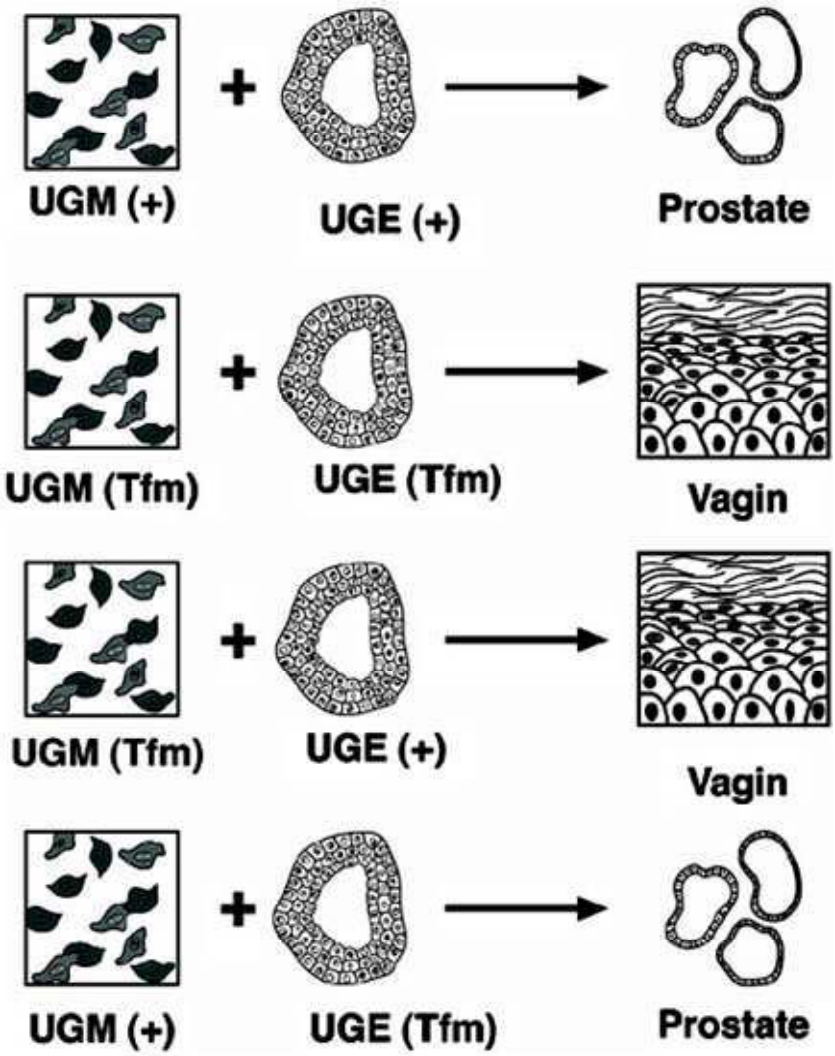
interaction avec le récepteur AR, récepteur nucléaire de la superfamille des facteurs de transcription (Liao & Fang, 1969). Des souris invalidées pour AR ou des hommes présentant un dysfonctionnement complet du récepteur des androgènes n'ont pas de prostate (Bardin *et al.*, 1973; Brown, 1995). Le récepteur des androgènes est fortement exprimé dans l'UGS mésenchymateux (UGM : UroGenital sinus Mesenchyme) avant et pendant la morphogenèse prostatique alors que son expression dans la partie épithéliale est induite qu'après le début des étapes de bourgeonnement et de morphogenèse **(figure 3)** (Husmann *et al.*, 1991; Shannon & Cunha, 1983). Le développement correct de la prostate nécessite donc à la fois le récepteur des androgènes et les androgènes **(figure 4)**.

- ✓ Les oestrogènes

Le fœtus est en contact permanent avec les œstrogènes d'origine maternelle. Ces derniers agissent par interaction avec le récepteur aux œstrogènes ER (ERα et β) présent au niveau de la glande prostatique, ce qui suggère un rôle des œstrogènes dans le développement de la prostate **(figure 4)** (Prins *et al.*, 2006). En revanche, à l'inverse des androgènes, ils ne semblent pas être indispensables au développement prostatique étant donné qu'une invalidation de ERα dans des souris n'altère pas la morphogenèse prostatique (Eddy *et al.*, 1996). Le rôle des œstrogènes pendant le développement prostatique n'est pas clair, mais des études ont montré qu'ils réguleraient la multiplication des cellules mésenchymateuses et inhiberaient la différenciation des cellules épithéliales. En effet, une surexpression oestrogénique pendant le développement prostatique au cours de la vie fœtale entraine à terme des hyperplasies bénignes de la prostate et des carcinomes prostatiques (Prins *et al.*, 2006; Prins & Korach, 2008).

3. *Rôle des interactions épithélium-mésenchyme dans le développement de la prostate et la réponse aux androgènes*

Comme beaucoup d'autres tissus, la formation de la prostate se trouve être initialement la conséquence d'interactions entre le tissu épithélial et le tissu mésenchymateux. Le rôle exercé respectivement par le mésenchyme et l'épithélium, ainsi que l'importance de leur interaction, ont été mis en évidence par des études de recombinaison de tissus par Cunha et ses collaborateurs (Cunha, 1996; Cunha *et al.*, 1987; Hayward *et al.*, 1997). Ces études utilisent la dissection et l'isolement enzymatique de l'épithélium et du mésenchyme à partir des sinus urogénitaux d'embryons, qui sont ensuite recombinés *in vitro* et réimplantés sous la capsule rénale de souris *nude* mâles adultes. La formation de tissu prostatique fonctionnel issu de ces recombinaisons est ensuite vérifiée en histologie et par l'analyse des protéines prostatiques sécrétées. Ces études montrent que les deux composantes mésenchymateuse et épithéliale sont indispensables pour la



<u>Figure 5</u> : Contribution du mésenchyme et de l'épithélium dans le développement de la prostate

Expériences de combinaisons de mésenchyme du sinus urogénital (UGM) et d'épithélium (UGE) provenant soit d'embryons de souris sauvages (+) ou déficients pour le récepteur des androgènes (*Tfm* : Testicular feminized mouse), greffées chez des souris mâles adultes.

En réponse aux androgènes, la combinaison UGM+/UGE+ conduit à la formation d'une prostate fonctionnelle. Les combinaisons impliquant un tissu mésenchymateux *Tfm* (UGM *Tfm*/UGE *Tfm* et UGM *Tfm*/UGE+) conduisent au développement d'un tissu de type vaginal. Enfin, la combinaison UGM+/UGE *Tfm* permet le développement morphologique de tissu prostatique avec formation de canaux de prolifération des cellules épithéliales et cytodifférenciation des cellules luminales. En revanche, il n'y a pas production de marqueurs prostatiques en raison de l'absence d'un récepteur des androgènes fonctionnel au niveau de l'épithélium *Tfm*.

(D'après (Cunha *et al.*, 2004)

différenciation prostatique. La spécificité du mésenchyme est stricte puisque le tissu prostatique ne peut être formé que si le mésenchyme est originaire du sinus urogénital, alors que la spécificité de l'épithélium est plus large. En effet un épithélium d'origine endodermique, même du tissu adulte mâle ou femelle différencié, suffit à la formation du tissu prostatique à condition qu'il soit combiné au mésenchyme urogénital. Des expériences de combinaisons de mésenchyme (UGM) et d'épithélium (UGE : UroGenital sinus Epithelium) issus d'embryons de souris normaux (WT) ou déficients pour le récepteur des androgènes (*Tfm* : Testicular feminized mouse), montrent également l'importance du mésenchyme dans la réponse morphologique et fonctionnelle de l'épithélium aux androgènes (Cunha *et al.*, 1987). Ces analyses montrent que la recombinaison entre un mésenchyme *Tfm* et un épithélium d'un embryon sauvage ne permet pas le développement prostatique malgré la présence d'androgènes. En revanche la recombinaison réciproque (Mésenchyme sauvage avec un épithélium *Tfm*) conduit au développement prostatique normal **(figure 5)**. Pendant le développement, AR est uniquement présent dans l'UGM embryonnaire avant et pendant la formation des bourgeons mésenchymateux, alors qu'il n'est pas détecté dans les bourgeons épithéliaux en développement. Ces données suggèrent que la signalisation androgénique est requise au niveau du mésenchyme pour une initiation et un développement normal de la prostate. Les androgènes permettent la production de signaux induisant le développement et la croissance de la prostate et plus tardivement la fonction sécrétrice des cellules différenciées (Abate-Shen & Shen, 2000; Cooke *et al.*, 1991; Takeda & Chang, 1991). Ces analyses mettent également en évidence l'importance d'effets paracrines dans l'effet androgénique des cellules mésenchymateuses sur le développement de l'épithélium prostatique. D'autres expériences de recombinaisons de tissus *Tfm* et sauvages révèlent que AR est important au niveau épithélial, dans les stades différenciés, pour l'expression de protéines prostatique sécrétées sous la dépendance des androgènes qui confèrent à l'organe sa fonction propre (Donjacour & Cunha, 1993). Bien que le mésenchyme urogénital induise la différenciation de l'épithélium prostatique, la réciproque est également vraie : l'épithélium prostatique induit la différenciation de l'UGM en muscle lisse (Cunha *et al.*, 1992). Le développement de la prostate est donc dépendant d'interactions croisées entre le mésenchyme et l'épithélium qui le compose. Le mesenchyme permet à l'épithélium d'acquérir son identité et régule également sa prolifération et sa différenciation. L'épithélium permet, quant à lui, la différenciation du mésenchyme en muscle lisse (Marker *et al.*, 2003). Les relations entre l'épithélium et le stroma qui s'exercent par l'intermédiaire de sécrétions paracrines de molécules comme les facteurs de croissances, sous le contrôle des androgènes, sont également essentielles au maintien de l'homéostasie prostatique normale adulte (Russell *et al.*, 1998).

2) Physiopathologie de la prostate : le cancer de la prostate

a. Généralités sur les pathologies prostatiques

Chez l'homme, la prostate peut être le siège de différentes pathologies comme la prostatite, l'hyperplasie bénigne de la prostate et le cancer.

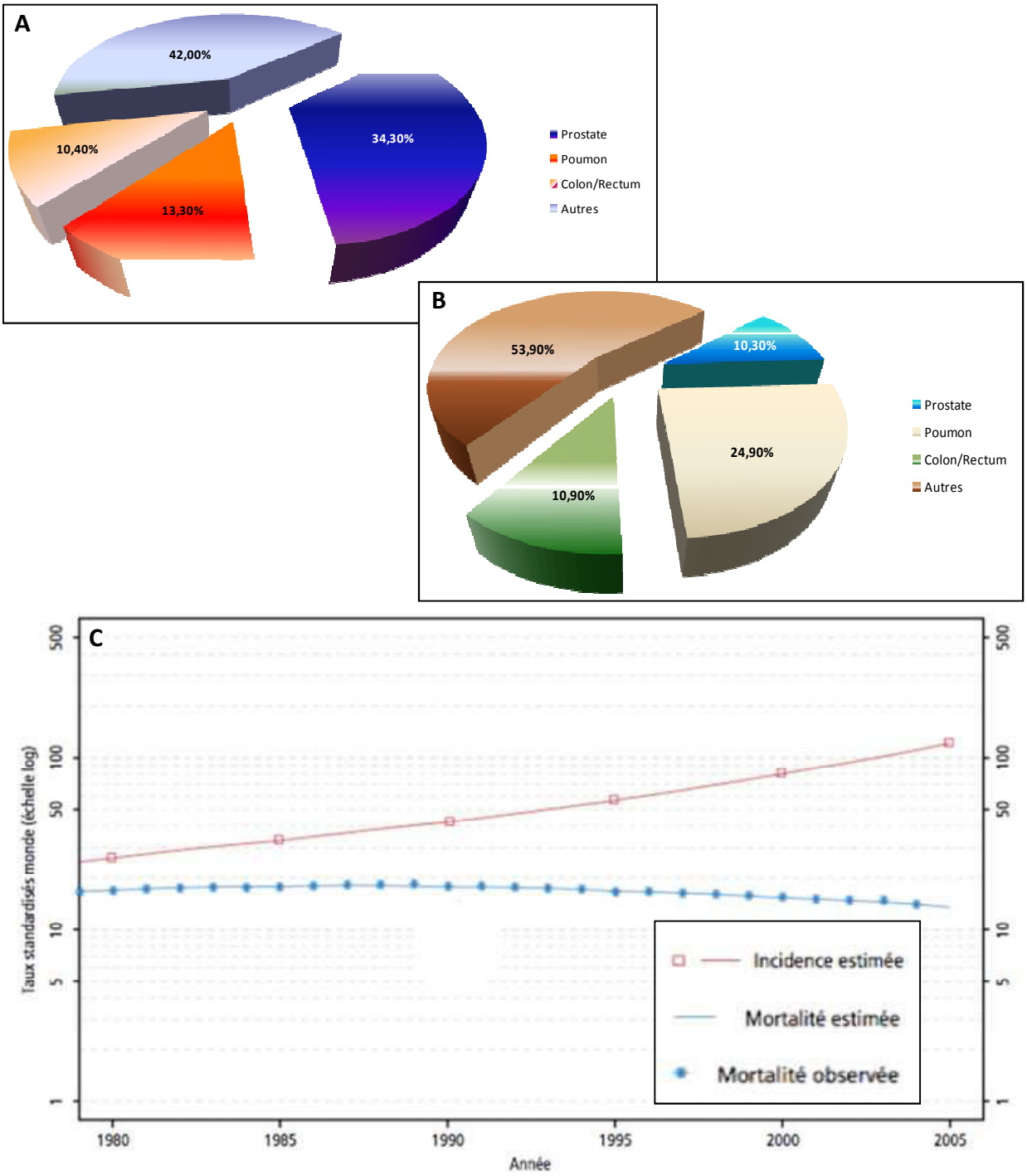
1. Les prostatites

Les prostatites sont la conséquence d'une inflammation de la prostate qui à la différence des autres pathologies de la prostate, touchent préférentiellement l'homme jeune. Elles sont fréquentes avec 1 homme sur 10 qui sera confronté à une prostatite au cours de sa vie. On distingue plusieurs types de prostatites : aigue, chronique non bactérienne et chronique infectieuse.

La prostatite aigue : La prostatite aigue est une inflammation de la glande prostatique d'origine microbienne. Elle se traduit par de fortes fièvres, des douleurs sévères (mictions difficiles et douloureuses) et une grande fatigue. Dans la majorité des cas, elle nécessitera une hospitalisation.

La prostatite chronique non bactérienne : Il s'agit d'une forme de prostatite chronique caractérisée par une absence d'infection. Les causes sont différentes d'une prostatite bactérienne, puisqu'elles peuvent être dues à une malformation de l'appareil uro-génitale ou à un mauvais fonctionnement des muscles du plancher pelvien. L'étiologie des prostatites chroniques non bactériennes reste mal connue et fait l'objet d'une controverse dans le monde des urologues.

La prostatite chronique infectieuse : Elle est caractérisée par une infection de la prostate qui peut résulter d'une infection urinaire « classique » mal soignée. Les germes responsables de cette infection sont au sein de la prostate et donc très difficiles à identifier et à traiter, d'autant que la prostate est très peu perméable aux antibiotiques



<u>Figure 6</u> : Répartition des cancers les plus fréquents chez l'homme

A : Incidence des cancers chez l'homme, en France, en 2011. Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent devant le cancer du poumon (source : Institut National du Cancer, 2011).

B : Taux de mortalité des cancers les plus fréquents chez l'homme, en France, en 2011 (source : Institut National du Cancer, 2011).

C : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate au cours de la période 1980-2005 (source : Francim-InVS 2008).

2. L'hyperplasie bénigne de la prostate

L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP ou adénome de la prostate) est la conséquence d'une hypertrophie progressive des structures glandulaires constituant la prostate, particulièrement dans la partie entourant l'urètre. Cette hypertrophie survient avec l'âge (à partir de 50 ans) et entraine souvent des troubles urinaires. L'augmentation de la taille de la prostate se fait lentement : elle est d'abord microscopique, puis détectable par échographie. Il peut se passer des années avant la manifestation de symptômes très gênants. En France, l'HBP est présente chez près de 80% des hommes de plus de 80 ans. Après l'échec d'un traitement médical (α bloquants ou inhibiteur de la 5α-réductase), il faut envisager une intervention chirurgicale (en moyenne chez 1 homme sur 10) (source : urofrance.org).

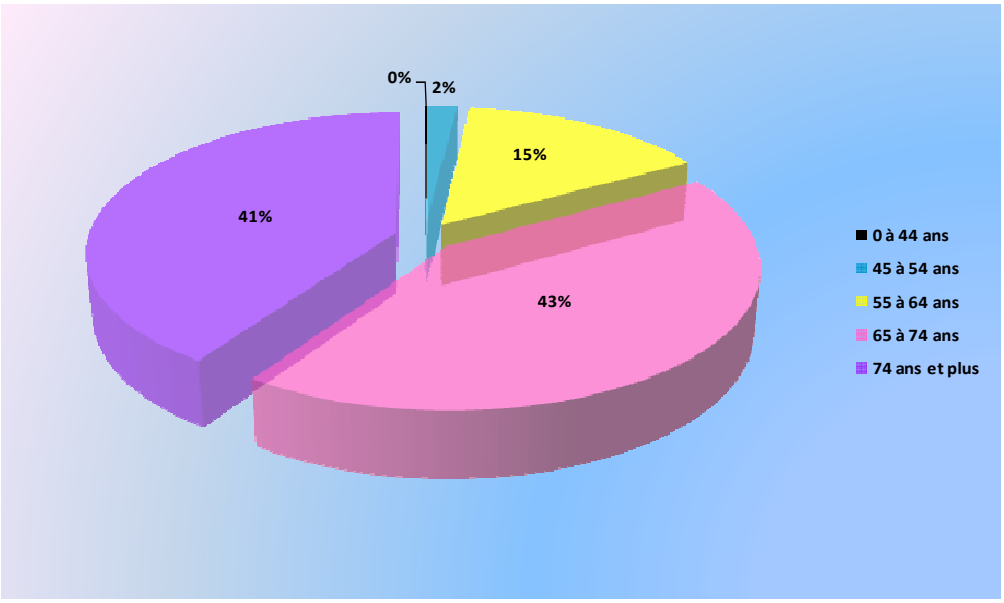
b. Epidémiologie et facteurs de risques de cancer de la prostate

Avec plus de 71000 nouveaux cas estimés en France en 2011, le cancer de la prostate se situe au premier rang des cancers incidents chez l'homme nettement devant le cancer du poumon et le cancer colorectal (source : Institut National du Cancer, 2011) **(figure 6A)**. Avec un taux de mortalité de 10.3% il se situe au troisième rang, ce qui représente 8700 décès par cancer de la prostate en France en 2011 (source : Institut National du Cancer, 2011) **(figure 6B)**. Cependant il est important de noter que malgré une augmentation de l'incidence des cancers de la prostate en France entre 1980 et 2005, le taux de mortalité à tendance à diminuer (source : Francim-InVS 2008) **(figure 6C)**. Cela s'explique par un nombre plus important de diagnostics à partir de 50 ans et par le fait que tous les cancers diagnostiqués ne vont pas systématiquement évoluer vers une pathologie grave et mortelle.

Les causes et facteurs de risque du cancer de la prostate sont nombreux, parmi lesquels les plus cités étant l'âge, l'appartenance ethnique, les antécédents familiaux et le statut hormonal.

1. L'âge

L'âge est le facteur de risque le plus important de cancer de la prostate. Il apparaît rarement avant 50 ans et son incidence augmente avec l'âge **(figure 7)**. En effet l'âge moyen au diagnostic est de 71 ans en 2005 et l'âge médian de décès sur la période 2004-2008 est de 80 ans. Des analyses



<u>Figure 7</u> : Prévalence des cancers de la prostate chez l'homme en France

Prévalence à 5 ans des cancers de la prostate chez l'homme, en France, en 2002, selon la tranche d'âge. L'âge moyen du cancer de la prostate se situe dans la fouchette 65-75 ans.

(D'après (Colonna *et al.*, 2008)

d'autopsies révèlent qu'une majorité d'hommes de plus de 85 ans auraient un cancer de la prostate (Sakr *et al.*, 1993). De manière surprenante, et sans réelle explication, il a clairement été montré qu'une diminution du taux d'androgènes au cours du vieillissement chez l'homme, est concomitante avec une augmentation de la croissance des tumeurs prostatiques (Algarte-Genin *et al.*, 2004; Raynaud, 2006). Cette diminution pourrait, en partie, expliquer l'influence de l'âge sur l'incidence du cancer de la prostate. De plus ces observations entrainent des interrogations sur l'utilisation actuelle d'anti-androgènes dans le traitement des cancers. L'influence de l'âge peut également s'expliquer par une augmentation des cassures de l'ADN causées par le stress oxydant qui prédispose à l'apparition de mutations (Bostwick *et al.*, 2004).

2. L'appartenance ethnique

Le risque de cancer de la prostate peut être différent selon l'appartenance ethnique des individus. Le taux d'incidence le plus élevé dans le monde se situe chez les hommes Afro-Américains, qui ont un risque de cancer de la prostate supérieur à celui des Blanc-Américains malgré un mode de vie et d'alimentation similaire (source : Haute Autorité de Santé, Février 2012) (Bostwick *et al.*, 2004). En revanche, le risque de cancer est plus faible chez les hommes d'origine asiatiques (source : Haute Autorité de Santé, Février 2012). Ces données sont le reflet de différences génétiques sans pour autant exclure les différences d'ordre socio-économique qui existent entre les populations.

3. Les antécédents familiaux

Les formes familiales de cancer de la prostate sont observées dans 20% des cas et l'existence d'une transmission héréditaire est retrouvée dans 5% des cas. Le facteur génétique ne représente donc pas la totalité des cas de cancers, mais la proportion de ceux qui surviennent à un jeune âge : 43% des cancers diagnostiqués pour cause génétique le sont à l'âge de 55 ans. Il existe deux niveaux de déterminisme génétique, l'un associé à la phase d'initiation du cancer et le second à la phase de promotion des cancers de la prostate (Cussenot & Fournier, 2000). Des études réalisées en 1996 suggèrent que la région 1q24-25 du chromosome 1 comporte un gène important dans la prédisposition au cancer de la prostate : HPC1 (Hereditary Prostate Cancer1) (Xu, 2000). Un autre locus du même chromosome contient également des gènes de prédisposition au cancer regroupés dans le locus PcaP (Predisposing for prostate cancer (Berthon *et al.*, 1998; Cancel-Tassin *et al.*, 2001). Depuis ces dernières années, d'autres loci pour des gènes de prédisposition aux formes héréditaires de cancer de la prostate ont été identifiés (HPCX, HPC2, PG1 (Prostate cancer susceptibility Gene 1),

ainsi que des loci associés à des formes familiales agressives de la maladie. Ces données soulignent l'hétérogénéité génétique de la prédisposition au cancer de la prostate dans sa forme héréditaire (Cancel-Tassin *et al.*, 2001; Cussenot & Cancel-Tassin, 2004).

4. L'alimentation

Les relations entre le cancer de la prostate et les facteurs environnementaux et plus spécifiquement l'alimentation ont été beaucoup étudiées et révèlent que celle-ci peut être un facteur de risque important dans le cancer de la prostate. Notamment, la consommation de graisses entraine une augmentation de l'incidence du cancer de la prostate et de la mortalité. En effet, les graisses peuvent entraîner des altérations des profils hormonaux ou encore une augmentation du stress oxydant (Bostwick *et al.*, 2004). Des études de variations géographiques et de migration des populations ont également mis en évidence l'importance de l'alimentation et de l'imprégnation environnementale. L'incidence des cancers de la prostate augmente de manière significative chez les hommes asiatiques immigrants dans diverses régions Américaines (Schultz *et al.*, 2011). Cela implique la transition entre une alimentation faible en graisses et riche en phyto-œstrogènes (fruits et légumes, soja) ayant un rôle protecteur contre le cancer de la prostate, et une alimentation riche en graisses (Damber & Aus, 2008). La vitamine A, régulateur de la différenciation des cellules épithéliales et de la prolifération, est aussi associée à un risque de cancer de la prostate. La vitamine D contient une substance montrée pour inhiber l'invasion, la prolifération et la différenciation, un manque de vitamine D constitue donc un risque de cancer de la prostate. Il a également été montré un rôle protecteur de la vitamine E par ses propriétés anti-oxydantes et d'inhibition de la croissance cellulaire : le risque de cancer est alors diminué de 32% (Bostwick *et al.*, 2004). D'autres facteurs nutritionnels ont des effets protecteurs vis-à-vis du cancer de la prostate comme le zinc, le selenium (inhibiteurs de carcinogènes) ou le lycopène (anti-oxydants) (Bostwick *et al.*, 2004). Cependant les relations, parfois incertaines, entre ces composés et le risque de cancer de la prostate sont le résultat d'études épidémiologiques. Il semble donc necessaire de comprendre les mécanismes mis en jeu par l'utilisation de modèles cellulaires ou animaux.

5. Le statut hormonal

Il est clairement établi que le développement du cancer de la prostate et sa progression vers une phase d'échappement hormonal sont le résultat d'évènements multiples. Il semble néanmoins que les androgènes jouent un rôle primordial dans tous les stades de la carcinogénèse prostatique (Abate-Shen & Shen, 2000; Dai *et al.*, 1981; Prehn, 1999). Des concentrations élevées de

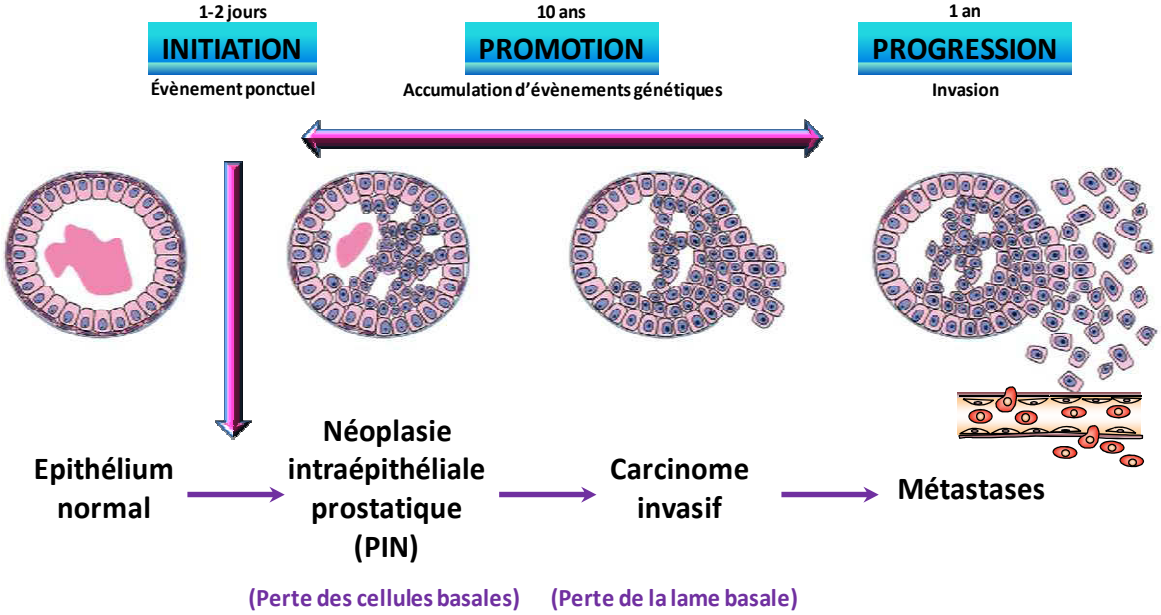


Figure 8 : Stades d'évolution du cancer de la prostate

La carcinogénèse prostatique est un processus multi-étapes caractérisé par une phase d'initiation très courte, une phase de promotion longue, de une à quelques dizaines d'années, et une phase de progression d'une durée moyenne de 1 an. Les cellules épithéliales prolifèrent de manière incontrôlée à l'intérieur du compartiment luminal et entraînent l'apparition d'une néoplasie intraépithéliale (PIN). Après la perte de la lame basale, les cellules épithéliales en prolifération envahissent le compartiment stromal, ce qui entraîne la formation d'un carcinome *in situ*. Ces étapes font suite à l'accumulation d'évènements génétiques, entraînant des modifications d'expression de protéines régulatrices. Enfin, les cellules cancéreuses peuvent évoluer vers des stades plus agressifs où elles vont passer dans la circulation sanguine pour former des tumeurs secondaires dans d'autres tissus.

(D'après (Abate-Shen & Shen, 2000)

testostérone et de son métabolite, la DHT, sont corélées avec le risque de cancer de la prostate (Bostwick *et al.*, 2004). Cependant, plusieurs résultats d'analyses épidémiologiques révèlent un rôle controversé des androgènes dans la croissance des tumeurs de la prostate: les taux de testostérone sérique chez des hommes atteints de cancer peuvent être à la fois plus élevés, plus faibles ou équivalents à ceux d'hommes sains (Bostwick *et al.*, 2004). Et de manière paradoxale, comme déjà décrit, les taux de testostérone diminuent chez des hommes à l'âge correspondant au pic d'incidence du cancer. Les recherches de corrélations entre le risque de cancer de la prostate et les taux sériques de testostérone suggèrent que le dosage de cette hormone ne permet pas d'évaluer le risque de manière précise.

Des perturbateurs endocriniens ayant des effets oestrogéniques et anti-androgéniques ont également été associés à une augmentation des risques de développer un cancer de la prostate (Prins *et al.*, 2007).

c. La carcinogénèse prostatique

Les cancers de la prostate sont issus de la zone périphérique de la glande et conservent une structure glandulaire. Une faible proportion d'entre eux est d'origine mésenchymateuse alors que la majorité est d'origine épithéliale. Parmi eux, les plus fréquents sont les adénocarcinomes, les autres correspondant à des tumeurs neuroendocrines. La formation et l'évolution de ces adénocarcinomes se déroulent en plusieurs étapes et sont le résultat d'une succession d'altérations génétiques (pertes de chromosomes et mutations), de modifications des interactions épithélium-mésenchyme et d'activation de voies de signalisation, notamment celles qui impliquent les facteurs de croissance. Le stade d'initiation, d'une durée très courte (1-2 jours), correspond à un évènement ponctuel qui ne modifie pas le phénotype des cellules épithéliales. Suit la phase de promotion, plus longue (10 ans environ) qui correspond à une accumulation d'évènements génétiques. Il y aura alors expansion des cellules initiées et formation de néoplasies intraépithéliales, puis de carcinomes localisés. Le dernier stade est celui de progression qui dure environ un an et qui correspond à une invasion locale puis souvent métastatique des cellules qui ont acquis une indépendance vis-à-vis de l'environnement **(figure 8)**.

1. Stades d'évolutions de la maladie

✓ Les néoplasies intraépithéliales

De nombreuses études histopathologiques du tissu cancéreux suggèrent que les précurseurs des adénocarcinomes sont les néoplasies intraépithéliales prostatiques ou PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) (Abate-Shen & Shen, 2000; Joniau *et al.*, 2005). Les PIN sont histologiquement classées en PIN de bas grade et en PIN de haut grade qui seraient un stade de transition entre les PIN de bas grade et le carcinome invasif prostatique. Des études de biopsies argumentent le statut de précurseur des PIN : (i) le stade de PIN de haut grade précède de 10 ans celui de carcinome, en accord avec l'idée d'une progression vers le cancer (Sakr *et al.*, 1993), (ii) les PIN et les carcinomes sont tout deux multifocaux et présents préférentiellement dans la zone périphérique (Joniau *et al.*, 2005), (iii) les caractéristiques architecturales et cytologiques des PIN ressemblent à celles d'un carcinome invasif (rupture de la lame basale) (Bostwick *et al.*, 1993) et peuvent être distinguées d'autres anormalités histopathologiques de l'épithélium prostatique comme l'hypertrophie bénigne de la prostate (Abate-Shen & Shen, 2000). Les PIN sont caractérisées par un épaississement de la couche épithéliale ainsi que la perte des cellules basales avec la conservation de la membrane basale. Les cellules forment des couches superposées, non à cause d'une augmentation de la prolifération, mais à cause d'un taux d'apoptose des cellules anormalement faible **(figure 8)**.

✓ Le carcinome et les métastases

Le stade suivant, de carcinome invasif, est caractérisé par la perte complète de la lame basale. Les cellules épithéliales basales et luminales ont alors une activité prolifératives importante ce qui se traduit par une forte augmentation des taux de PSA. Le cancer de la prostate peut rester localisé ou évoluer vers un stade plus agressif, celui de métastases dans les ganglions lymphatiques proches, les organes distaux et plus fréquemment au niveau des os, du foie et des poumons (Schulz *et al.*, 2003). Ce processus met en jeu des modifications d'expression de marqueurs d'adhésion (E-cadhérine et N-cadhérine) qui permettent aux cellules cancéreuses d'acquérir des caractéristiques mésenchymateuses. Il s'agit de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) **(figure 8)**.

2. Facteurs impliqués dans l'initiation

La désorganisation de la lame basale et la mise en place des PIN constituent des mécanismes importants dans l'initiation du cancer de la prostate. Un deuxième évènement simultané important dans les premiers stades est la perte spécifique de la région chromosomique 8p, retrouvée dans 80% des tumeurs prostatiques, mais aussi dans des carcinomes colorectaux et du poumon (Chang *et al.*, 1994; Fujiwara *et al.*, 1994). Plus spécifiquement, la perte de la région 8p21 est un évènement des

premiers stades de la carcinogénèse prostatique (PIN et carcinome invasif « jeune »). Cette région contient le gène homéotique Nkx3.1 (Voeller *et al.*, 1997). Il s'agit d'un facteur de transcription qui a un rôle suppresseur de tumeur puisqu'il régule négativement la croissance des cellules épithéliales du tissu prostatique. Des études suggèrent également un rôle de Nkx3.1 dans la différenciation de la prostate saine, puisque sa délétion entraine des anomalies de morphogenèse des canaux prostatiques et des fonctions sécrétrices (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999). De plus, ces souris développent des PIN ressemblant au PIN retrouvées chez l'homme (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999). Nkx3.1 semble donc être un gène de régulation important impliqué dans l'initiation du cancer de la prostate.

3. *Facteurs impliqués dans les phases de promotion et de progression*

De manière similaire à ce qui a été décrit pour la phase d'initiation, la mise en place et l'évolution des phases de promotion et de progression du cancer de la prostate résultent de plusieurs facteurs : des pertes de régions chromosomiques, des modifications d'expressions de protéines impliquées dans des processus clés et des modifications de l'environnement tumoral.

✓ PTEN

La perte d'une région du chromosome 10q est retrouvée dans 50 à 80% des cancers de la prostate et notamment la région 10q23 contenant le gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog). Cette délétion est également retrouvée dans d'autres carcinomes comme les glioblastomes, les cancers du sein et de l'endomètre (Di Cristofano & Pandolfi, 2000). Des mutations « perte de fonction » de PTEN entraîne une activation de la kinase PI3K (PhosphoInositide 3-OH Kinase) puis de la kinase AKT (Protein Kinase B) qui, en retour, conduit à une perte de la sensibilité des cellules à l'apoptose et une augmentation de leur survie (Sun *et al.*, 1999). L'impact de l'invalidation de PTEN peut être apprécié par l'étude de modèles de souris transgéniques. La perte totale du gène entraine une létalité embryonnaire et les souris hétérozygotes PTEN +/- développent des hyperplasies et des carcinomes dans de nombreux tissus (Di Cristofano *et al.*, 1998). De plus, la perte de l'expression de PTEN favorise la mobilité cellulaire et le potentiel invasif des cellules tumorales (Liliental *et al.*, 2000) et pourrait donc être directement associée à la dissémination métastatique dans les stades plus avancés de cancers. En ce sens, la perte de PTEN est un évènement clé dans les phases avancées de la carcinogenèse prostatique. Il faut également noter que cette perte chromosomique PTEN est souvent associée à une fusion TMPRSS2/ERG (Transmembrane Protease Serine 2/Ets Related Gene). Cependant, le rôle de ce transcrit chimérique

ne sera pas détaillé car il n'existe pas de corrélation entre la fusion TMPRSS2/ERG et les scores de Gleason, bien que cette fusion soit retrouvée dans 50% des cas de cancers de la prostate (Yoshimoto *et al.*, 2012).

✓ Rb

Une autre altération chromosomique importante dans la phase de progression est la perte de la région 13q, retrouvée dans 50% des tumeurs prostatiques et qui contient le gène Rétinoblastome (Rb), (Cooney *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998; Melamed *et al.*, 1997). Rb est un suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation de l'apoptose des cellules prostatiques, et plus particulièrement en réponse aux androgènes (Zhao *et al.*, 1997). Des études rapportent la perte d'au moins un des deux allèles Rb dans 27% des adénocarcinomes prostatiques (Brooks *et al.*, 1995). L'invalidation totale de Rb (Rb -/-) dans des modèles de souris entraîne la létalité des embryons à 13 jours de gestation (Clarke *et al.*, 1992). De plus, des approches de combinaison de tissus montrent que la perte homozygote du gène entraîne des dysplasies et des carcinomes invasifs (Wang *et al.*, 2000). La délétion de la région chromosomique contenant Rb est donc un évènement important dans la phase de progression des tumeurs prostatiques.

✓ p53

La perte de la région chromosomique 17p se produisant dans les stades avancés de cancer de la prostate et dans les métastases (Cher *et al.*, 1994), induit la perte du locus p53 (Brooks *et al.*, 1996). p53 est un suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la stabilité du génome. Etant donné ses fonctions, il est assimilé à « un gardien du génome ». De manière intéressante, une inactivation conditionnelle de p53, dans des modèles murins, n'entraîne pas de néoplasies (Chen *et al.*, 2005) alors que la combinaison de la perte de p53 à celle de Rb entraîne des carcinomes métastatiques (Zhou *et al.*, 2006). Des mutations de p53, cependant très rares (Kleihues *et al.*, 1997), sont également retrouvées dans des stades avancés de cancer de la prostate ainsi que des stades métastatiques (Baylot *et al.*, 2012; Bookstein *et al.*, 1993). Des études cliniques montrent que p53, sous une forme mutée, est surexprimé chez une faible proportion de patients atteints de cancer de la prostate. Cette surexpression est associée à un pronostique péjoratif, en terme de progression et de survie, en particulier lorsqu'elle est associée à la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (B-cell lymphoma 2) (Thomas *et al.*, 1993). Des modifications d'expression de p53 à cause de délétions chromosomiques ou de mutations semblent être importantes dans un contexte où de nombreuses altérations ont déjà eu lieu.

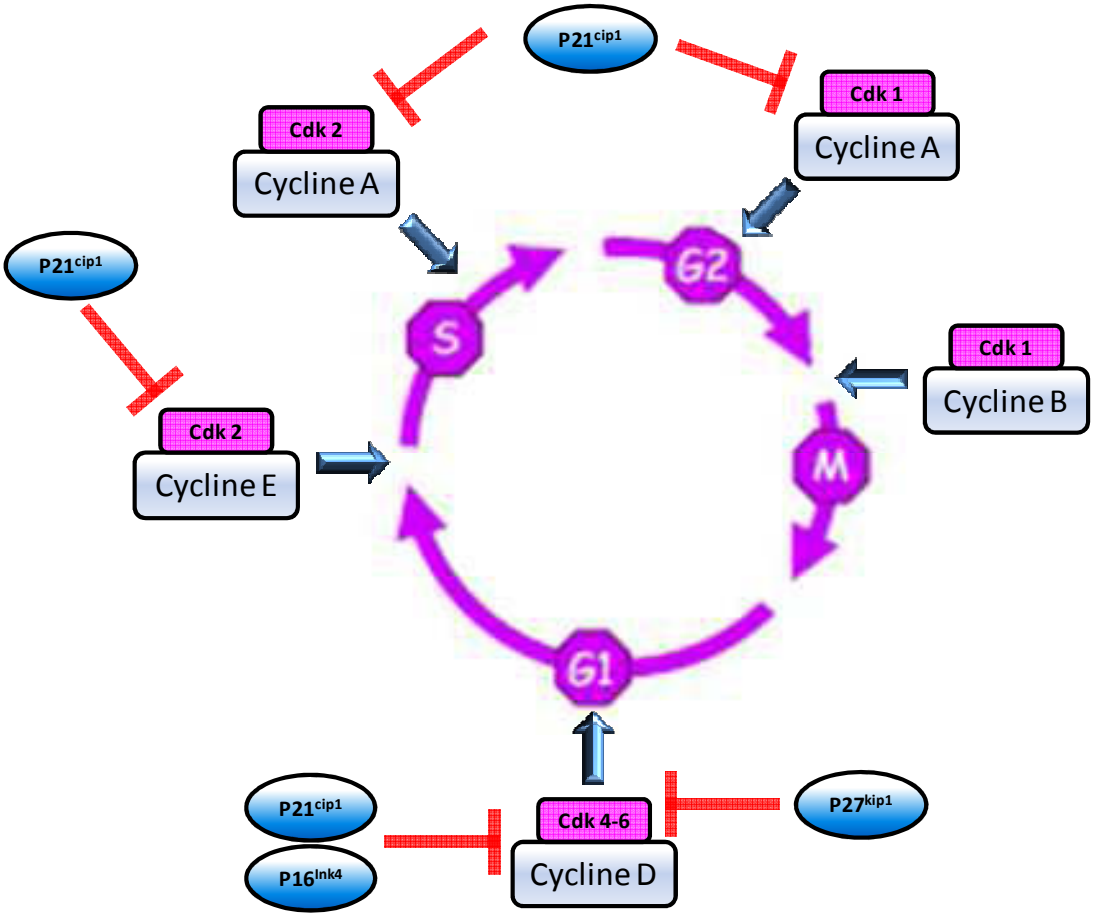


Figure 9: Régulation de la progression du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire est permise par la formation des complexes Cyclines/Cdk (Cyclin-dependent kinase). L'activité de ces complexes est régulée par des protéines inhibitrices, Cdki (Cyclin-dependent kinase inhibitor). Dans la prostate saine, la régulation de l'expression des inhibiteurs de Cdk est importante pour le maintien de la balance prolifération/apoptose et la dérégulation de leurs expressions représente un évènement important dans la progression des cancers de la prostate.

✓ Gènes de régulation du cycle cellulaire

Dans l'épithélium prostatique normal, le faible taux de prolifération cellulaire est contrebalancé par un faible taux d'apoptose (Berges *et al.*, 1995), contrairement à la néoplasie intraépithéliale et au carcinome dans lesquels la prolifération est augmentée de 7 à 10 fois et l'apoptose diminuée de 60%. Ceci est le résultat de modifications d'expression et/ou d'activité de gènes régulant le cycle cellulaire. Des études identifient notamment la perte de fonction de l'inhibiteur de Cdk4 (Cyclin-dependent kinase 4), $p27^{kip1}$, dans environ 50% des cancers de la postate (Macri & Loda, 1998-1999). Son expression diminue quand le grade de la tumeur augmente (Tsihlias *et al.*, 1998). $P16^{Ink4A}$, un autre régulateur du cycle cellulaire, est un suppresseur de tumeur impliqué dans l'inhibition du complexe CyclineD/Cdk6. La perte de son expression, inversement corrélée à l'expression de Rb, empêche la sénescence des cellules épithéliales de prostate (Otterson *et al.*, 1994). La surexpression de la cycline D1 (Gumbiner *et al.*, 1999) et des mutations de $p21^{cip1}$ (Gao *et al.*, 1995), inhibiteur de Cdk2/1 et régulateur négatif de la progression de la phase G1, ont également été associées à la carcinogenèse prostatique. Des modifications d'expression de régulateurs du cycle cellulaire représentent des évenements importants dans la phase de progression des tumeurs prostatiques **(figure 9)**.

✓ Gènes de régulation de l'apoptose

Dans la prostate saine, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est restreinte aux cellules basales (Hockenbery *et al.*, 1991) et sa surexpression dans les carcinomes prostatiques est caractéristique de stades avancés résistants à l'apoptose (Colombel *et al.*, 1993). L'induction de sa surexpression dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate protège de l'apoptose induite par une déplétion en androgène (Raffo *et al.*, 1995) et confère une résistance à la chimiothérapie (Tu *et al.*, 1995). Bcl-2, dont l'expression est corrélée au devenir de la maladie, peut alors être assimilé à un marqueur pronostic (Bubendorf *et al.*, 1996). L'association de modifications d'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, à celles mise en place dans des stades plus précoces de la carcinogenèse prostatique est importante dans les phases de promotion et de progression.

✓ Le récepteur des androgènes

Comme nous l'avons décrit précédemment, les androgènes sont essentiels au maintien de la physiologie prostatique mais sont également nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules tumorales. Le récepteur des androgènes agit comme un facteur de transcription et permet l'expression de gènes intervenant dans la progression du cancer de la prostate (Suzuki *et al.*, 2003). Il est notamment impliqué dans l'expression d'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), de c-Myc et de la cavéoline-1, protéines qui favorisent la survie, la prolifération et l'invasion cellulaire (Bernard *et al.*, 2003a; Li *et al.*, 2001; Torring *et al.*, 2003). Par ailleurs, les androgènes régulent négativement

l'accumulation de céramides, spingolipides impliqués dans la prolifération et l'apoptose cellulaire, ce qui entraîne une inhibition de l'apoptose des cellules tumorales. L'accumulation de la céramide C16, en absence d'androgènes, provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, suivi d'une entrée des cellules en apoptose (Eto *et al.*, 2003). L'importance de AR et des androgènes est également illustrée dans les thérapies. En effet, l'ablation des androgènes, traitement de première ligne des cancers de la prostate, conduit à une régression tumorale (Huggins & Hodges, 1941). Comme il a déjà été mentionné, le récepteur des androgènes est souvent surexprimé dans les premiers stades de la carcinogenèse prostatique. En ce sens, les souris transgéniques dans lesquelles l'expression de AR est augmentée développent des néoplasies intraépithéliales suggérant l'établissement d'une tumeur prostatique. Ces modifications d'expression peuvent être la conséquence d'une amplification du gène AR retrouvée dans 30% des carcinomes prostatiques. Le récepteur des androgènes peut également être impliqué dans les phases d'échappement thérapeutique comme il sera détaillé dans la partie « traitements » de ce chapitre.

- ✓ Les interactions épithélium-mésenchyme

Comme il a déjà été mentionné, les interactions entre l'épithélium prostatique et les composants du stroma sont essentielles aux différents stades de développement et de croissance de la prostate normale. Des altérations au niveau de ces interactions ont donc un rôle primordial dans la carcinogenèse prostatique. Des expériences de recombinaisons de tissus suggèrent qu'une signalisation aberrante de facteurs de croissance, d'origine stromale et épithéliale, est mise en place au cours de la phase de progression (Hayward *et al.*, 1997). Parmi les signaux identifiés, on trouve le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor) ainsi que des membres de la famille TGFβ (Transforming Growth Factor β) (Cunha, 1996; Djakiew, 2000). Leurs fonctions seront détaillées dans le chapitre 2 (page 56).

d. Classification histologique des tumeurs prostatiques

Le choix et l'ordre des traitements d'un cancer de la prostate dépendent notamment de l'étendue du cancer au moment du diagnostic et de son évolution potentielle. La gradation histologique joue donc un rôle important dans leur prise en charge. Les cancers de la prostate sont classés en plusieurs types en fonction de leurs origines et de leurs aspects morphologiques : (i) les adénocarcinomes acineux, (ii) les adénocarcinomes canalaires, les carcinomes urothéliaux et squameux , les carcinomes à cellules basales, les tumeurs neuroendocrines, (iii) et les tumeurs

Site de la tumeur primitive (T)		Caractéristiques
T1 = Stade dont la découverte est uniquement histologique (non visible à l'imagerie et non palpable)	T1a	Moins de 5% de cellules cancéreuses sur les prélèvements
	T1b	Plus de 5% de cellules cancéreuses sur les prélèvements
T2 = Cancer palpable au toucher rectal	T2a	Cancer occupant moins de 50% d'un des deux lobes prostatiques
	T2b	Cancer occupant plus de 50% d'un des deux lobes prostatiques
	T2c	Les deux lobes sont atteints
T3		Extension du cancer aux tissus périphériques (franchissement de la capsule prostatique)
T4		Extension aux organes adjacents (vessie, rectum, paroi pelvienne)
Ganglions régionaux (N)		
N0		Absence de métastases ganglionnaires
N1		Atteinte(s) ganglionnaire(s) régionale(s)
Métastases à distance (M)		
M0		Absence de métastases à distance
M1 = présence de métastases	M1a	Ganglions non régionaux
	M1b	Os
	M1c	Autre(s) site(s)

Tableau 1 : **Classification TNM des cancers de la prostate définie par l'OMS**

mésenchymateuses. La mise en place de la classification des tumeurs prostatiques a été réalisée en 2004 par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Les adénocarcinomes acineux représentent la grande majorité des tumeurs malignes de la prostate chez l'adulte. Ces tumeurs se développent au dépend des acini ou des petits canaux prostatiques et présentent un spectre large depuis les carcinomes indifférenciés de mauvais pronostic jusqu'aux formes très différenciées, lentement évolutives, et dont le diagnostic peut être très délicat. La majorité des études concernant le grade, le stade et la prise en charge thérapeutique concerne ces tumeurs (Vendenbos & Chevallier, 2004).

1. La classification TNM

La classification TNM est un système international, proposé par le chirurgien français Pierre Denoix, entre 1943 et 1952, de façon à classer les cancers selon leur extension anatomique. TNM est le sigle symbolisant la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N, node) et à distance pour d'éventuelles métastases (M), chaque lettre va ensuite être affectée d'un coefficient. Cette classification prend en compte uniquement les données cliniques et a été mise en place afin de permettre un langage commun facilitant les échanges d'informations entre les médecins et les chercheurs au niveau international. Il permet également de codifier les indications de traitement **(tableau 1)**.

2. La classification synthétique, dite d'Amico

Ce système de classification, développé en 1998 par D'Amico, a été mis en place afin d'évaluer le risque de récidive survenant après un traitement localisé du cancer de la prostate. Les patients sont ainsi classés suivant trois niveaux de risque de progression et de récidive du cancer : un risque faible, un risque intermédiaire et un risque élevé. Ce risque intègre des données cliniques simples (classification TNM), des facteurs biologiques (taux de PSA) ainsi que la classification histologique (score de Gleason). Cette classification permet d'avoir un maximum d'information sur le cancer de la prostate et constitue un outil d'aide à la décision pour le traitement.

3. La classification histologique : le système de Gleason

Le système de Gleason dont la première publication remonte à 1974 est le système de classification actuellement le plus utilisé en raison de sa simplicité, de sa reproductibilité satisfaisante et surtout de sa valeur pronostique démontrée (Gleason & Mellinger, 1974). Cette classification procède en deux étapes : (i) l'établissement du grade de chaque composante, (ii) l'établissement du

	Caractéristiques histopathologiques			
	Tumeur	**Cellules**	**Glandes prostatiques**	**Stroma**
Grade 1	Tumeur bien différenciée de la zone transitionnelle	Petites tailles, uniformes, formant des nodules arrondis bien délimités Au cours de la prolifération: cellules claires avec des noyaux denses, réguliers, en position basale. Quelques nucléoles	Glandes à la suite les unes des autres avec interposition d'une mince couche de collagène	Peu abondant
Grade 2	Tumeur de la zone transitionnelle	De formes cubiques ou cylindriques. Atypies nucléaires. Nucléoles de plus de 1 micron Au cours de la prolifération: formation de nodules à contours échancrés	Petites, de tailles hétérogènes	Abondant, d'aspect lâche. Forme un espace régulier entre les structures épithéliales de la tumeur. Légère infiltration du stroma adjacent lors de la prolifération
Grade 3	Tumeur glandulaire de la zone périphérique. Forme glandulaire différenciée observée sur biopsie	Basophiles	Glandes de formes et de tailles irrégulières. Lésions infiltrantes	Très abondant et fibreux
Grade 4	Tumeur formée de larges massifs épithéliaux	Basophiles. Nucléoles volumineux	Glandes fusionnées	Très abondant et fibreux
Grade 5	Tumeur d'architecture massive avec une nécrose centrale. Peu différenciée	Cellules indépendantes, basophiles, peu abondantes. Atypies cytonucléaires importantes	Volumineuses. Lésions très infiltrantes	Stroma fibreux

<u>Tableau 2:</u> Caractéristiques histopathologiques permettant de déterminer le grade des tumeurs prostatiques

L'établissement du score de Gleason nécessite une analyse histologique afin d'attribuer un score à chaque composant. Il repose sur des anomalies de différenciation glandulaire et sur les rapports entre les structures épithéliales tumorales et le stroma tumoral.

(D'après (Vendenbos & Chevallier, 2004)

score établi par addition des deux contingents volumétriquement les plus représentés. Un même adénocarcinome peut associer des aspects architecturaux et une différenciation variables selon les territoires examinés. L'état de différenciation est très important dans le diagnostique puisque l'on sait que les tumeurs peu différenciées vont être les plus agressives car moins hormono-dépendantes et ayant une tendance à métastaser plus importante que les tumeurs plus différenciées. Ce polymorphisme tumoral va être pris en compte par la classification de Gleason.

✓ Détermination du grade de la tumeur

La classification de Gleason est basée sur les anomalies de différenciation glandulaire et sur les rapports entre les structures épithéliales tumorales et le stroma tumoral. Cinq grades sont ainsi distingués lors de l'analyse anatomo-pathologique et témoignent de l'agressivité de la tumeur **(tableau 2)**. Les grades 1 et 2 représentent des lésions rares et principalement localisées au niveau de la zone transitionnelle, très rarement au niveau de la zone périphérique. Le grade 3 correspond à la forme la plus fréquente des cancers glandulaires de la zone périphérique observée lors de biopsies. Enfin, la faible différenciation des tumeurs de grade 5 fait qu'elles sont souvent les plus agressives.

✓ Etablissement du score de Gleason

Plusieurs grades peuvent être rencontrés au sein du même tissu tumoral prostatique, le score est alors établi en réalisant l'addition des grades des deux contingents les plus représentés, et le premier chiffre représente le grade du contingent le plus représenté : ainsi le score de Gleason (4+3) est plus péjoratif que le score (3+4). La valeur pronostique de cette classification est très importante avec une corrélation établie entre le score de Gleason et la mortalité par cancer. En effet, un score de Gleason inférieur ou égal à 6 est représentatif d'un cancer bien différencié et de meilleur pronostic. Un score de Gleason de 7 est caractéristique d'une tumeur moyennement différenciée, alors qu'un score égal ou supérieur à 8 représente un cancer très peu différencié et aura un moins bon pronostic. D'autres relations ont été mises en évidence entre le score de Gleason et le volume tumoral, l'extension extra-prostatique et la fréquence des métastases pour les tumeurs présentant un contingent de haut grade (Vendenbos & Chevallier, 2004).

e. Le diagnostic

Le cancer de la prostate est un cancer asymptomatique jusqu'à des stades avancés, ce qui complique la prise en charge du patient. Ces derniers vont donc consulter uniquement lors de

l'apparition de troubles tels que la rétention d'urine, l'hématurie (présence de sang dans les urines), une impuissance ou encore des douleurs dues au disfonctionnement d'autres organes lors de cancers très avancés et métastatiques. Des mesures de prévention existent notamment un dépistage dès l'âge de 50 ans fortement recommandé. Il s'agit d'un toucher rectal, à effectuer tous les ans, permettant de déceler les modifications de volume, de forme et de consistance de la prostate au niveau de la zone périphérique à partir de laquelle le cancer se développe. Le cas échéant, suivra une analyse du taux de PSA. De nos jours seules les analyses histologiques et cytologiques d'échantillons de la glande prostatique permettent d'établir avec certitude la présence ou non d'un cancer de la prostate. La décision de procéder à une biopsie est prise entre le praticien et le patient après analyses de paramètres tels que l'âge, l'évaluation des taux de PSA et le contexte familial. Une biopsie sera fortement recommandée chez un homme ayant un taux de PSA sérique supérieur ou égal à 4.0ng/ml. En effet, les hommes ayant un taux de PSA inférieur auront plus souvent une maladie à un stade localisé lors du diagnostic que des métastases.

f. Les traitements

La décision du choix du traitement, prise en concertation avec le patient, se fait au cas par cas après analyse de l'âge du patient, de son état général, de l'étendue de la maladie et de la co-morbidité. Le traitement ne sera pas le même s'il s'agit d'un cancer localisé (stade suivant celui de PIN), d'un cancer localement avancé, forme la plus agressive d'un cancer de la prostate localisé ou d'une cancer métastasé (Dunn & Kazer, 2011).

1. Traitements dans le cas d'un cancer de la prostate localisé

- ✓ Suivi attentif

L'évolution du cancer de la prostate peut être très longue sans avoir d'effets sur la santé du patient puisqu'il s'agit d'un cancer indolent. La surveillance est alors une alternative appropriée à l'intervention thérapeutique, avec un suivi du taux de PSA périodique, des biopsies répétitives, ainsi qu'un suivi de l'état du patient. Si le cancer progresse et/ou devient plus agressif, une thérapie sera mise en place (Dunn & Kazer, 2011).

<u>Figure 10</u> : Accélérateur de particules utilisé pour la radiothérapie externe

✓ La chirurgie : prostatectomie radicale

Elle consiste en une ablation totale de la prostate et si cela ne compromet pas la résection du cancer, les nerfs et les faisceaux neurovasculaires sont préservés afin de limiter les complications. Malgré cela elle comporte des risques (chirurgicaux et spécifiques) desquels sont informés les patients, ainsi que des suites opératoires telles que des dysfonctionnements érectiles et des incontinences urinaires.

✓ La radiothérapie

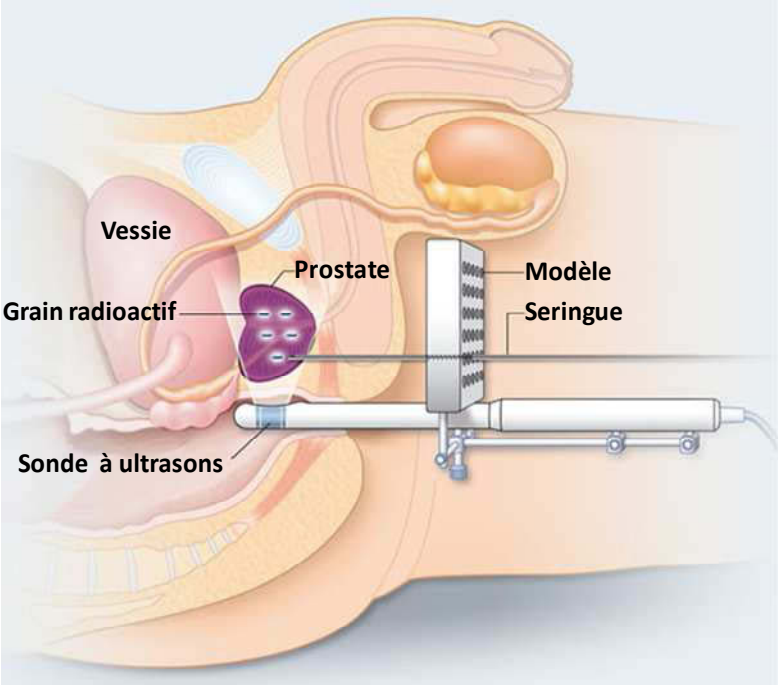
Le but de la radiothérapie par faisceaux externes (XRT : eXternal beam Radiation Therapy) est de délivrer une dose curative au sein de la prostate sans endommager les tissus alentours tels que la vessie, le rectum et l'intestin. La radiothérapie peut également être préconisée en complément d'une prostatectomie radicale dans le cas où tout le cancer n'a pu être enlevé pour cause de complications chirurgicales. Les effets indésirables faisant suite sont le plus souvent des dysfonctionnements érectiles et des incontinences urinaires, ainsi que des effets propres aux rayons tels que des diarrhées et des dysuries **(figure 10)**. Une autre modalité de la radiothérapie est la brachythérapie (ou curiethérapie), radiothérapie interne. Elle consiste en l'administration d'une source radioactive (grain) directement au sein du tissu prostatique par le biais d'une seringue sous guidage à ultrasons transrectal **(figure 11)** (Dunn & Kazer, 2011).

✓ La cryothérapie

Il s'agit d'une intervention chirurgicale destinée à geler la glande prostatique. C'est un traitement de choix pour les patients atteints d'un cancer localisé à haut risque si la prostatectomie est contre-indiquée. La sonde est introduite sous guidage à ultrasons au sein de la prostate qui est alors gelée à des températures de -100°C à -200°C pendant 10 minutes environ (Mouraviev & Polascik, 2006). Les complications sont du même type que pour les traitements précédents, à savoir, un dysfonctionnement érectile, des incontinences urinaires, des rétentions urinaires ou encore des douleurs rectales **(figure 12)** (Dunn & Kazer, 2011).

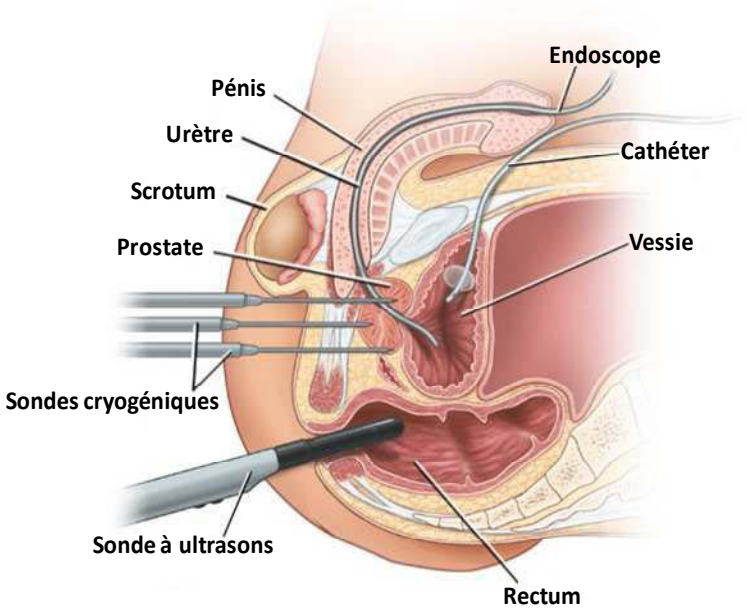
2. Traitements dans le cas d'un cancer de la prostate avancé

Dans le cas de cancers avancés non localisés uniquement au sein de la prostate, les approches ciblées physiques telles que décrites ne sont pas adaptées. Il y a nécessité d'approches systémiques et chimiques qui vont permettre de cibler à la fois les cellules tumorales prostatiques et les métastases.



<u>Figure 11 :</u> Traitement d'un cancer de la prostate par brachythérapie (ou curiethérapie)

Il s'agit d'une modalité de radiothérapie, par voies internes. Des grains radioactifs sont administrés directement au sein du tissu prostatique à l'aide d'une seringue sous guidage par une sonde à ultrasons transrectale.



<u>Figure 12</u> : Traitement d'un cancer de la prostate par cryothérapie

Des sondes cryogéniques sont introduites directement au sein de la prostate sous guidage par une sonde à ultrasons transrectale dans le but de geler la prostate.

✓ L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est un traitement anti-hormonal qui a pour but d'éliminer l'action des androgènes au niveau de la source tumorale, puisque la prostate est un organe androgéno-dépendant. Le premier type d'action a lieu au niveau hypothalamique par l'utilisation d'agonistes du récepteur de l'hormone LHRH (LHRH : Luteinizing Hormon-Releasing Hormone) responsable de la synthèse des androgènes. Cette inhibition peut être realisée en combinaison avec un traitement par des anti-androgènes non stéroïdiens, antagonistes du recepteur des androgènes et visant à bloquer son activation. Cette castration chimique conduit à une régression des cellules épithéliales tumorales. L'efficacité du traitement est cependant de courte durée, 2 à 3 ans en moyenne, puisque certains clones cellulaires vont devenir résistants à la déplétion en androgènes et reprendre leur prolifération (Crawford, 1992; Loblaw *et al.*, 2007; Taplin *et al.*, 1995). Dans un certain nombre de cas, cette reprise de croissance s'accompagne sur le plan clinique d'une augmentation des taux de PSA, traduisant le maintien de l'activité du récepteur des androgènes malgrè l'utilisation des anti-androgènes. Ce traitement s'accompagne d'effets indésirables qui altèrent souvent la qualité de vie (fatigue, poussées de fièvre) et de conséquences à long terme, plus graves, telles l'anémie ou l'ostéoporose (Dunn & Kazer, 2011; Loblaw *et al.*, 2007).

La réactivation du récepteur des androgènes constatée lors de la phase d'échappement thérapeutique peut être expliquée par la présence de mutations de AR retrouvée dans des biopsies de tumeurs prostatique, mais également par l'altération des taux de facteurs de croissance ou de leur récepteur au sein de la tumeur (Djakiew, 2000; Russell *et al.*, 1998).

Mutations du récepteur des androgènes

Trente-neuf mutations du gène de AR ont été mises en évidence dans des échantillons de tumeurs prostatiques (Gottlieb *et al.*, 1998). Ces mutations peuvent se situer sur différents domaines du gène, mais il a été rapporté que celles présentes au niveau du domaine de liaison aux stéroïdes (exons 4-8) avaient une importance clinique, du fait de l'activation constitutive engendrée. De plus, cette mutation confère au récepteur la possibilité d'être activé par des métabolites stéroïdiens autre que la DHT, tels que la progestérone et les androgènes surrénaliens (Culig *et al.*, 1993; Hakimi *et al.*, 1996; Taplin *et al.*, 1995). La stimulation de la croissance des cellules tumorales ayant un récepteur muté, a généralement lieu après une prostatectomie radicale, ou un traitement par des anti-androgènes, tels que le flutamide qui acquière un effet agoniste (Kemppainen & Wilson, 1996). Les taux de mutation de AR dans des cancers androgéno-indépendants sont cependant très variables, de 0% à 50% (Evans *et al.*, 1996; Taplin *et al.*, 1995).

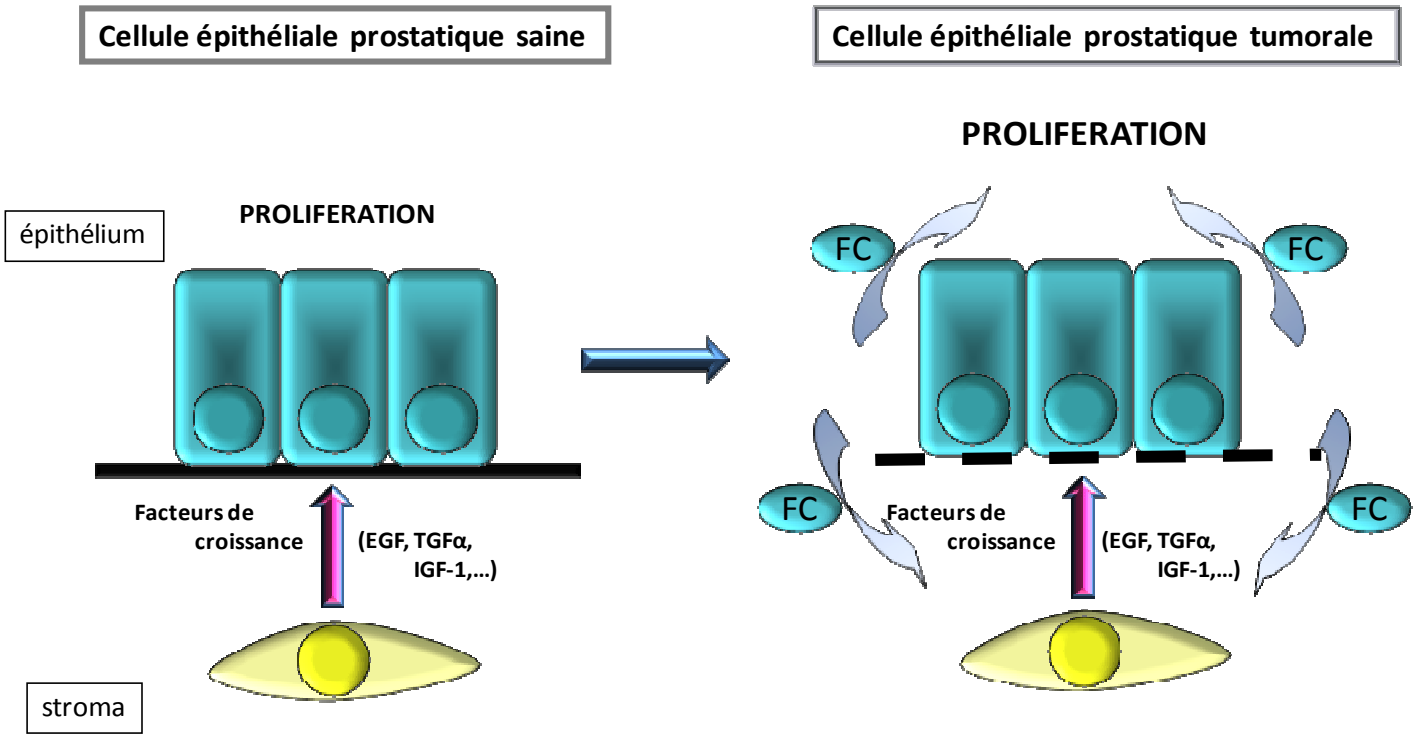


Figure 13 : Mode d'action des facteurs de croissance dans les cellules prostatiques saines et tumorales

Dans les cellules prostatiques saines et pendant les premiers stades de la carcinogenèse prostatique, les facteurs de croissance synthétisés par les cellules stromales permettent la prolifération des cellules épithéliales par un mode d'action paracrine (flèche rose). Les cellules prostatiques tumorales de stade avancé, d'origine épithéliale, acquièrent la capacité de production de leurs propres facteurs de croissance, comme l'EGF, afin d'assurer leur survie par un mode d'action autocrine (flèche bleue), en complément des stimuli des facteurs de croissance produit par les cellules stromales.

FC = Facteur de Croissance

Les cytokines

La cytokine IL-6, dont le rôle sera détaillé dans le chapitre suivant, est impliquée dans de nombreux processus cellulaires et possède un rôle de stimulation de la tumorigenèse dans plusieurs types de cancer et notamment dans le cancer de la prostate. Après fixation sur son récepteur, elle permet l'activation de voies de signalisation impliquées dans la croissance des cellules tumorales (Smith *et al.*, 2001). Des études mettent en évidence un lien entre les taux circulants d'IL-6 et l'acquisition d'une androgéno-indépendance des cellules tumorales de prostate par l'activation de la transcription dépendante de AR, en absence du ligand (Chen *et al.*, 2000; Hobisch *et al.*, 1998). Des patients ayant un cancer résistant à la castration ont des taux plasmatiques important d'IL-6 (Adler *et al.*, 1999; Twillie *et al.*, 1995). D'autres cytokines tels que l'IL-4 ou l'IL-10 ont aussi la capacité d'activer AR (Lee *et al.*, 2003).

Voies de signalisation des facteurs de croissance

La progression du cancer de la prostate est souvent associée à une altération de la signalisation des facteurs de croissance, notamment par le passage d'un mode d'action paracrine dans des cellules normales à une stimulation autocrine de la croissance des cellules épithéliales au cours de la progression tumorale **(figure 13)**. Les tumeurs prostatiques ont ainsi la capacité d'auto-synthétiser des facteurs de croissance et de stimuler elles-mêmes leur prolifération à travers l'action du récepteur des androgènes (Culig *et al.*, 1996). Les facteurs de croissance ont également le potentiel d'activer le récepteur des androgènes indépendamment de la fixation du ligand. C'est le cas, entre autres, de l'IGF-1, le KGF et l'EGF dans les cancers de la prostate (Culig *et al.*, 1994). De plus il existe une corrélation entre le niveau d'expression d'EGFR et l'acquisition d'une résistance à la castration des tumeurs prostatiques (Bartlett *et al.*, 2005; Di Lorenzo *et al.*, 2002). Ces données constituent une piste intéressante dans la compréhension de la mise en place d'une croissance tumorale après une thérapie par déplétion en androgènes et dans l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- ✓ La chimiothérapie

La chimiothérapie constitue une autre approche chimique des traitements des cancers de la prostate résistants à la castration et métastatiques. Ce type de thérapie est en revanche non curatif. Le produit pharmacologique le plus utilisé est le Docetaxel. Les effets secondaires de ce type de traitement sont le plus souvent une baisse de la qualité de vie, mais également des myélosuppressions (perte des globules blancs), des dérèglements gastro-intestinaux, ou encore des neuropathies périphériques (Dunn & Kazer, 2011; Tannock *et al.*, 2004).

Chapitre 2 : Implication des voies de signalisations des facteurs de croissance dans le cancer de la prostate

1) Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissances sont des molécules peptidiques multifonctionnelles qui, dans divers systèmes biologiques, contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaire. Pour assurer leurs activités et médier leurs messages, ces peptides régulateurs se lient à leurs récepteurs membranaires respectifs induisant ainsi une cascade de signalisation intracellulaire. Le signal fonctionnel déclenché lors de la liaison du peptide circule dans le microenvironnement, spécifique du facteur émetteur, soit entre des cellules identiques ou de même type (autocrinie), soit entre des types cellulaires différents (paracrinie). L'existence de signaux paracrines entre le stroma et les cellules épithéliales prostatiques à été démontrée pour la première fois en 1970 par une impossibilité de croissance des cellules épithéliales en absence de mésenchyme. Ces relations paracrines se mettent en place tôt dans le développement, dès l'embryogenèse de la prostate, où elles sont nécessaires à son développement et à son contrôle fonctionnel au stade adulte (Cussenot, 1997). Actuellement, de nombreux facteurs de croissance ont été identifiés et caractérisés pour leur rôle dans la glande prostatique normale ou tumorale. Ces derniers ont des rôles spécifiques, sont pour certains indispensables à l'homéostasie prostatique et ne sont pas tous impliqués au même niveau et avec la même importance dans la pathologie de la prostate. Les facteurs de croissance les plus étudiés et ayant un rôle important dans la physiologie et la physiopathologie de la prostate sont le bFGF, le TGFβ, l'IGF, l'IL-6, le VEGF et l'EGF.

2) Principaux facteurs de croissance impliqués dans la physiologie et la pathologie de la prostate

a. Fibroblast growth factors

Le bFGF (basic Fibroblaste Growth Factor ou FGF-2), est synthétisé par une grande variété de types cellulaires dans l'organisme tels que les cellules épithéliales, les cellules stromales (Sherwood *et al.*, 1992), les cellules endothéliales ou les macrophages (Baird *et al.*, 1985). Il est impliqué dans le développement et la différenciation tissulaire (Chamberlain & McAvoy, 1987; Slack *et al.*, 1987) et participe aussi à l'angiogenèse et à la modulation de la fonction neuronale (Schubert *et al.*, 1987). Au niveau de la prostate humaine adulte saine, le bFGF est exprimé à la fois au niveau du stroma prostatique et des cellules épithéliales, bien que seules les cellules stromales expriment le récepteur (Sherwood *et al.*, 1992; Story, 1995). Cette synthèse et la réponse des cellules stromales au bFGF suggèrent qu'il exerce un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du mésenchyme prostatique (Story *et al.*, 1989). Un dérèglement de l'expression de bFGF est associé au cancer de la prostate. Les cellules cancéreuses humaines acquièrent une expression autocrine de bFGF (Cronauer *et al.*, 1997), ce qui favorise la prolifération cellulaire et conduit à l'élévation des taux sériques de bFGF chez les patients (Nakamoto *et al.*, 1992). Le bFGF augmente aussi la mobilité cellulaire et l'invasion, favorisant ainsi la capacité à métastaser (Pienta *et al.*, 1991). Cet effet est exercé par la régulation positive du renouvellement de la matrice extracellulaire, par la modulation d'expression de protéases et la synthèse de collagène, de fibronectine ou encore de protéoglycanes (Gospodarowicz *et al.*, 1987).

b. Transforming growth factor-beta family

La famille du TGFβ (Transforming Growth Factor β) est constituée de trois protéines : TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3, très similaires d'un point de vue structural. Les TGF-βs sont exprimés au cours du développement et dans la prostate adulte (Merz *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 1990). Contrairement à TGF-β1 qui a une expression ubiquiste, TGF-β2 et TGF-β3 ont une expression plus restreinte

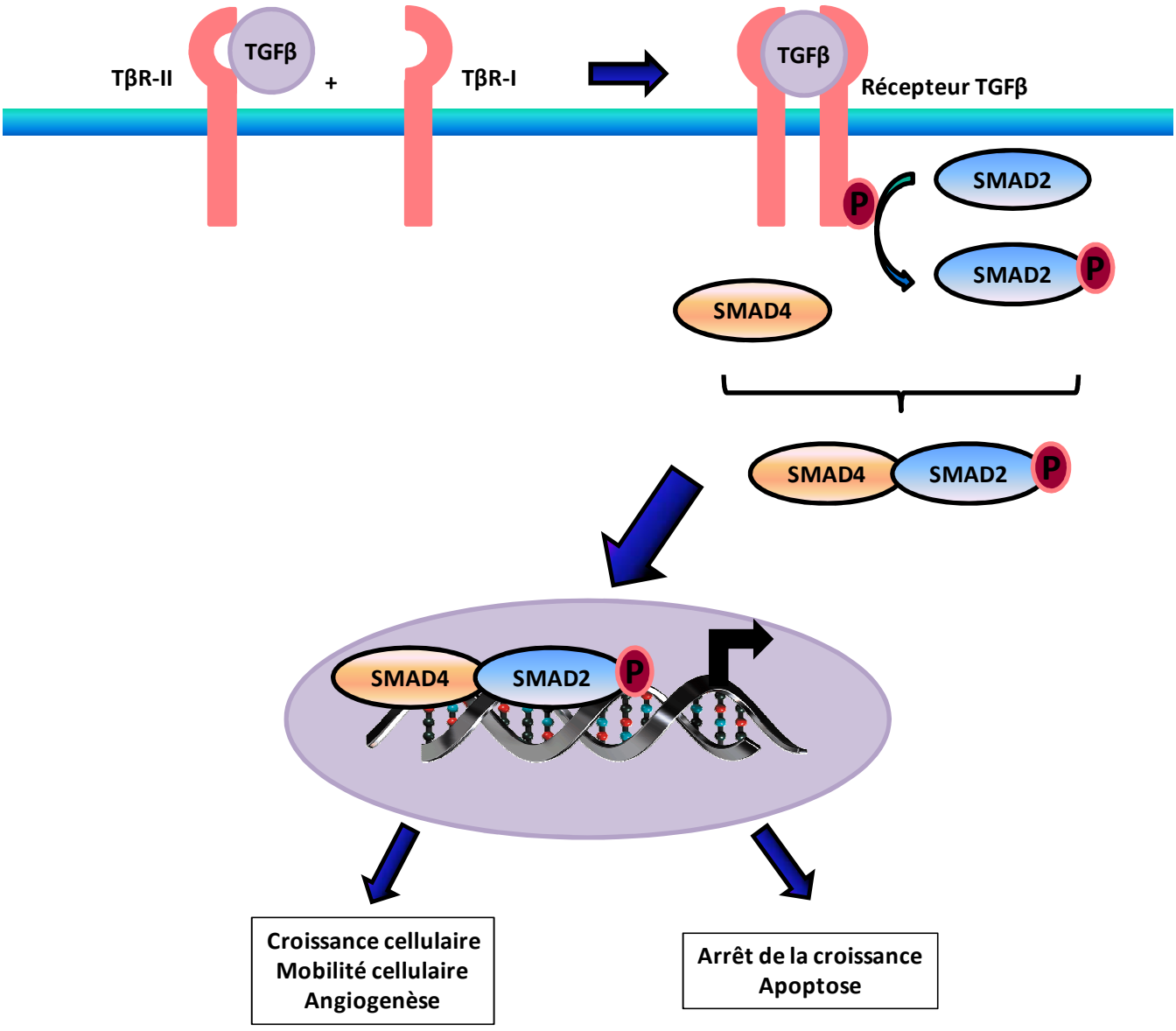


Figure 14: Mécanisme d'activation des voies de signalisation dépendantes des TGFβs

Après fixation du ligand TGFβ sur le récepteur de type II (TβR-II), le recepteur de type I (TβR-I) est recruté et va activer le facteur de transcription SMAD2 par phosphorylation. Le complexe SMAD2/SMAD4 va ensuite transloquer dans le noyau, recruter d'autres facteurs de transcription et activer la transcription des gènes cibles. Certains de ces gènes ont un effet oncogénique puisqu'ils permettent la croissance cellulaire et l'angiogenèse, d'autres ont un effet suppresseur de tumeur en induisant un arrêt de la croissance et l'apoptose.

(Merz *et al.*, 1994). Il existe deux types de récepteurs, transmembranaires et à activité tyrosine kinase, qui lient ces peptides, TβR-I et TβR-II. Lors de la transduction du signal, TGF-β1 se lie tout d'abord au récepteur TβR-II ce qui conduit au recrutement et à l'activation du récepteur TβR-I et à l'initiation de la cascade de signalisation faisant intervenir les facteurs de transcription SMAD2 et SMAD4 **(figure 14)**. Les TGFβs sont impliqués dans de multiples fonctions biologiques, telles que l'angiogenèse (Steiner *et al.*, 1995), la stimulation et/ou l'inhibition de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, protéoglycanes, intégrines) (Roberts *et al.*, 1990). Ainsi, ils contribuent à la croissance cellulaire en tant qu'inhibiteurs et activateurs, selon le type cellulaire considéré ou le stade de différenciation d'un même type cellulaire.

Dans le cas d'une prostate saine, les TGFβs jouent un rôle dans le développement dès le stade fœtal où ils exercent des effets antiprolifératifs afin de réguler la croissance cellulaire (Schuurmans *et al.*, 1988; Story *et al.*, 1996). De plus, leur expression ainsi que celle de leurs récepteurs sont régulées négativement par les androgènes (Landstrom *et al.*, 1996). Lors de la tumorigenèse et en fonction du stade de progression, les TGFβs excercent des rôles antagonistes. Néanmoins, des corrélations entre l'augmentation des taux d'ARNm et de protéines de TGF-β1 et la progression des cancers de la prostate ont été mises en évidence dans les cellules épithéliales (Roberts & Sporn, 1985; Truong *et al.*, 1993). En effet, les concentrations sériques en TGF-β1 de patients aux stades métastatiques sont significativement plus élevées que celles de patients atteints de cancers localisés (Kakehi *et al.*, 1996). Outre un rôle dans la croissance cellulaire, ces corrélations peuvent également refleter la capacité des TGFβs à induire la transition épithélio-mésenchymateuse et ainsi participer à l'augmentation des capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales (Sehgal *et al.*, 1996).

c. Insulin-like growth factor family

La famille des IGFs (Insulin-like Growth Factor) comprend les IGF-1, IGF-2 et la relaxine. Ces facteurs de croissance sont ainsi nommés car ils ont un haut degré de similitudes à la fois structurales et fonctionnelles avec l'insuline et la pro-insuline (Cussenot, 1997; Russell *et al.*, 1998). Il existe deux types de récepteurs, membranaires et à activité tyrosine kinase, qui peuvent lier ces peptides, le type 1 (IGFR-1) et le type 2 (IGFR-2). La disponibilité de IGF-1 et IGF-2 est régulée par six protéines ayant une forte affinité spécifique de liaison, nommées IGF-BP-1 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1), IGF-BP-2, … et IGF-BP-6. Leur accumulation est également régulée, par clivage par des protéases, ce qui contrôle leur disponibilité et l'activité des IGFs(Czech, 1989; Rosenfeld *et al.*, 1990). Les IGFs

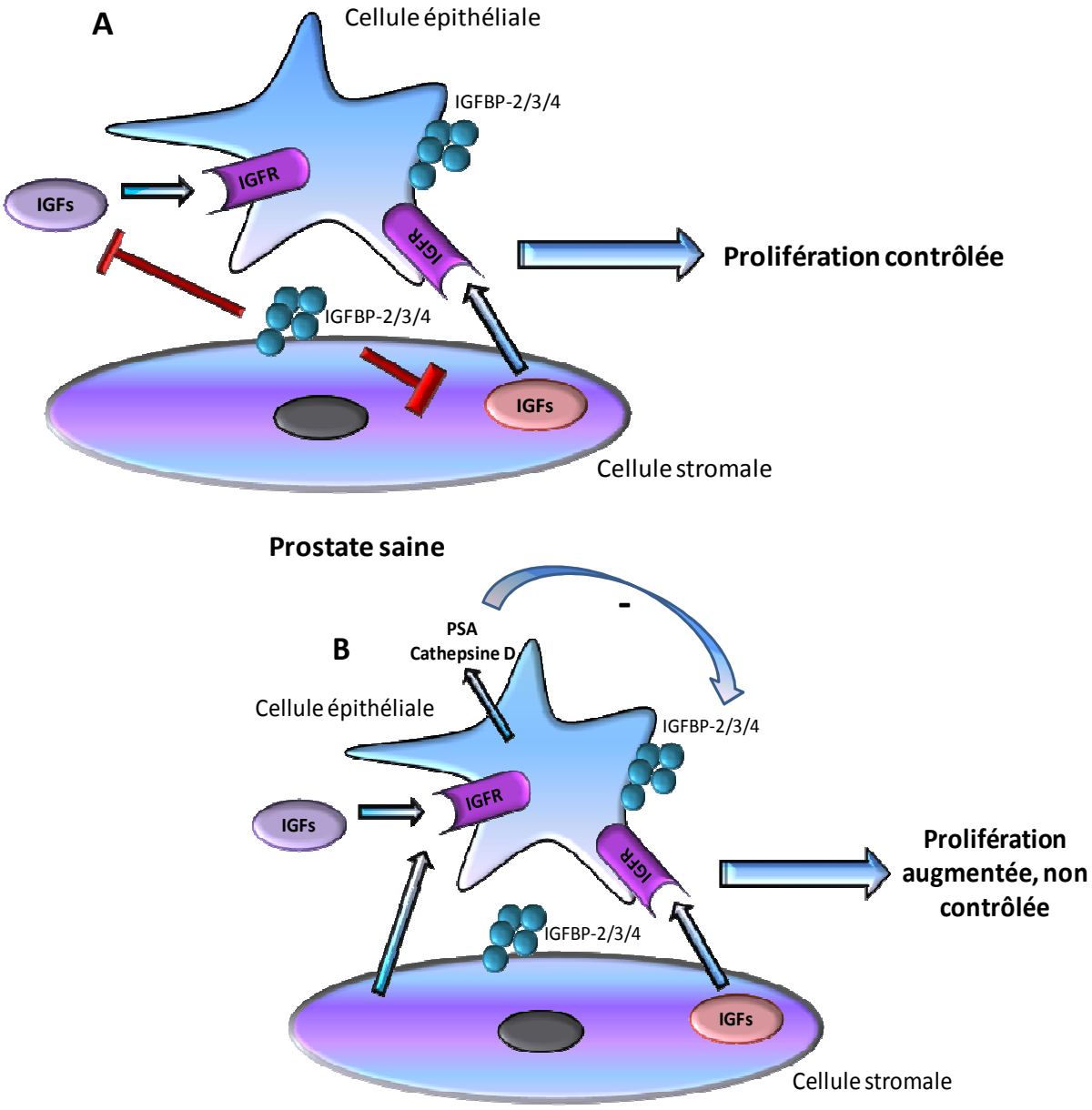


Figure 15 : Rôle des IGF-BPs dans le contrôle de la prolifération des cellules prostatiques saines et tumorales

A : Dans la prostate normale, les IGFs sont sécrétés par les cellules stromales, et vont agir sur les cellules épithéliales qui expriment leurs récepteurs respectifs. La capacité des IGFs à stimuler la prolifération des cellules est contrôlée par la sécrétion des IGF-BP-2-3/4 produits en grande partie par les cellules épithéliales.

B : Dans la prostate tumorale, l'expression des IGF-BPs est diminuée. De plus, les cellules épithéliales tumorales sécrètent du PSA et de la cathepsine D qui vont cliver ces IGF-BPs présents et interférer dans leur liaison aux IGFs augmentant ainsi la capacité des IGFs à stimuler la prolifération des cellules épithéliales.

(D'après (Russell *et al.*, 1998)

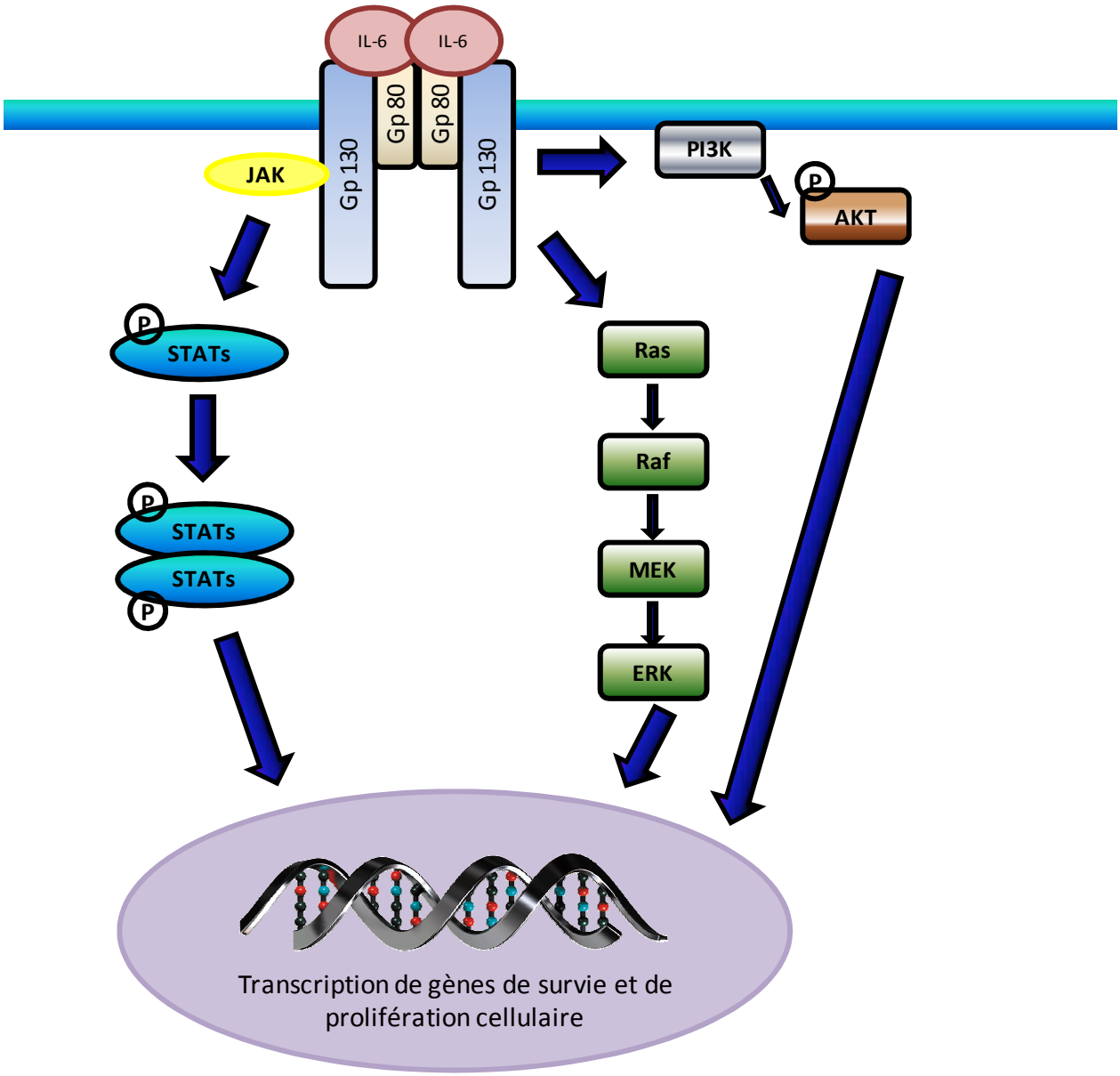
ont un rôle dans la croissance et la prolifération des cellules épithéliales prostatiques grâce à l'activation en chaine d'une cascade de réactions faisant suite à l'activation du récepteur. Cette cascade fait intervenir des molécules spécifiques impliquées dans la transduction de voies de signalisation parmi lesquelles les protéines de la voie MAPK (MAP Kinase) et celles de la voie PI3K/AKT, toutes deux impliquées dans la prolifération et la survie des cellules prostatiques (Lima *et al.*, 2009).

Dans le cas d'une prostate saine, les IGFs produits au niveau des cellules stromales uniquement exercent leurs fonctions sur les cellules épithéliales qui expriment le recepteur. Ces dernières vont en retour sécréter des IGF-BPs afin de réguler la disponibilité des IGFs, et ce de manière paracrine (Boudon *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1991). IGF-1 et IGF-2 exercent une action mitogène sur les cellules prostatiques, qu'elles soient saines ou tumorales, en stimulant la progression du cycle cellulaire et en inhibant l'apoptose (Lima *et al.*, 2009). Des corrélations entre les niveaux d'expression des IGFs, ainsi que ceux de leurs récepteurs, et les cancers de la prostate ont été mises en évidence lors d'analyses d'échantillons de biopsies et dans des lignées cellulaires tumorales (Cussenot, 1997; Lima *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 1998). Kimura et ses collaborateurs ont mis en évidence que les lignées cellulaires de prostate DU-145 et LNCaP avaient des capacités prolifératives augmentées en réponse à un apport exogène en IGF-1 (Kimura *et al.*, 1996). La régulation de la disponibilité et l'expression et des fonctions des IGFs par les IGF-BPs est présente dans les lignées tumorales et l'expression des IGF-BPs est associée au développement d'un cancer de la prostate **(figure 15)**. Leur clivage, permettant de réguler leur disponibilité, est sous le contrôle indirect des androgènes. En effet, lors d'un apport en androgènes il y a clivage de la protéine IGF-BP-3 par le PSA, ce qui conduit à une augmentation de la prolifération des cellules en réponse aux IGFs (Kanety *et al.*, 1993; Marcelli *et al.*, 1995).

d. IL-6 et autres cytokines

1. IL-6 et cancer de la prostate

L'Interleukine 6 (IL-6) est une cytokine multifonctionnelle qui a un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse, l'inflammation, le métabolisme osseux et le développement neuronal (Hirano & Kishimoto, 1992; Raber *et al.*, 1997). Elle possède également un rôle dans l'immunosuppression locale. Dans un contexte physiologique, par fixation sur son récepteur, l'IL-6 active des voies de signalisation comme la voie PI3K/AKT, la voie MAPK ou la voie Jak/STAT3.Ces voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle des processus de prolifération,



<u>Figure 16</u> : Voies de signalisation induites par la cytokine IL-6 après fixation sur son récepteur

L'IL-6 se lie au récepteur dimérique Gp130/Gp80 pour activer trois voies majeures de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie des cellules : la voie des MAPk (Ras-ERK), la voie PI3K/AKT et la voie des STATs.

(D'après (Heinrich *et al.*, 2003; Kamimura *et al.*, 2003; Nicholson & Anderson, 2002)

d'angiogenèse et de différenciation **(figure 16)** (Culig & Bartsch, 2006; Heinrich *et al.*, 2003; Kamimura *et al.*, 2003; Nicholson & Anderson, 2002). Une grande variété de tumeurs solides produisent de l'IL-6 de manière constitutive et les effets cellulaires biologiques ou pathologiques qui en résultent pourraient être cliniquement importants.

Des études chez des patients atteints de cancers de la prostate mettent en évidence une augmentation des taux sériques d'IL-6 proportionnelle au grade de la tumeur (Twillie *et al.*, 1995). De plus, la concentration de cette cytokine est particulièrement élevée dans les cancers résistants à la castration (Drachenberg *et al.*, 1999; Michalaki *et al.*, 2004). D'autres études mettent en évidence une corrélation entre les niveaux d'accumulation d'IL-6 et de son récepteur et l'aggressivité des tumeurs prostatiques (Siegsmund *et al.*, 1994). De ce fait, cette cytokine peut être considérée comme un facteur de mauvais pronostic. Des analyses *in vitro*, sur les lignées tumorales de prostate LNCaP et PC-3, mettent en évidence que l'expression forcée d'IL-6 permet une prolifération accrue des cellules tumorales de prostate associée à une inhibition de l'apoptose par l'activation des voies MAPK (Ueda *et al.*, 2002) et PI3K/AKT (Chung *et al.*, 2000). Elle a également un rôle dans l'activation du récepteur des androgènes *via* la mobilisation des voies de signalisation citées pour aboutir à l'activation de AR independamment de la fixation de son ligand. Des études *in vitro* montrent que quelque soit le type cellulaire, en absence d'androgènes l'IL-6 est capable d'activer AR (Degeorges *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 1997). L'IL-6 est aussi un acteur dans la différenciation neuroendocrinnienne des cellules épithéliales pour former les tumeurs neuroendocrinnes (Cabrespine *et al.*, 2007; Deeble *et al.*, 2001).

2. Autres cytokines

L'IL-4, l'IL-10 et l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) jouent également un rôle dans la carcinogenèse prostatique.

L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) est un facteur pléiotropique exclusivement exprimé par les cellules stromales (Seslar *et al.*, 1993). Il stimule les phases de progression lors de cancers métastatiques ou en échappement hormonal (Pisters *et al.*, 1995) en favorisant la prolifération, l'invasion et la croissance androgéno-indépendante des cellules tumorales.

L'IL-4 et l'IL-10, ont également un rôle dans l'activation de la transcription dépendante du récepteur des androgènes indépendamment du ligand (Lee *et al.*, 2003). L'IL-10 est aussi impliquée dans des mécanismes d'invasion des cellules tumorales (Stearns *et al.*, 1999).

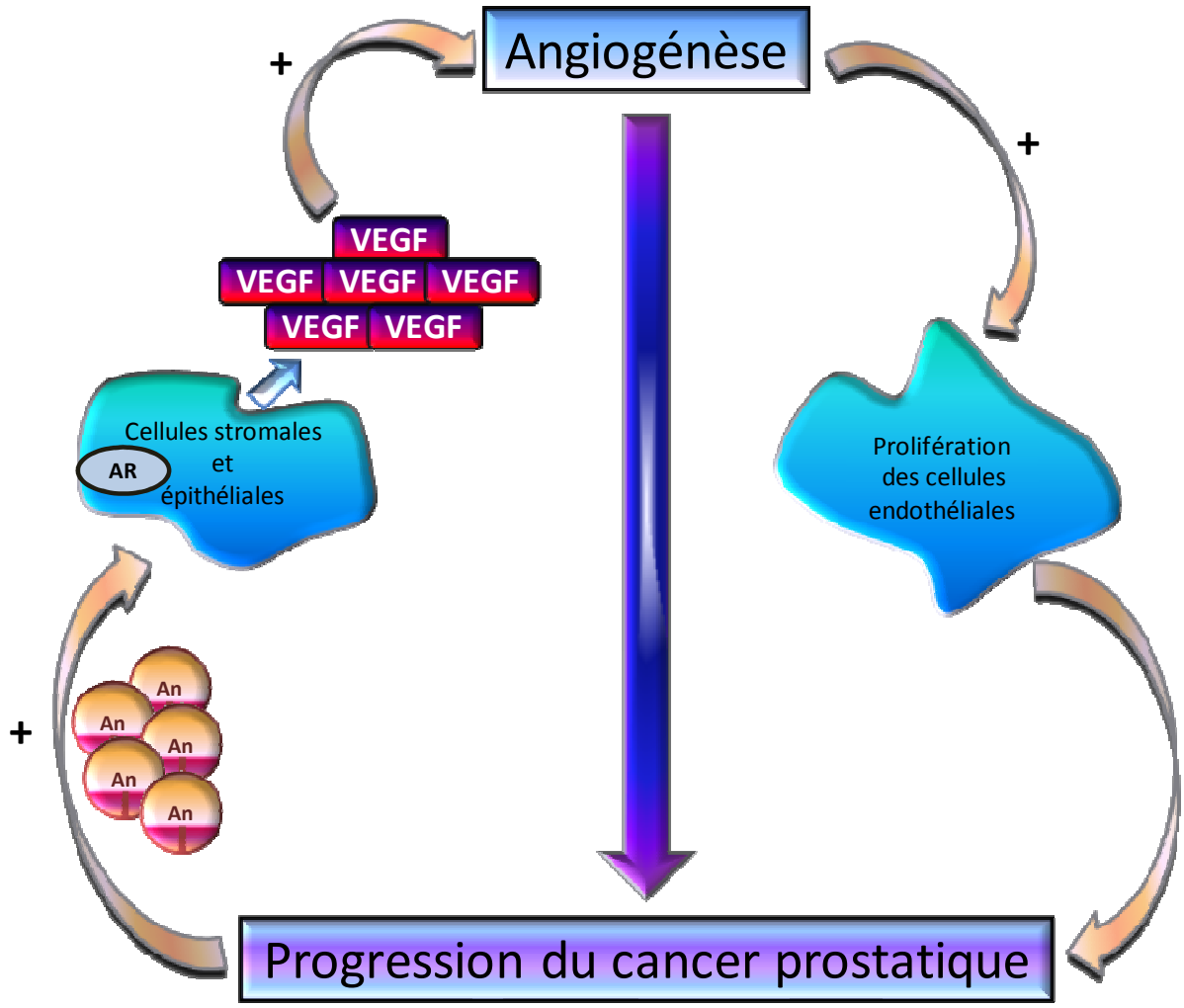


Figure 17 : Mode d'action du VEGF dans la croissance des tumeurs prostatiques

La signalisation androgénique augmentée lors de la progression des cancers de la prostate, dans les cellules stromales et épithéliales, va permettre une augmentation de l'expression et de la synthèse de VEGF. Cela conduit à une augmentation de l'angiogenèse et permet la prolifération des cellules endothéliales et leur dissémination dans la circulation sanguine.

(D'après (Delongchamps *et al.*, 2006)

Les études du rôle de l'IL-6 dans la carcinogenèse prostatique basées sur des corrélations à partir d'échantillons de patients et sur des analyses mécanistiques, mettent clairement en évidence son implication dans les cancers de la prostate. En revanche, les analyses menées sur les autres cytokines citées font ressortir des contradictions quant à leurs rôles dans la carcinogenèse prostatique (Faupel-Badger *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2002).

e. Vascular endothelial growth factor family

La famille du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est composée de plusieurs isoformes générées par épissage alternatif à partir d'un gène unique et d'expression pléiotropique (Salven *et al.*, 1998). Cinq formes se distinguent : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. Le VEGF a la capacité de s'hétérodimériser avec les différentes formes existantes pour se fixer sur l'un de ses 3 récepteurs (VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3) et conduire le signal de transduction (Delongchamps *et al.*, 2006). Ces récepteurs à activité tyrosine kinase activent les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK impliquées dans les processus de survie, de prolifération et de mobilité cellulaire (Wissmann & Detmar, 2006). Les membres de la famille VEGF contrôlent diverses fonctions physiologiques, telles que la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales pour conduire à l'assemblage des néovaisseaux (Fong *et al.*, 1995).

Des analyses cliniques mettent en évidence des corrélations entre l'angiogenèse induite par le VEGF et l'agressivité des cancers de la prostate (Wakui *et al.*, 1992). De plus, l'expression de VEGF et de son récepteur est significativement plus importante dans les tissus prostatiques tumoraux par rapport aux tissus sains (Li *et al.*, 2004b; Stefanou *et al.*, 2004). A cela s'ajoute la mise en évidence, dans des études *in vivo* et *in vitro*, d'une régulation positive de l'angiogenèse par les androgènes. En effet, la déplétion en androgènes conduit à une diminution du taux de transcription de VEGF et de la prolifération des cellules endothéliales **(figure 17)** (English *et al.*, 1985; Stewart *et al.*, 2001).

Les corrélations observées entre le VEGF et l'agressivité des cancers de la prostate suggèrent que son dosage plasmatique pourrait être utilisé comme outil de diagnostic. Des études montrent une diminution des taux plasmatiques de VEGF suite à une prostatectomie radicale traduisant le niveau de production de VEGF par la prostate (George *et al.*, 2004). Le polymorphisme C/T du gène VEGF peut également être utilisé comme outil de diagnostic car le génotype homozygote « TT » est retrouvé plus fréquemment chez les patients atteints d'un cancer de la prostate (Lin *et al.*, 2003).

f. Epidermal growth factor family

Au sein de la prostate, la famille des facteurs de croissance épidermique est largement représentée par une expression pléiotropique. Ils jouent un rôle important au cours de l'embryogenèse prostatique, ainsi que dans la différenciation cellulaire et l'angiogenèse (Russell *et al.*, 1998). Les deux membres importants de cette famille sont l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF-α (Transforming Growth Factor α). Ces deux peptides sont structurellement et fonctionnellement fortement apparentés et induisent leur signal de transduction par l'intermédiaire du même récepteur EGFR. Ces deux facteurs de croissance sont exprimés par les cellules prostatiques stromales et activent leur récepteur présent sur les cellules épithéliales de manière paracrine (Cohen *et al.*, 1994). Dans le fluide de prostates humaines saines l'EGF est fortement accumulé (Gregory *et al.*, 1986) ce qui suggère un rôle de régulateur important dans la croissance des cellules prostatiques (McKeehan *et al.*, 1984). En effet, la croissance des cellules épithéliales en culture nécessite un apport exogène d'EGF (Peehl *et al.*, 1989).

Des études *in vivo* mettent en évidence que les androgènes ont un rôle régulateur sur l'expression de l'EGF et du TGFα. En effet, la castration de modèles murins entraîne une diminution de l'expression de ces facteurs de croissance (Hiramatsu *et al.*, 1988; Nishi *et al.*, 1996).

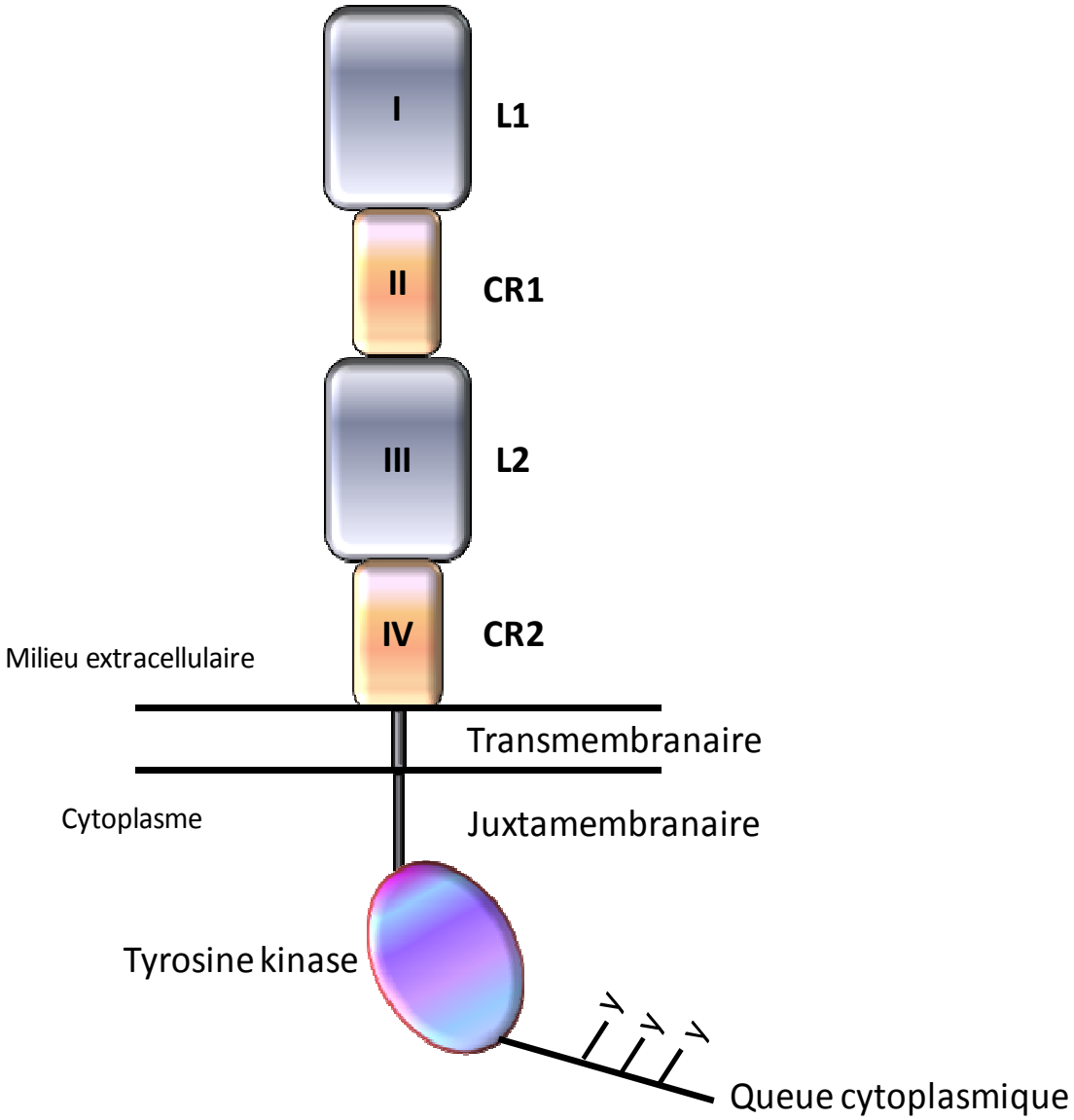


Figure 18 : Structure schématique du récepteur de la famille ErbB

La partie extracellulaire du récepteur est composée de 4 sous-domaines, homologues 2 à 2 (L1, L2 et CR1, CR2), suivie d'un domaine transmembranaire et d'un domaine juxtamembranaire. Au niveau de la partie cytoplasmique, se trouve la partie C-terminale, ayant le domaine tyrosine kinase, ainsi que la queue cytoplasmique où se trouvent les résidus tyrosines, cibles majeures de phosphorylation.

(D'après (Hubert, 2006)

3) La voie EGFR/EGF

a. Le récepteur EGFR

Le récepteur aux facteurs de croissance épidermique (EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor), appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase RTK (receptor tyrosine kinase) ErbB. Cette famille est composée de quatre récepteurs membres structurellement apparentés : EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4) (Normanno *et al.*, 2006). Plusieurs ligands de EGFR ont été identifiés, mais ceux qui se lient de manière préférentielle sont l'EGF et le TGFα. Suite à leur fixation il y aura activation du récepteur, suivie d'une cascade de phosphorylation induisant la transduction de signaux intracellulaires et l'activation de voies de signalisation importantes. Parmi les voies activées, nous pouvons citer la voie MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK), la voie PI3K/AKT et la voie JAK/STAT, qui conduisent toutes à la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie, la différenciation cellulaire et la migration.

1. Structure du récepteur

Le récepteur EGFR est une glycoprotéine membranaire de 170 kDa, composée de trois domaines en chaîne unique de 1186 acides aminés : un domaine de liaison extracellulaire, un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine intracellulaire portant l'activité tyrosine kinase **(figure 18)** (Olayioye *et al.*, 2000). Ce dernier domaine est hautement conservé malgré la présence de quelques substitutions d'acides aminés au niveau du récepteur ErbB3, inhibant l'activité kinase. Le domaine le moins conservé entre les quatre membres est le domaine extracellulaire, ce qui leur confère une spécificité de liaison des ligands (Olayioye *et al.*, 2000).

La région extracellulaire (ou ectodomaine) est composée de 621 acides aminés et se structure en quatre sous-domaines (I à IV), répétés deux à deux et ce succédant en alternance. Les domaines I et III (encore appelés L1 et L2) sont structurellement semblables et sont analogues à un domaine du récepteur à l'IGF1. Ils sont impliqués dans la liaison du ligand. Les domaines II et IV (CR1 et CR2 : cystein-rich) contiennent quant à eux des régions riches en résidus cystéines (Carpenter & Cohen, 1990; Hubert, 2006). Au niveau du domaine II se trouve le « bras de dimérisation », permettant l'homo ou l'hétérodimérisation du récepteur après fixation du ligand.

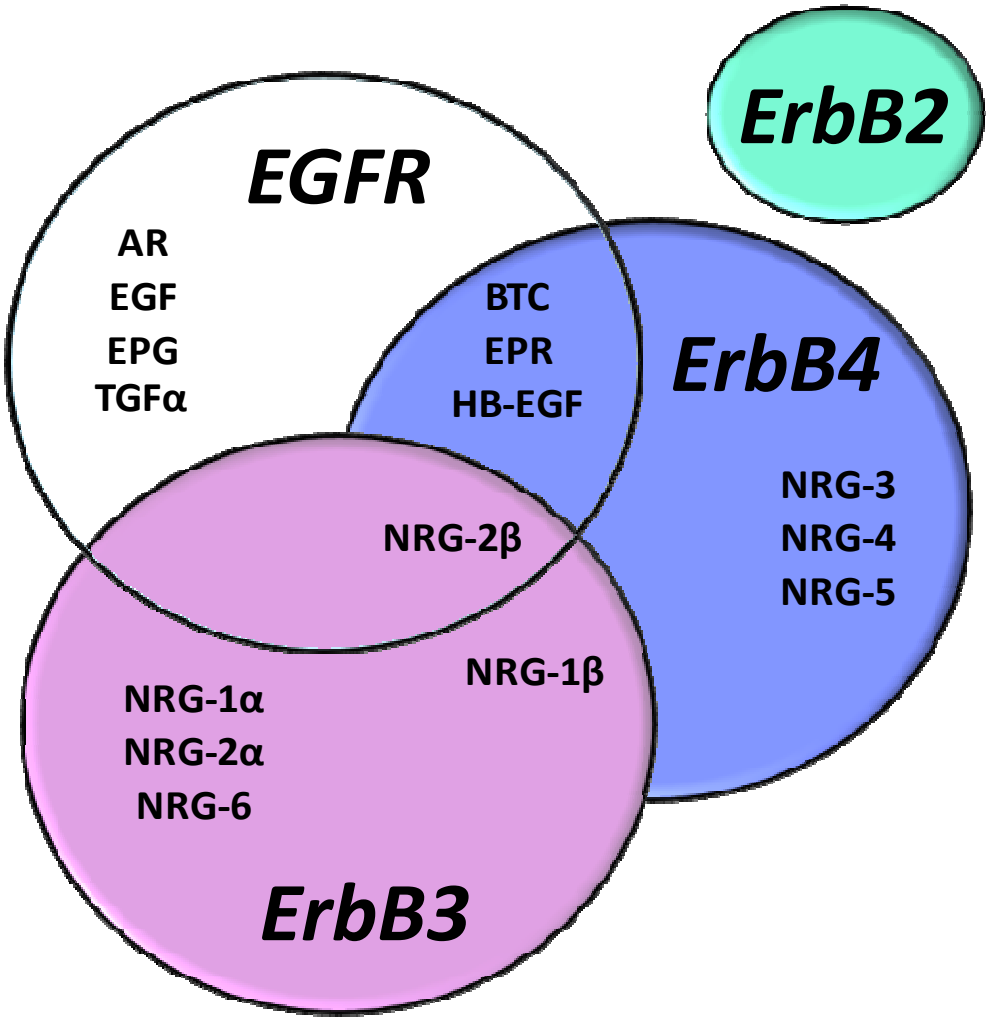


Figure 19 : Diagramme de Venn de la répartition des ligands des récepteurs de la famille ErbB

Parmi les quatre membres de la famille des récepteurs ErbB, seul ErbB2 n'a pas de ligand identifié. En revanche, les trois autres ont un ligand commun, NRG-2β, NRG-1β est commun à ErbB3 et ErbB4 et les récepteurs EGFR et ErbB4 ont également 3 ligands en commun. Chaque récepteur dispose aussi de ses ligands spécifiques.

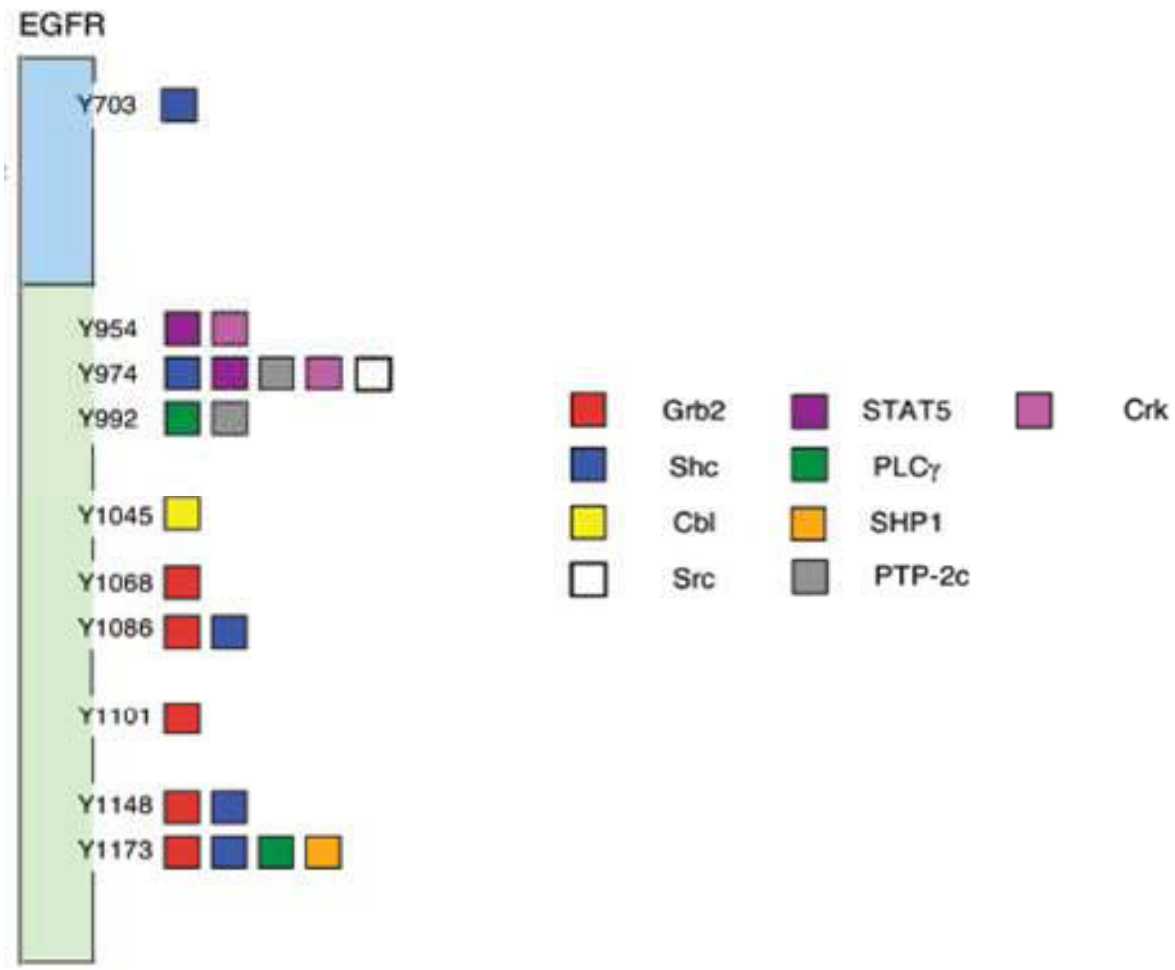
AR : amphiréguline, EGF : epidermal growth factor, EPG : épigène, BTC : β-celluline, EPR : épiréguline, HB-EGF : héparine binding growth factor, NRG : neuréguline

(D'après (Wilson *et al.*, 2009)

En absence de ligand, il y a une auto-inhibition de la dimérisation du récepteur par interaction du bras de dimérisation avec le domaine IV. Ce dernier domaine composée de 23 acides aminés et hydrophobe est relié à la partie transmembranaire du récepteur et permet uniquement l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique. Cette partie transmembranaire est suivie par le domaine intracytoplasmique qui permet l'activité du récepteur. Il est composé de trois sous-domaines : le domaine juxtamembranaire, le domaine central et la partie carboxy-terminale. Le rôle du domaine juxtamembranaire n'est pas clairement défini mais il permettrait un rétrocontrôle de l'activité du récepteur par la phosphorylation d'un résidu thréonine par la protéine kinase C. La partie centrale permet l'activité tyrosine kinase du récepteur. Elle contient entre autre la région de fixation de l'ATP ainsi que des résidus thréonines et sérines susceptibles d'être phosphorylés. En absence de fixation du ligand, la boucle d'activation adopte une conformation inaccessible pour le substrat et l'ATP. La fixation du ligand permet une modification conformationnelle, qui dévoile la poche de fixation de l'ATP, et permet la dimérisation intracytoplasmique nécessaire pour l'activité catalytique. Le domaine carboxy-terminal, sans activité catalytique, contient 6 sites d'auto-phosphorylation dont quatre sont essentiels à l'activation du récepteur notamment dans la transduction du signal EGF. Il s'agit des résidus thréonines 1068, 1086, 1148 et 1173. La phosphorylation de ces résidus permet non seulement l'activation du récepteur, mais constitue également des sites d'accueil pour la fixation de protéines adaptatrices possédant un domaine SH2 (Src Homology 2) qui ont un rôle majeur dans la transduction des signaux intracellulaires (Carpenter & Cohen, 1990; Hubert, 2006).

2. *Ligands et activation du récepteur*

Les récepteurs ErbB sont activés pas fixation de ligands qui sont des facteurs de croissance de la famille EGF, soit produits pas la même cellule que celle exprimant le récepteur (sécrétion autocrine), soit par les cellules alentours (sécrétion paracrine) (Olayioye *et al.*, 2000). Ces ligands sont caractérisés par la présence de trois ponts disulfures, ce qui leur confère une spécificité de liaison ainsi que des motifs structuraux tels que des sites de glycosylation, de liaison à l'héparine ou des domaines apparentés aux immunoglobulines. Il existe 11 ligands des récepteurs ErbB : la β-celluline, l'épiréguline et l'héparine binding growth factor se lient préférentiellement au récepteur ErbB-4, les neurégulines (NRGs 1 à 4) peuvent se fixer uniquement à ErbB3 et ErbB4. Enfin le récepteur EGFR (ErbB1) va pouvoir lier l'amphiréguline, l'épigène, la β-celluline, l'épiréguline, l'héparine, le TGFα et l'EGF qui nous intéressera plus précisément par la suite (Holbro *et al.*, 2003). Le récepteur ErbB2 n'a, quant à lui, pas de ligand identifié **(figure 19)**. Tous ces ligands sont des petites protéines solubles d'environ 55 acides aminés, synthétisées sous forme de pro-ligands ancrés à la membrane ayant une



<u>Figure 20</u> : Représentation schématique des sites d'interaction des protéines adaptatrices sur les tyrosines phosphorylées du récepteur EGFR

La fixation du ligand sur son récepteur, entraîne son activation par trans-phosphorylation des résidus tyrosines dans la partie carboxy-terminale. Il y a alors stabilisation du récepteur, création de sites permettant la fixation de protéines adaptatrices et initiation de la transduction des voies intracellulaires.

(D'après (Wilson *et al.*, 2009)

faible affinité pour le récepteur. Leur libération dans le milieu extracellulaire à lieu suite à un clivage protéolytique par des métalloprotéinases membranaires en réponse à divers stimuli. Cette activation indirecte semble jouer un rôle important dans le pouvoir oncogénique de ces récepteurs. De plus, la nature du ligand va déterminer le dimère qui sera formé. Par exemple la fixation de l'EGF ou du TGFα va favoriser la formation d'homodimère EGFR ou l'hétérodimérisation EGFR/ErbB2 (Hubert, 2006).

La fixation du ligand sur le domaine extracellulaire va entraîner un réarrangement structural libérant ainsi le bras de dimérisation. Le monomère inactif va ainsi se dimériser *via* une interaction récepteur-récepteur par le biais du domaine II ce qui permet l'activation du domaine intracellulaire tyrosine kinase également par dimérisation. L'étude de la structure cristalographique de EGFR montre que sa forme inactive est caractérisée par une interaction intramoléculaire entre les domaines II et IV (Cho & Leahy, 2002). Suit une autophosphorylation des résidus tyrosines dans la partie carboxy-terminale qui permet une stabilisation du récepteur dans sa conformation active et la création de sites d'accueil. Les protéines adaptatrices à domaines SH2 sont Shc, Crk, Grb2, Gab1 **(figure 20)** mais également des kinases comme Src ou PI3K (par la sous unité régulatrice p85).

3. Transduction du signal médiée par EGFR

Une fois le récepteur activé il y aura mise en place du signal de transduction permettant *in fine* la modulation de fonctions cellulaires telles que la prolifération cellulaire, la différenciation, la mobilité et la survie cellulaire. La transduction du signal médiée par EGFR est complexe et fait intervenir dans la majorité des cas des protéines adaptatrices et/ou effectrices à domaine SH2. Ces domaines SH2 permettent des interactions protéine/protéine et les molécules possédant ces domaines se fixent uniquement lorsque la protéine « cible » est phosphorylée (récepteur activé). Ces protéines ne possèdent pas d'activité enzymatique mais transmettent le signal reçu au niveau du récepteur en agissant comme plateforme pour le recrutement et l'assemblage d'autres protéines permettant ainsi une cascade de phosphorylation qui aboutit à l'activation de la transcription de gènes cibles impliqués dans un processus cellulaire donné (Schlessinger, 1994).

- ✓ La voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK)

Une des protéines adaptatrices connue pour interagir avec la partie cytoplasmique du récepteur EGFR est la protéine Grb2 (Growth factor receptor-bound protein). Elle se lie spécifiquement au niveau de la tyrosine 1068 de EGFR lorsque celle-ci est phosphorylée. Cette fixation entraîne un changement de la conformation du récepteur, lui permettant la liaison aves les séquences riches en prolines en partie carboxy-terminale de la protéine d'échange GDP/GTP Sos. Ce recrutement à la

membrane permet l'activation de Sos, elle-même entraînant l'activation de la protéine Ras. Ras va ainsi recruter à la membrane la protéine Raf par liaison de son domaine amino-terminal permettant ainsi son activation. Raf est une protéine kinase cytoplasmique qui, transloquée à la membrane, va phosphoryler MEK (MAPK/ERK kinase). Un des effecteurs aval de l'activation de cette voie est la kinase de régulation du signal extracellulaire ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase), activée par phosphorylation. ERK1/2 active des régulateurs transcriptionnels impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. D'autres effecteurs aval de la cascade MAPK activés lors de la signalisation EGFR sont la protéine kinase activatrice du stress (SAPK), la kinase c-Jun (JNK) et le facteur de transcription c-fos qui interviennent dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire **(figure 21A)**.

- ✓ La voie PKC/NFκB

La protéine effectrice phospholipase C gamma (PLCγ) est également une protéine activée par phosphorylation lors de sa liaison au récepteur à l'EGF. Cette activation augmente l'hydrolyse enzymatique de PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en IP3 (Inositol 1,4,5-triphosphate) et DAG (diacylglycerol). DAG est impliqué dans l'activation de la voie de la protéine kinase C (PKC), un des régulateurs de la protéine NFκB (Nuclear Factor *kappa* B) intervenant dans la survie cellulaire. La liaison de PLCγ active aussi des cascades de signaux de transduction impliqués dans la différenciation, la croissance, la mobilité et l'endocytose. Le dérèglement de ces fonctions cellulaires est associé aux cancers du sein et de la prostate **(figure 21B)**.

- ✓ La voie PI3K/AKT

L'activation du récepteur EGFR, suite à la stimulation par l'EGF, permet également le recrutement de la protéine adaptatrice Gab1 (Grb2 associated binding protein 1) qui appartient à la famille de la protéine Grb2. Gab1 sera ainsi phosphorylée sur des tyrosines spécifiques ce qui lui permet de recruter la protéine kinase PI3K par interaction avec sa sous-unité régulatrice p85 (Mattoon *et al.*, 2004). Cette signalisation PI3K serait activée suite à l'hétérodimérisation de EGFR avec ErbB3 (Soltoff *et al.*, 1994). La sous unité p85 possède un domaine SH2 qui ne permet cependant pas la fixation directe au domaine cytoplasmique de EGFR (Soltoff *et al.*, 1994), mais éventuellement à ErbB3 en l'absence de Gab1 (Mattoon *et al.*, 2004). Les PI3Ks sont des médiateurs importants dans la transduction du signal médié par EGFR. Ces kinases vont convertir le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5- triphosphate) qui va servir de second messager et permettre ainsi le recrutement des kinases PDK1 (PI3K- dependent serine/thréonine kinases 1) et AKT (ou protein kinase B : PKB) du cytoplasme à la membrane plasmique (Hanada *et al.*, 2004). AKT est une protéine ayant un rôle clé dans les voies de

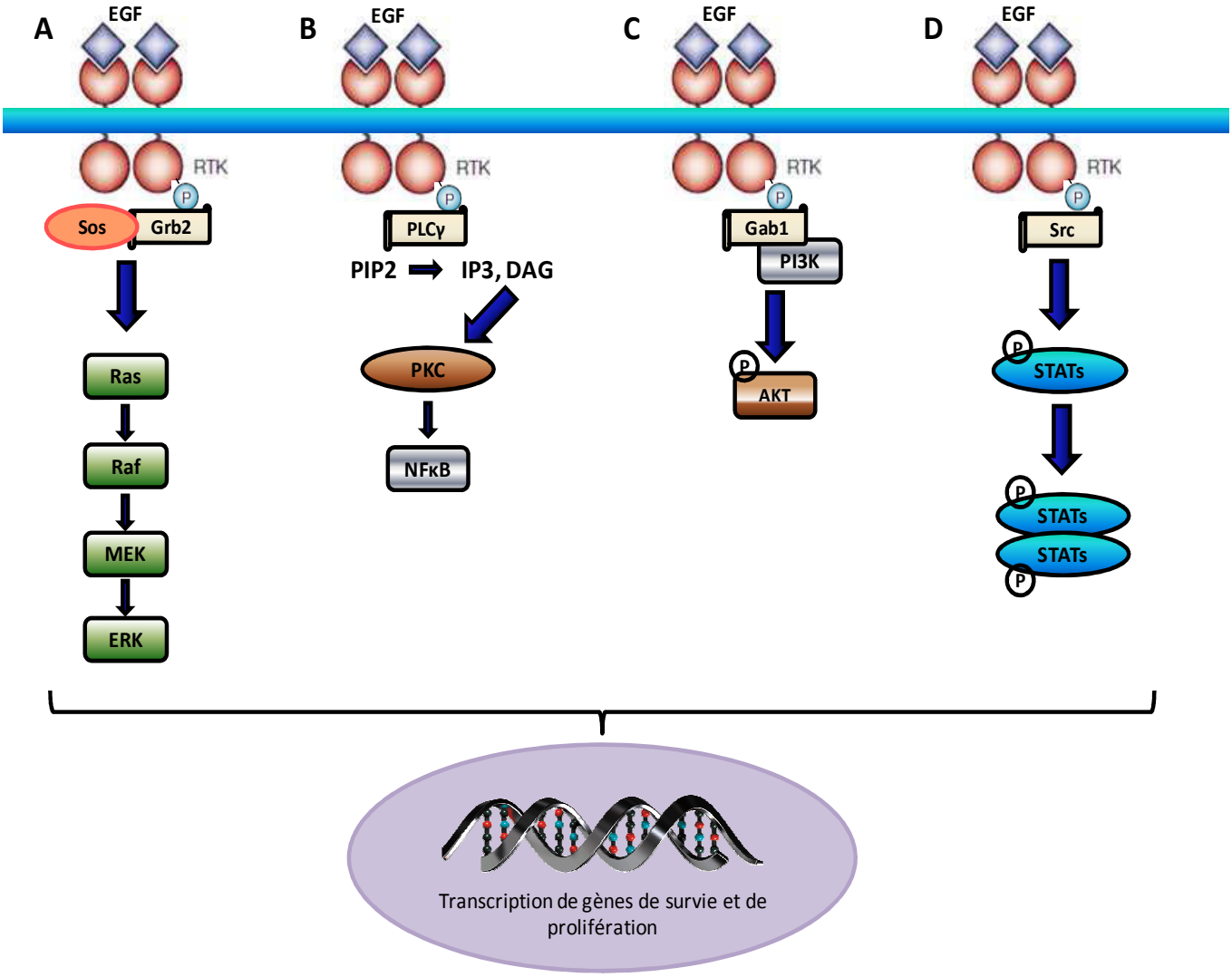


Figure 21 : Voies de transduction médiées par EGFR

L'activation de EGFR suite à la fixation de son ligand entraîne sa phosphorylation et la fixation de protéines adaptatrices qui permettent l'activation des voies de signalisation en aval. Parmi les voies activées on trouve la voie des MAPK, la voie PKC/NFκB, la voie PI3K/AKT et la voie des STATs impliquées dans la prolifération et la survie des cellules.

transduction activées par les facteurs de croissance. Elle contribue ainsi à des mécanismes cellulaires tels que la croissance cellulaire et l'apoptose et récemment des auteurs lui ont attribué un rôle dans l'invasion et la mobilité cellulaire (Firtel & Chung, 2000). Une augmentation de son activité est donc associée à des maladies humaines parmi lesquelles le cancer mais aussi le diabète (Hanada *et al.*, 2004). Récemment, les travaux de Wang et ses collaborateurs ont montrés l'activation d'AKT par interaction avec la protéine adaptatrice PLCγ1. Le domaine SH3 de PLCγ1 aurait la capacité d'interagir avec les motifs prolines d'AKT et ainsi permettre son recrutement à la membrane et son activation. Ce mode d'activation serait impliqué dans l'augmentation de la mobilité cellulaire stimulée par un signal EGF (Wang *et al.*, 2006b). AKT contrôle la survie cellulaire grâce à l'activation en aval de la protéine mTOR impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Dreyer *et al.*, 2009) et l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et de GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) **(figure 21C)**.

- ✓ La voie des STATs

Le récepteur à l'EGF permet l'activation des protéines STATs (signal transducers and activators of transcription) comme STAT1, STAT3 ou STAT5. Grâce à leurs domaines SH2, les protéines STATs peuvent se lier directement à EGFR préalablement stimulé ou interagir avec la protéine kinase adaptatrice Src. L'activation des voies STATs permet des processus cellulaires variés tels que le développement embryonnaire, la genèse et la fonction des organes, les réponses immunitaires innées et acquises, mais également la régulation de la différenciation cellulaire, la croissance et l'apoptose (Mui, 1999). En effet, l'activation de la voie des STATs va entraîner la transcription de gènes cibles favorisant la survie cellulaire comme Bcl-x_L ou Mcl-1 (Buettner *et al.*, 2002), impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme les cyclines D1/D2 (Martino *et al.*, 2001; Sinibaldi *et al.*, 2000) ou encore VEGF **(figure 21D)** (Niu *et al.*, 2002).

Des données mettent également en évidence que EGFR peut exercer directement des fonctions nucléaires après son activation et sa translocation dans le noyau, en plus de son contrôle sur la cascade de transduction classique. Cette forme nucléaire de EGFR est retrouvée dans les cellules normales en prolifération ainsi que dans les cellules cancéreuses. Le rôle physiologique de EGFR nucléaire n'est pas clairement élucidé mais il semblerait qu'il agisse comme un enhancer de la transcription génique. Il possède, entre autre, une capacité de liaison avec les protéines STAT3 et E2F1 pour augmenter la transcription de gènes du cycle cellulaire tel que la cycline D1 (Lo & Hung, 2006).

Cet aperçu des voies de transduction induites lors de l'activation du récepteur à l'EGF par des ligands spécifiques met en évidence que la majorité de ces voies est impliquée dans la régulation de

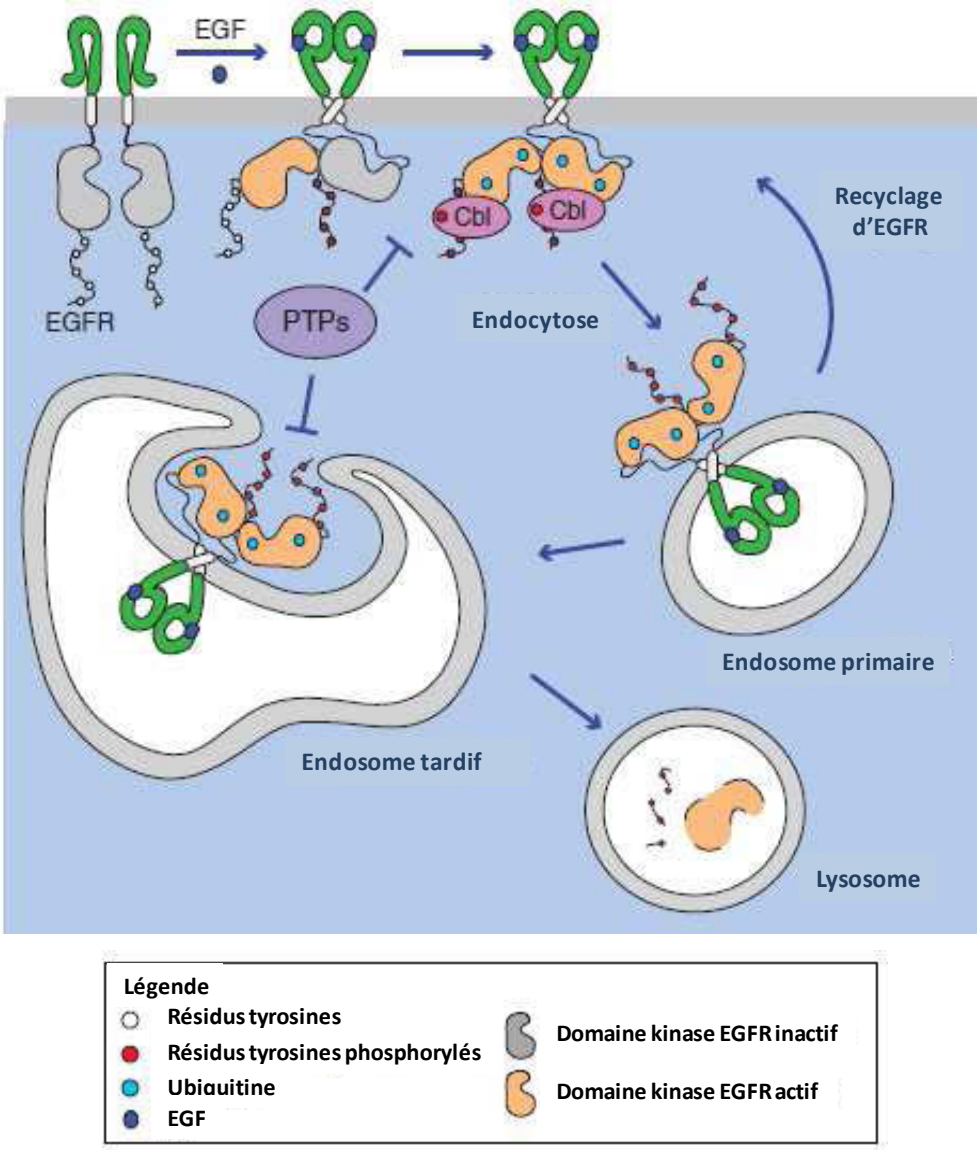


Figure 22 : Mécanisme d'inhibition de l'activité de EGFR par internalisation

La liaison de EGF sur son récepteur entraîne sa dimérisation et la phosphorylation des résidus tyrosines. Cette activation peut être rapidement inhibée par des phosphatases (PTPs). Un deuxième mécanisme fait intervenir la fixation de la protéine Cbl, une E3 Ubiquitine ligase qui va entraîner l'internalisation du récepteur dans les endosomes puis sa dégradation lysosomale.

(D'après (Segatto *et al.*, 2011)

processus dérégulés dans l'oncogenèse. Le contrôle de l'activité de EGFR est donc primordial pour assurer l'équilibre de la balance prolifération/apoptose.

4. Régulation de l'activité de EGFR

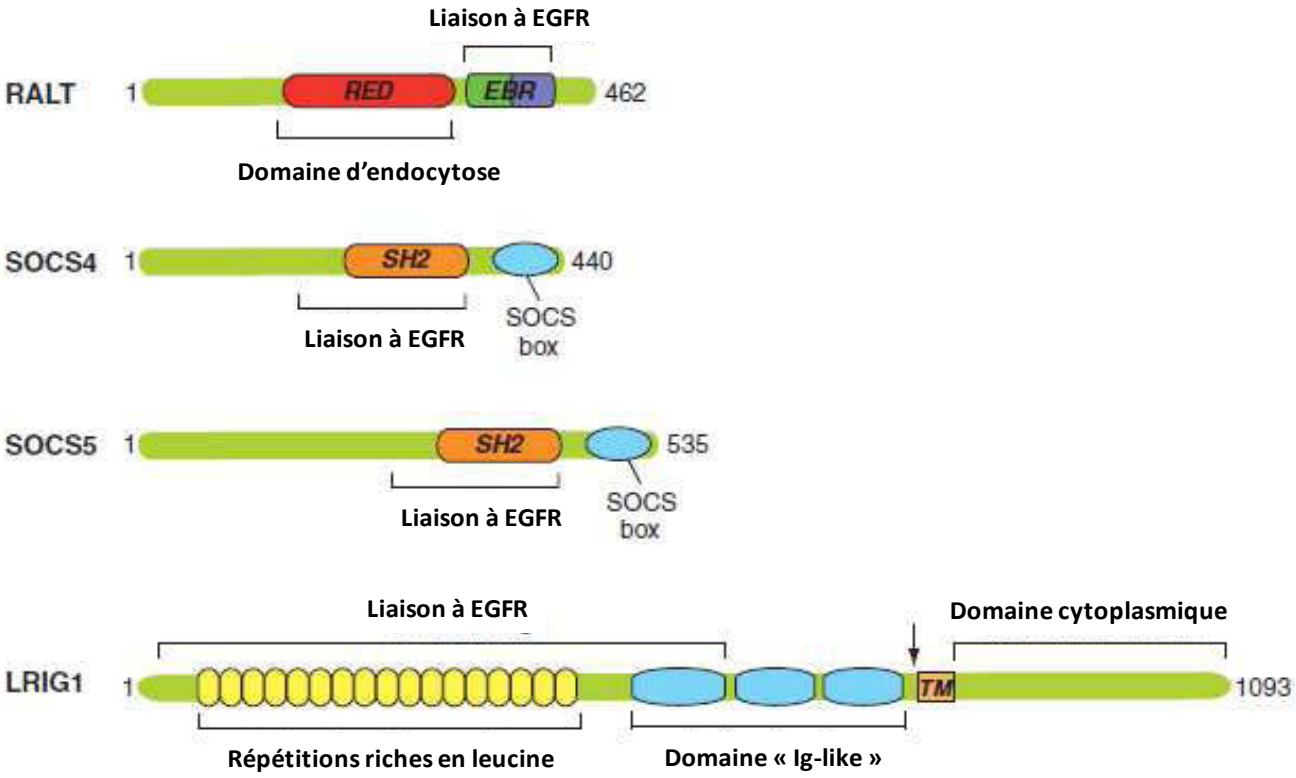
Suite à l'activation du récepteur à l'EGF, deux mécanismes qui conduisent à l'inhibition de son expression et/ou de son activité peuvent être mis en place : (i) un mécanisme de type ubiquitaire qui entraîne la déphosphorylation du récepteur et son endocytose, (ii) et un mécanisme ne conduisant pas à un blocage immédiat du récepteur mais nécessitant l'expression *de novo* de protéines inhibitrices et fortement régulées.

✓ Internalisation du récepteur

Les sites de fixation formés lors de la phosphorylation des résidus tyrosines de EGFR, vont être la cible de protéines entraînant l'inactivation et la dégradation du récepteur. D'une part, celui-ci va être pris en charge par des tyrosines phosphatases (PTPs : Protein Tyrosine Phosphatase) (Keilhack *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2005), ce qui conduit à l'extinction de son activité et à son endocytose (Madshus & Stang, 2009; Sorkin & Goh, 2009). D'autres part, la phosphorylation de la tyrosine 1045 va permettre le recrutement de la protéine Cbl. Il s'agit d'une E3 ubiquitine-ligase qui, comme son nom l'indique, va ubiquitinyler EGFR conduisant à son endocytose et sa dégradation par le protéasome **(figure 22)** (Levkowitz *et al.*, 1999).

✓ La régulation négative rétroactive

Comme dans le cas de nombreuses signalisations, la régulation négative rétroactive est un processus ayant un rôle clé dans la restriction de l'activité de EGFR (Citri & Yarden, 2006). Les premières études effectuées chez la drosophile (*drosophila melanogaster*) ont mis en évidence des inhibiteurs rétroactifs inductibles (IFIs : Inducible Feedback Inhibitors) exprimés *de novo* (Perrimon & McMahon, 1999). Ces IFIs sont également impliqués dans le contrôle de la signalisation EGFR chez les mammifères, en diminuant l'activité et/ou l'expression de EGFR à la surface des cellules. Quatre IFIs ont été identifiés : LRIG1 (Leucine-Rich and ImmunoGlobulin-like domains protein 1) (Gur *et al.*, 2004) , SOCS4 et SOCS5 (Suppressor Of Cytokine Signalling 4 and 5) (Kario *et al.*, 2005; Nicholson *et al.*, 2005), et RALT (Receptor-Associated Late Transducer, ou MIG6) (Fiorentino *et al.*, 2000). Ces inhibiteurs possèdent tous un domaine de liaison à EGFR essentiel dans la suppression de la signalisation du récepteur **(figure 23)**. Ils peuvent également se lier aux autres membres de la famille ErbB inhibant ainsi le réseau de signalisation en globalité. Ils agissent tous de façon similaire en permettant l'ubiquitinylation (LRIG1, SOCS4 et SOCS5), et/ou l'endocytose puis la dégradation du



<u>Figure 23</u> : Structure des inhibiteurs rétroactifs inductibles contrôlant l'activité de EGFR

RALT, SOCS4, SOCS5 et LRIG1 sont des inhibiteurs de l'activité EGFR. RALT possède un domaine de liaison à EGFR (domaine EBR) nécessaire et suffisant pour l'inactivation du domaine catalytique du récepteur. SOCS4 et SOCS5 se lient à EGFR par leur domaine SH2 et recrutent une E3 ligase par le domaine « SOCS box ». LRG1 est une protéine transmembranaire, qui se lie à EGFR par son domaine extracellulaire riche en leucine et son domaine « Ig-like » induisant ainsi sa dégradation.

(D'après (Segatto *et al.*, 2011)

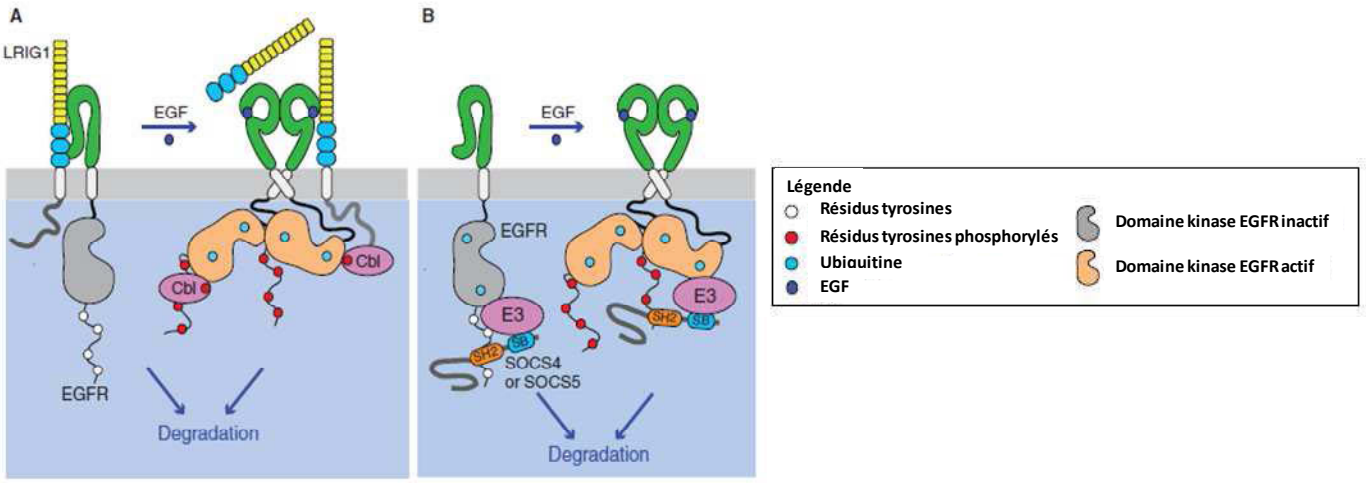
récepteur (RALT) **(figure 24 et 25)** (Segatto *et al.*, 2011).

Le signal EGFR doit être régulé, c'est pourquoi l'activation transcriptionnelle des gènes codant les IFIs est finement régulée. Des études dans la lignée cellulaire HeLa, montrent que (i) l'expression de la protéine SOCS5 est induite dans les 60 minutes qui suivent la stimulation par EGF (Kario *et al.*, 2005), (ii) celle de l'inhibiteur LRIG1 est détectée dans les 4 heures après la stimulation EGF (Gur *et al.*, 2004), (iii) et que l'expression de RALT est induite par la majorité des ligands ErbB (tels que EGF, TNFα et NRG1β) et dans les 2 heures qui suivent la stimulation EGF (Fiorini *et al.*, 2002). L'expression des IFIs est donc détectée dans une fenêtre de temps courte, qui coincide entièrement avec la phase du cycle G1, phase pendant laquelle la prolifération cellulaire est sous la dépendance de EGF. La régulation de l'expression de ces inhibiteurs est fine et dépend d'une dégradation par le protéasome même si les mécanismes sous-jacents sont mal connus (Segatto *et al.*, 2011).

5. Le système récepteur/ligands dans le développement

L'importance de l'expression des récepteurs ErbB et de leurs ligands a été mise en évidence à partir de l'analyse de souris génétiquement modifiées. En effet, des mutations de gènes codant pour les récepteurs ErbB entraînent des défauts dans le développement de plusieurs organes avec à terme une mort embryonnaire ou périnatale. D'une manière générale, ces mutations conduisent à divers traumatismes comme (i) des défauts de structures de l'épithélium de la peau, des poumons, du pancréas, ou encore au niveau du système nerveux central (Miettinen *et al.*, 1995), (ii) des arrêts dans la formation de la myéline et le développement des oligodendrocytes (Park *et al.*, 2001), (iii) des altérations des structures neurales et cardiaques (Lee *et al.*, 1995), (V) et des altérations dans les activités motrices et comportementales chez les souris (Golub *et al.*, 2004). Les récepteurs ont également un rôle au niveau de l'organisme adulte et plus précisément dans le développement de la glande mammaire qui subit une forte prolifération et différenciation postnatale (Olayioye *et al.*, 2000). Les récepteurs sont nécessaires pour la morphogenèse des canaux mammaires lors du développement des alvéoles lobulaires et la sécrétion du lait (Jones & Stern, 1999; Naylor & Ormandy, 2002).

La voie EGF/EGFR est également importante dans le développement de la prostate puisque l'inhibition d'expression de EGF, chez la souris, conduit à un développement anormal (Abbott *et al.*, 2003). L'expression de EGF est également détectée dans le système nerveux et périphérique pour la régulation des processus de prolifération, de migration et de différenciation (Xian & Zhou, 2004) et dans la formation du tractus gastro-intestinal (Troyer *et al.*, 2001).

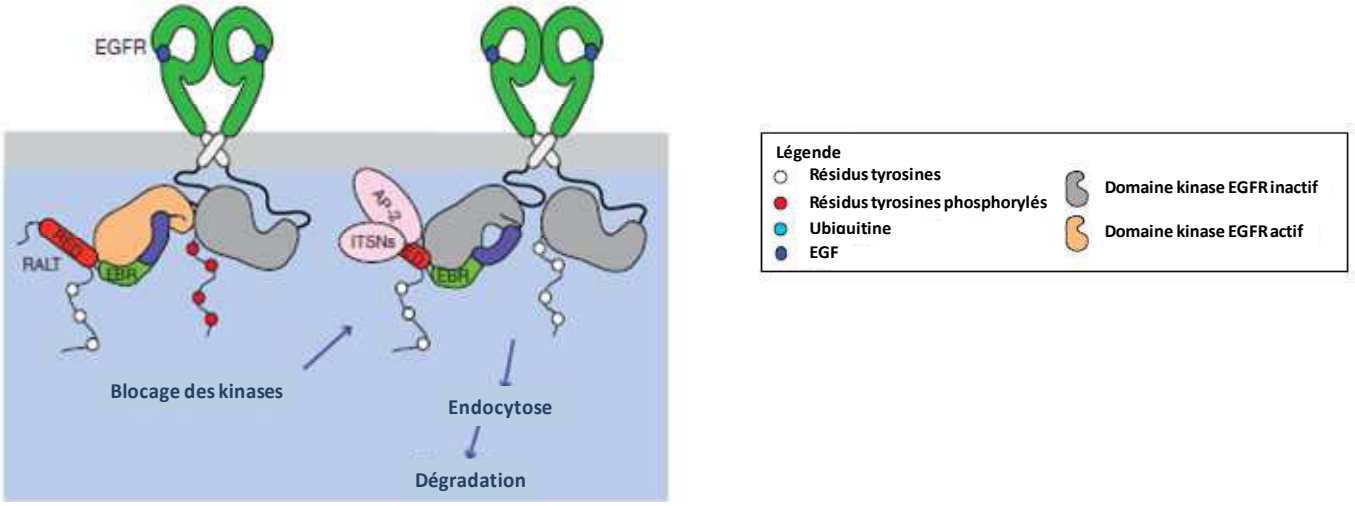


<u>Figure 24</u> : Mécanismes d'inhibition de EGFR par LRIG1, SOCS4 et SOCS5

A : Un premier mécanisme d'inhibition de EGFR par LRIG1 est sa liaison au récepteur, par les domaines riches en leucine et l'Ig-like, indépendamment de la fixation du ligand. Cela entraîne la dégradation de EGFR par un mécanisme encore mal défini. Le second mécanisme d'inhibition nécessite que le récepteur soit préalablement activé par fixation du ligand et la phosphorylation des résidus tyrosine. LRIG1 peut alors se fixer au récepteur et lier la protéine Cbl, elle-même fixée aux tyrosines, ce qui entraîne l'ubiquitinylation de EGFR et sa dégradation.

B : L'inhibition de EGFR par SOCS4 et SOCS5 se fait par liaison au récepteur par leurs domaines SH2 après activation ou non du récepteur. Il y aura alors recrutement d'une E3 ligase, ubiquitinylation et dégradation du récepteur.

(D'après (Segatto *et al.*, 2011)



<u>Figure 25</u> : Mécanisme d'inhibition de EGFR par RALT

RALT lie le récepteur EGFR activé par le ligand par son domaine EBR, inactivant ainsi l'activité kinase. Il y a alors recrutement de protéines d'endocytose par le domaine RED (AP-2 et ITSNs) entraînant la dégradation du récepteur.

(D'après (Segatto *et al.*, 2011)

Les analyses montrent qu'il y a une complémentarité dans les voies de signalisation conduisant à une compensation partielle suite au manque ou à la mutation d'un ligand ErbB sous la condition que les récepteurs ErbB soient exprimés **(tableau 3)** (Normanno *et al.*, 2006).

6. EGFR et oncogenèse

✓ Expression de EGFR dans les tumeurs

Le récepteur à l'EGF est d'expression ubiquitaire et se trouve à la surface de pratiquement toutes les cellules aussi bien normales que tumorales. Au niveau des tissus sains EGFR est fortement exprimé dans les épithélia. Il n'est donc pas surprenant que ce récepteur soit impliqué dans des tumeurs majoritairement épithéliales dans diverses tumeurs solides (Srinivasan & Jewell, 2001). Il est surexprimé dans des lésions malignes de la barrière épithéliale dans les cancers du poumon, du sein, de la vessie et de la prostate **(tableau 4)** (Franklin *et al.*, 2002; Leav *et al.*, 1998). Son rôle dans les cancers de la prostate sera abordé dans la partie 4 de ce chapitre. L'importance de EGFR dans les tumeurs est principalement due à une augmentation de son expression conduisant à une augmentation de son activité (Rubin Grandis *et al.*, 1996a; Rubin Grandis *et al.*, 1996b; Wong *et al.*, 1992).

✓ Augmentation de l'activité d'EGFR

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la dérégulation des fonctions de EGFR parmi lesquelles : (i) la surexpression du récepteur, (ii) l'amplification génique, (iii) les mutations activatrices et (iv) la diminution de sa dégradation.

La surexpression du récepteur par contrôle de l'activité transcriptionnelle

L'augmentation de l'expression de EGFR, par le biais d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle, est un des mécanismes majeurs mis en place par les cellules cancéreuses afin d'assurer leur survie et leur prolifération. Les mécanismes par lesquels l'activité transcriptionnelle est augmentée sont mal identifiés, cependant des études montrent que le facteur de transcription E2F1 ainsi que la protéine β-caténine seraient impliqués. Ainsi, une inactivation de E2F1 dans des cellules de mélanome entraîne une diminution d'expression de EGFR ainsi qu'une diminution des capacités invasives, de formation de tumeurs et de métastases de ces cellules. E2F1 serait donc un régulateur positif de l'activité transcriptionnelle de EGFR et permettrait d'accroître les capacités invasives et prolifératives des cellules tumorales (Alla *et al.*, 2009). La β-caténine est un acteur de la voie canonique Wnt impliquée, entre autre, dans le contrôle de la prolifération des cellules. Elle est dérégulée dans les cellules tumorales tout comme EGFR. L'activation de la β-caténine dans les

	Cible des mutations	Localisation des défauts de développement
Récepteurs ErbB	EGFR	Epiderme, glande mammaire, poumon, pancréas, intestins, système nerveux central
	ErbB2	Glande mammaire, cœur, système nerveux central
	ErbB3	Cœur, système nerveux central
	ErbB4	Glande mammaire, cœur, système nerveux central et périphérique
Ligands	EGF	Prostate, système nerveux central et périphérique
	TGFα	Epiderme, prostate, yeux
	HB-EGF	Système nerveux central
	AR/EGF/TGFα	Tractus gastro-intestinal

Tableau 3 : Récapitulatif des mutations des récepteurs ErbB ou de leurs ligands et les conséquences associées

Les récepteurs de la famille ErbB, ainsi que leurs ligands, sont important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et notamment dans le développement et la morphogenèse de plusieurs organes. Il est important de noter que les souris mutées pour des gènes codant les récepteurs développent des défauts au niveau de plusieurs organes conduisant à une mort embryonnaire ou périnatale, alors que des mutations dans les gènes codant pour les ligands n'entraînent pas de phénotype létaux.

(D'après (Normanno *et al.*, 2006)

Tumeurs	Pourcentage de surexpression de EGFR
Tête et cou	80-100
Sein	14-91
Rein	50-90
Poumon	40-80
Colon	25-77
Ovaires	35-70
Prostate	39-47
Gliomes	40-63
Pancréas	30-50
Vessie	31-48

Tableau 4 : Fréquence de surexpression de EGFR dans les tumeurs humaines

(D'après (Grandis & Sok, 2004)

cellules de prostate entraîne une augmentation d'expression de EGFR. Inversement, son inhibition conduit à la diminution de son expression. La β-caténine régule positivement l'activité transcriptionnelle de EGFR par fixation directe sur son promoteur ce qui entraîne une forte activation des voies de signalisation MAPK, PI3K/AKT et Jak/STAT3. Cela provoque une surexpression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL et des protéines de régulation du cycle cellulaire, cycline D1, A et E2 (Guturi *et al.*, 2012). Cette étude montre que la β-caténine est un régulateur transcriptionel de EGFR et des processus de prolifération et de survie dépendants de ce récepteur.

La surexpression par amplification génique

L'amplification du gène EGFR est retrouvée dans différents types de tumeurs. Dans les glioblastomes multiformes (GBM), stade avancé de gliomes, l'amplification de EGFR est fréquente puisqu'elle est présente dans 37 à 58% des cas (Normanno *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'amplification anormale du gène EGFR est fréquente dans les cellules de carcinomes (SCC : Squamous Cell Carcinoma), de cancers de la tête et du cou, de l'œsophage et du poumon (Nagatsuka *et al.*, 2001). L'analyse du nombre de copies génique dans des échantillons de stades différents de SCC (dysplasies épithéliales (ED), carcinome *in situ* (CIS), stades avancés), met en évidence que le gène est peu amplifié dans les stades précoces (ED et CIS) et que le niveau d'amplification croît avec la malignité de la tumeur. Ces résultats suggèrent donc que l'amplification de EGFR peut être associée à un mauvais pronostic (Nagatsuka *et al.*, 2001) et la recherche du nombre de copies de ce gène pourrait servir d'outil de diagnostic.

Les mutations activatrices

Des délétions dans le gène EGFR ont été mises en évidence dans les glioblastomes (Kuan *et al.*, 2001). Dans plus de 50% des cas, elles affectent le variant EGFRvIII. Il s'agit de délétions des exons 2 à 7 codant pour une partie du domaine extracellulaire du récepteur incluant le site de fixation du ligand. L'EGFRvIII est donc actif de manière constitutive (Kuan *et al.*, 2001) et cette mutation est indicatrice d'un pronostic de faible survie pour les patients (Shinojima *et al.*, 2003). Il a également été mis en évidence des mutations activatrices dans le domaine tyrosine kinase du récepteur entraînant une augmentation de son activité en réponse à un apport EGF dans les cancers bronchiques non à petites cellules (Lynch *et al.*, 2004). Les patients atteints de cancer avec cette mutation du gène EGFR ont un taux de réponse au traitement par des inhibiteurs de tyrosine kinase de EGFR (gefitinib, erlotinib) augmenté. En revanche, cette mutation est quelque fois associée à une seconde mutation (substitution d'acide aminé dans le domaine kinase) entraînant une résistance de EGFR au traitement par la gefitinib (Kobayashi *et al.*, 2005).

Diminution de la dégradation de EGFR

La régulation de l'activité de EGFR se fait en grande partie par une dégradation après ubiquitinylation du récepteur par la protéine Cbl. Dans certains cas et notamment dans le cas de cancers, cette protéine n'est pas exprimée ou présente sous sa forme mutée v-Cbl (variant oncogénique inactif de Cbl) ce qui bloque la dégradation du récepteur et conduit à son recyclage à la membrane. De plus, nous avons vu que la tyrosine 1045 de EGFR est nécessaire pour sa reconnaissance par Cbl. Une mutation affectant cette tyrosine serait donc susceptible d'inhiber la dégradation de EGFR et ainsi conduire à une potentialisation de son activité.

b. EGF et mobilité cellulaire dans le processus d'invasion tumorale

Un des mécanismes important dans la progression tumorale est la mise en place de capacités de migration et d'invasion accrues par les cellules pour envahir la zone tumorale et produire des métastases. L'EGF, en association avec EGFR, est un acteur clé dans l'acquisition de ces capacités dans diverses tumeurs et les mécanismes par lesquelles il exerce son activité sont variés.

Les études sur l'implication de la voie EGF/EGFR dans l'invasion des cellules tumorales font suite aux corrélations observées entre les niveaux d'accumulation de EGFR et de son ligand et les capacités invasives des cellules cancéreuses. Brièvement, le processus invasif se déroule en plusieurs étapes, les cellules tumorales doivent acquérir les capacités (i) à reconnaître la matrice extracellulaire, (ii) à modifier cette matrice par dégradation protéolytique, cette étape fait intervenir des modifications d'expressions de métalloprotéinases (MMPs) ayant la capacité de cliver les protéines composant la matrice, (iii) à migrer à travers la matrice en cours de dégradation et (iv) à proliférer sur un site adjacent en dehors des limites physiologiques (métastases) (Wells *et al.*, 2002). Associées à une surexpression de EGFR et EGF dans les tumeurs il y a également des modifications d'expression de marqueurs d'adhésion (E-cadherine et N-cadherine) caractéristiques d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et une surexpression des MMPs dans un grand nombre de tissus cancéreux en corrélation avec le processus invasif (Eriksen *et al.*, 2004; Libra *et al.*, 2009). Ces données suggèrent donc que la signalisation EGF/EGFR pourrait être impliquée dans les modifications d'expressions des acteurs de l'invasion et ainsi contribuer à l'invasion des cellules tumorales. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de cette signalisation dans les cancers de la tête et du cou, les glioblastomes, les cancers du sein et de la prostate. Dans les cellules tumorales de

glioblastomes, la signalisation EGFR est impliquée dans l'augmentation d'expression de MMP1 suite à l'activation de la voie de signalisation MAPK, ce qui provoque une augmentation de l'invasion cellulaire des cellules de glioblastomes (Anand *et al.*, 2011). Le même type de résultat à été montré dans des cellules tumorales de sein. Un traitement des cellules par EGF ou TGFα entraîne une activation de la signalisation EGFR qui se traduit par une activation de ERK1/2, provoquant l'augmentation d'expression de MMP1 (Park *et al.*, 2011). Enfin, une étude *in vitro* sur des cellules de carcinomes de la tête et du cou met en évidence que l'activation du récepteur par EGF entraîne une augmentation de l'expression de la métalloprotéinase MMP9 *via* une activation des voies PI3K et ERK1/2. Cette activation provoque également une EMT caractéristique d'une progression tumorale vers un stade métastatique agressif. Ces modifications d'expression permettent, *in fine*, d'augmenter les capacités migratoires et invasives des cellules de carcinome (Zuo *et al.*, 2011).

4) Implication de la transduction initiée par le complexe EGF/EGFR dans le cancer de la prostate

Comme il vient d'être décrit dans d'autres tumeurs solides, la progression du cancer de la prostate s'accompagne de modifications d'expression des facteurs de croissance et de leurs récepteurs. C'est notamment le cas pour EGF et EGFR. Il peut s'agir de régulations positives ou négatives des niveaux d'expression, mais également le passage d'un mode de régulation paracrine vers un mode de régulation autocrine conduisant à l'augmentation d'activité des voies de signalisation dépendantes de EGFR qui favorisent la croissance tumorale et l'invasion.

a. Dérégulation de EGF dans le cancer de la prostate et ses conséquences

Dans une prostate saine, l'EGF est exprimé et sécrété par les cellules stromales et va agir au niveau des cellules épithéliales qui expriment le récepteur EGFR, de manière paracrine (Freeman *et al.*, 1998). La signalisation dépendante de EGFR est finement régulée par le contrôle des niveaux d'expression et d'activité de EGFR, comme il a été décrit dans la partie 3-b-4 de ce chapitre. Dans le cas d'un cancer de la prostate, l'expression et l'activité de EGF et de son récepteur sont fortement

dérégulées. Des études montrent : (i) une augmentation de l'expression et de la sécrétion EGF par les cellules tumorales, (ii) une augmentation de l'expression de EGFR dans les tumeurs et (iii) une augmentation de la croissance des cellules tumorales lors d'un apport EGF (Djakiew, 2000). La régulation paracrine dans les cellules normales va être remplacée par un mode de régulation autocrine au niveau des cellules tumorales. Ce passage permet aux cellules épithéliales cancéreuses d'avoir la capacité de synthèse de EGF et d'autoactivation de la signalisation dépendante de EGFR indépendamment du contexte environnemental et de toute régulation. On parle de boucle d'autorégulation (ou autocrine) dépendante de EGF. Il est alors constaté une augmentation de l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK. Une étude clinique a montré que l'activité de ERK1/2 était augmentée en fonction du score de Gleason, ainsi que dans les tumeurs résistantes à la castration (Gioeli *et al.*, 1999). Ce mode de régulation permet d'augmenter le potentiel de croissance des cellules, d'assurer leur survie et ainsi de favoriser le développement tumoral (De Bellis *et al.*, 1996; De Miguel *et al.*, 1999). Il se traduit également par la stimulation des capacités invasives des cellules cancéreuses de prostate (Freeman *et al.*, 1998) et il est généralement retrouvé lors de la progression des cancers vers un stade métastatique (Glynne-Jones *et al.*, 1996).

Dans le cas particulier de la prostate, la cascade de signalisation mise en place par l'activation de EGFR peut interférer avec la cascade impliquant le récepteur des androgènes.

b. EGF et AR dans le cancer de la prostate

Plusieurs analyses mettent ainsi en évidence une régulation de la signalisation EGFR par le récepteur des androgènes et inversement, un contrôle de l'activité du récepteur des androgènes par EGF.

1. Régulation de la signalisation dépendante de EGFR par le récepteur des androgènes

Le gène codant EGFR fait partir des gènes cibles régulés par le récepteur des androgènes dans le tissu prostatique sain. En effet, des études *in vivo* ont montré que la castration d'animaux adultes entraîne une augmentation d'expression de la protéine EGFR au sein de la prostate (Traish & Wotiz, 1987), réponse spécifique aux androgènes car d'autres stéroïdes comme les œstrogènes ou la progestérone n'ont aucun effet. Corrélativement, une supplémentation androgénique chez ces mêmes animaux conduit à une diminution d'expression de EGFR, associée à une diminution de la

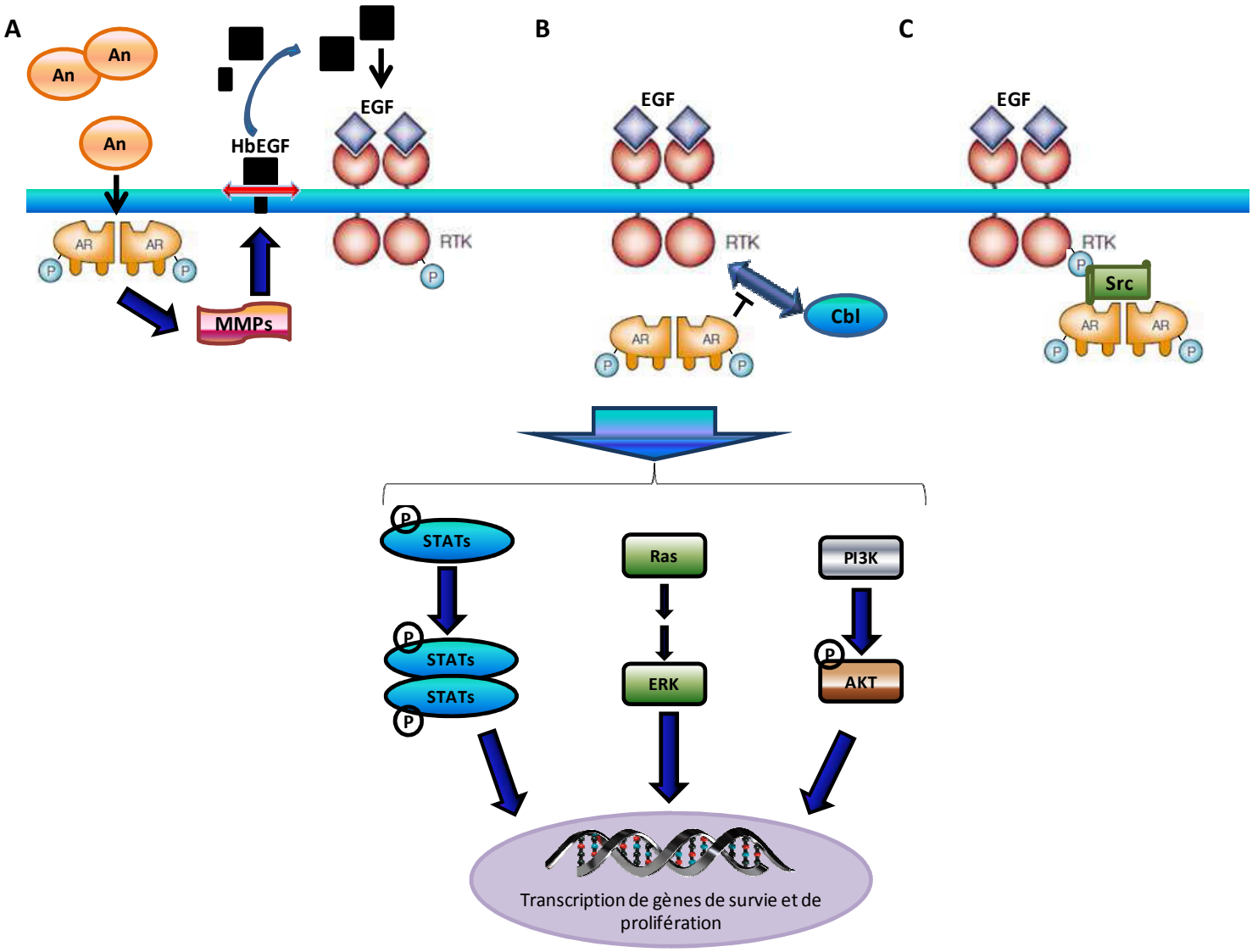


Figure 26 : Régulation de la signalisation EGFR par le récepteur des androgènes

A : En présence d'androgènes, le récepteur des androgènes active l'expression des MMPs qui permettent le clivage de la forme membranaire d'EGF (HbEGF), l'activation de EGFR et des voies de survie et de prolifération cellulaire.

B, C : En absence d'androgènes, le récepteur peut soit se lier directement aux résidues tyrosines phosphorylés de EGFR et inhibiber sa dégradation, soit lier la protéine kinase adaptatrice Src, pour activer les voies de signalisation dépendante du récepteur.

prolifération et à une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales de prostate saines (Hammarsten *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que les androgènes régulent négativement l'expression de EGFR prévenant ainsi une croissance excessive des cellules de prostate dans le tissu sain. Dans le cas de cancer, il y a une augmentation de l'activité de EGFR par le récepteur des androgènes, corrélée à une augmentation de la prolifération des cellules (Liu *et al.*, 1993) . Cependant, l'analyse de biopsies prostatiques montre que l'expression de EGFR augmente également avec la mise en place d'une insensibilité aux androgènes (Shah *et al.*, 2006). Cela suggère que cette voie de signalisation peut participer à la mise en place de la carcinogenèse prostatique tant dans les phases de progression hormono-dépendantes que dans les phases d'échappement résistantes à la castration.

Les travaux de Bonaccorsi et ses collaborateurs ont mis en évidence que le récepteur des androgènes au niveau du cytoplasme co-localise avec EGFR à la membrane (Bonaccorsi *et al.*, 2004a; Bonaccorsi *et al.*, 2004b), ce qui permettrait d'expliquer la régulation de EGFR par AR. L'activation ligand-dépendant de AR conduit à l'activation de métalloprotéinases. Ces enzymes clivent ensuite la fraction EGF liée à la membrane (HbEGF) et libèrent la forme soluble qui peut se lier à EGFR, favorisant ainsi la prolifération et la croissance tumorale **(figure 26A)** (Sen *et al.*, 2012). Ce mécanisme d'activation dépendant de AR est à la fois présent dans les cellules saines et les cellules tumorales de prostate. Dans le cas d'une activation de AR, indépendante du ligand, deux mécanismes sont décrits. Tout d'abord, AR peut se fixer au niveau des résidus tyrosines, ce qui masque le motif d'interaction pour la liaison de la protéine Cbl sur EGFR, empêche sa régulation par dégradation laissant ainsi le récepteur sous forme active **(figure 26B)** (Willmarth *et al.*, 2009). Ensuite, comme il a été décrit, la phosphorylation de EGFR permet la liaison de protéines adaptatrices. Ainsi, la liaison de la protéine kinase Src va permettre le recrutement du récepteur des androgènes (Migliaccio *et al.*, 2005) **(figure 26C)**. La fixation directe de AR sur EGFR ainsi que la formation du complexe EGFR/Src/AR qui entraîne l'activation des voies de signalisation dépendantes de EGFR afin de favoriser les processus de croissance, de prolifération et d'invasion des cellules tumorales de prostate.

2. Régulation du récepteur des androgènes et de sa transactivation par EGF

Comme il a été décrit dans le chapitre 1, la survie cellulaire dans les phases d'échappement hormonal s'explique par le maintien de l'activité du récepteur des androgènes indépendamment de la présence du ligand. Plusieurs études rapportent que EGF et la stimulation des voies de signalisation associées augmentent les capacités transactivatrices de AR **(figure 27)**

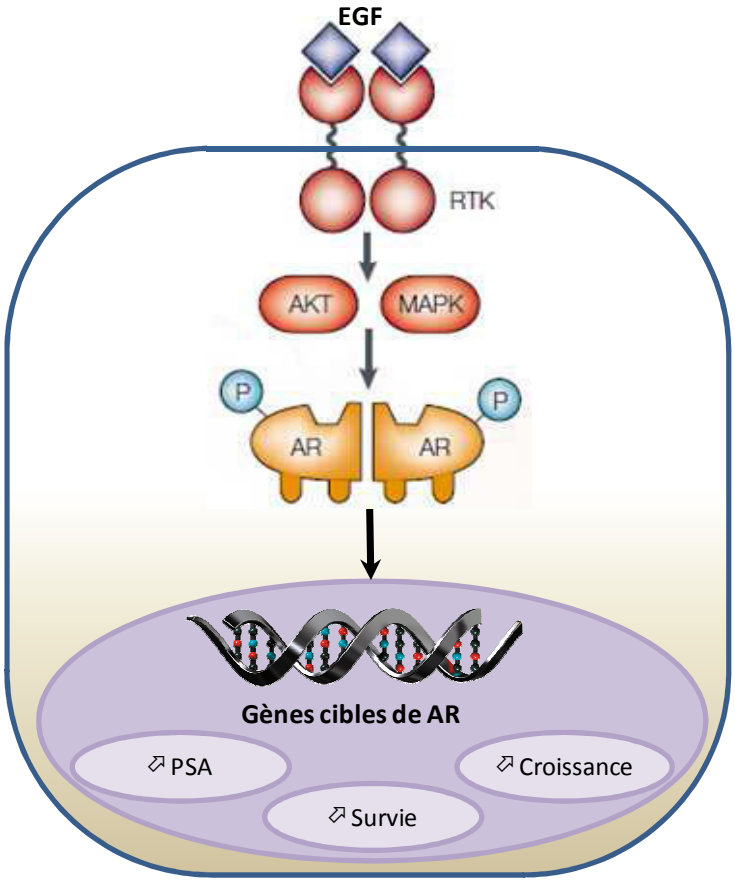


Figure 27 : Activation de la transcription dépendante de AR en absence d'androgènes

L'activation classique du récepteur des androgènes se fait suite à la fixation d'androgènes tels que la DHT sur AR conduisant à l'activation de ces gènes cibles. En absence d'androgènes, EGFR peut activer AR par phosphorylation par AKT ou les acteurs de la voie MAPK et l'activation de la transcription de ces gènes cibles impliqués dans la survie et la croissance cellulaire.

(D'après (Feldman & Feldman, 2001)

(Culig *et al.*, 1994; Feldman & Feldman, 2001). La reprise de croissance des cancers de la prostate peut également être expliquée par une augmentation de l'expression de co-activateurs de AR. Gregory et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation d'expression de TIF2 et GRIP1, co-activateurs de AR, *in vitro*, suite à l'apport exogène de EGF. Cela entraîne aussi l'activation de la kinase MAPK, permettant la phosphorylation des co-activateurs et l'augmentation de l'activité de AR dépendante des androgènes (Gregory *et al.*, 2004). Les cellules tumorales de prostate adoptent des mécanismes de prolifération alternatifs, indépendant des androgènes mais qui nécessitent toujours l'activation de AR et qui sont plus sensibles à la présence des facteurs de croissance comme EGF (Bennett *et al.*, 2010; Culig *et al.*, 1994).

Chapitre 3 : La protéine chaperonne Nucléophosmine

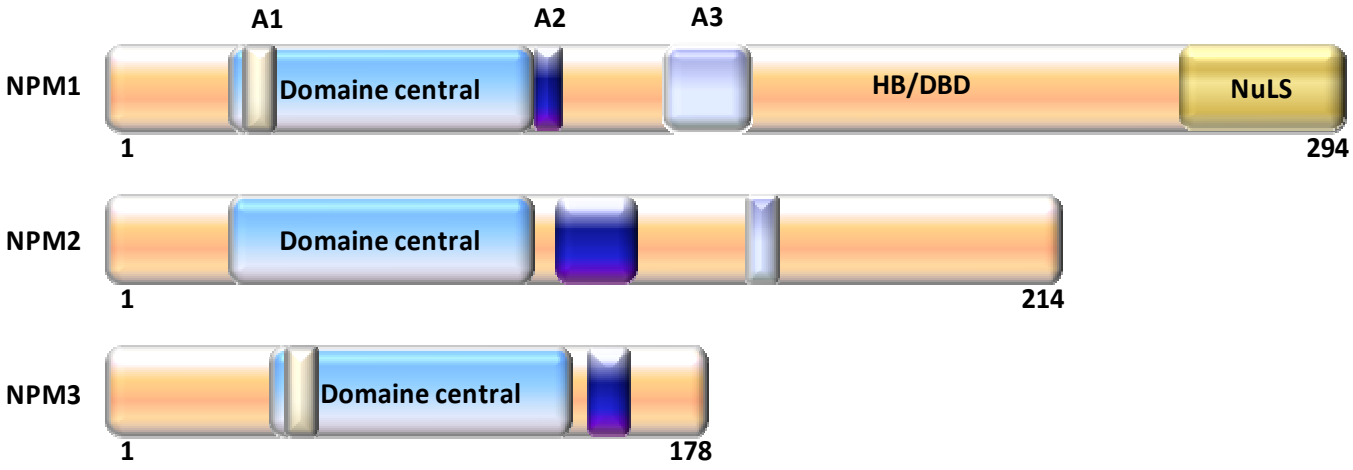
1) Généralités

La nucléophosmine (NPM1), également appelée B23 ou numatrin, a en premier lieu été identifiée comme une phosphoprotéine nucléolaire (Chang *et al.*, 1988). Elle est caractérisée comme une protéine chaperonne d'histones car elle appartient à un groupe de chaperonnes moléculaires capables de lier les histones avec spécificité et sélectivité et ainsi participer au remodelage chromatinien. Cette protéine est également impliquée dans divers processus cellulaires tels que la stabilité du génome, la biogenèse des ribosomes mais aussi la régulation du cycle cellulaire et la prolifération. Comme c'est le cas pour beaucoup de protéines multifonctionnelles la dérégulation de l'expression et de la régulation de NPM1 est impliquée dans les processus cancéreux.

2) La famille Nucléophosmine/Nucléoplasmine

a. Membres de la famille

La protéine NPM1 appartient à la superfamille des protéines Nucléophosmine/Nucléoplasmine dont les membres sont retrouvés dans tout le règne animal. Cette famille est divisée en quatre groupes qui sont NPM1, NPM2, NPM3 et une forme NPM-like spécifique des invertébrés (Frehlick *et al.*, 2007). Ces protéines sont codées par trois gènes différents localisés, chez l'homme, sur les chromosomes 5q35.1 pour NPM1, 8p21.3 pour NPM2 et 10q24.31 pour NPM3 (Flicek *et al.*, 2012). NPM2 a été isolée à partir d'œufs et d'ovocytes chez *Xenopus laevis*, dans lesquels elle représente la protéine nucléaire la plus abondante (Mills *et al.*, 1980). Il semblerait que cette accumulation nucléaire soit restreinte aux ovocytes où NPM2 permet de lier les protéines basiques spermatiques (SNBP : Sperm Nuclear Binding Protein) tels que les protamines, puis de décondenser la chromatine paternelle après fertilisation de l'ovocyte par le spermatozoïde (Philpott & Leno, 1992). NPM2 a donc un rôle important pour la fertilisation mais son invalidation génique, chez la souris, n'affecte ni la viabilité de la descendance, ni la décondensation de la chromatine spermatique, ce qui suppose



<u>Figure 28:</u> Représentation schématique de la structure des protéines de la famille NPM

Bien que fortement similaires, les protéines NPM diffèrent par leur taille, la présence des domaines HD/DBD et NuLS.

A1, A2 et A3 : domaines acides,

HD/DBD : domaine d'hétérodimérisation et domaine de liaison à l'ADN

NuLS : signal de localisation nucléolaire

(D'après (Lindstrom, 2011)

qu'elle exerce ce rôle en synergie avec d'autres protéines. En revanche, les femelles NPM2 -/- présentent une diminution de leur fertilité, du fait d'une désorganisation du nucléole et une perte des régions hétérochromatiques dans les ovocytes (Burns *et al.*, 2003). En ce qui concerne la protéine NPM3 peu d'informations sont disponibles. Toutefois, elle est capable de lier les histones et d'avoir un effet régulateur sur la transcription sans posséder de réelles fonctions chaperonnes intrinsèques (Gadad *et al.*, 2010; Motoi *et al.*, 2008). Son expression est néanmoins importante puisqu'elle forme un complexe avec NPM1 et participe ainsi à la régulation de sa fonction dans la biogenèse des ribosomes (Huang *et al.*, 2005). Qui plus est, l'inhibition de son expression dans les ovocytes de mammifères empêche la décondensation de la chromatine du gamète paternel (McLay & Clarke, 2003). NPM3 semble donc partager des fonctions communes avec NPM1.

NPM1 est la protéine la plus étudiée au sein de la famille nucléophosmine/nucléoplasmine compte tenu de sa forte expression et de ses altérations géniques dans les pathologies cancéreuses, ce qui lui attribue un rôle important (Grisendi *et al.*, 2006).

b. Conservation au cours de l'évolution

Le gène NPM1 code pour 3 protéines de 294, 259 et 265 acides aminés suite à un épissage alternatif. Les gènes NPM2 et NPM3 sont également transcrits et traduits pour donner naissance à des protéines de respectivement 214 et 178 acides aminés, alors que le gène codant pour la protéine NPM-like se compose de seulement 3 exons à la fois chez les vertébrés et la drosophile. Bien que produites par 3 gènes différents, les protéines NPM1, NPM2 et NPM3 possèdent des domaines similaires et des domaines qui diffèrent. La protéine NPM2 diffère de NPM1 par la perte du signal de localisation nucléolaire (NuLS) qui lui permet d'être majoritairement exprimée à haut niveau dans le nucléole. Le gène NPM3 code quant à lui pour une protéine dépourvue d'un segment interne retrouvé dans la moitié carboxy-terminale de NPM1 et NPM2 **(figure 28)** (Lindstrom, 2011). Le gène NPM1 localisé sur le chromosome génère 3 variants d'épissage alternatif à partir d'une région codante de 12 exons qui varie uniquement dans les 35 derniers acides aminés (Chang & Olson, 1990).

L'analyse de l'évolution des protéines NPM montre que les membres de cette famille ont suivi un processus de sélection et de diversification structurelle. L'étude de l'arbre phylogénétique, reconstitué à partir de 106 séquences NPM, montre que NPM1 a une origine monophylétique, alors que les protéines NPM2 et NPM3 auraient une origine polyphylétique après une divergence entre les mammifères et les amphibiens (Eirin-Lopez *et al.*, 2006). De plus, il semblerait que la différenciation des protéines NPM1 et NPM3 ait eu lieu de manière tardive par rapport à la différenciation de NPM2

puis de NPM-like, ceci expliquant sans doute les similarités de fonctions observées entre NPM1 et NPM3. Il a également été observé que le processus de différenciation donnant « naissance » aux trois protéines NPM chez les vertébrés est absent chez les invertébrés sauf au niveau de la protéine NPM-like.

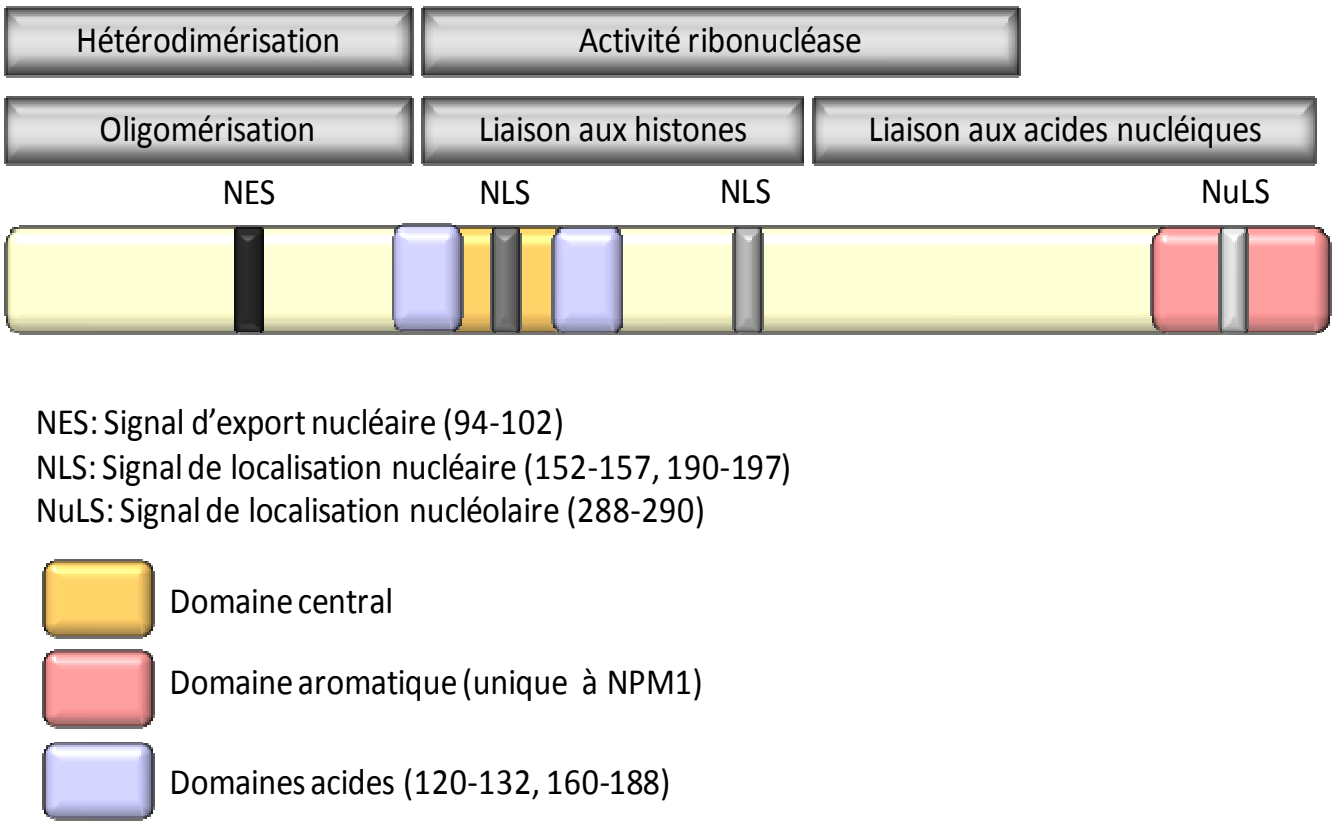
L'évolution des différents membres de la famille de protéines NPM a également conservé des similarités au niveau protéique, et plus particulièrement au niveau des séquences en acides aminés, en faveur du maintien d'une forte fréquence de résidus acides (glutamiques et aspartiques) dans les domaines A1, A2 et A3. Il y a également une conservation de la structure tertiaire des protéines et de l'organisation de leurs domaines **(figure 28)**. Cela laisse supposer l'existence d'une sélection qui favorise le maintien de fonctions spécifiques. De manière brève, les protéines NPM sont toutes organisées de la manière suivante : un domaine central et des signaux de localisation spécifiques. Malgré quelques différences, on remarque que toutes les protéines ont un domaine de localisation nucléaire (NLS), mais que seule la protéine NPM1 possède un domaine d'export nucléaire (NES) et un domaine de localisation nucléolaire (NuLS). Le domaine le plus conservé entre les trois protéines, dans la partie amino-terminale, est impliqué dans la résistance aux protéases et contient un court domaine acide A1 responsable de l'oligomérisation des protéines NPM et de leurs activités chaperonnes. La région en C-terminale contient les domaines A2 et A3, variables entre les différents membres, impliqués dans l'interaction avec d'autres protéines **(figure 28)**.

c. Organisation structurelle et fonctionnelle de NPM1

1. Structure et domaines fonctionnels

Parmi les membres de la famille, la protéine NPM1 est la plus étudiée. Elle a tout d'abord été identifiée pour ses capacités à réguler la maturation des ARN ribosomaux. Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire à l'intérieur de la cellule, à la fois dans le nucléole, le noyau et le cytoplasme et possède la capacité de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Savkur & Olson, 1998). L'isoforme NPM1.1, renommée par la suite NPM1, est la forme la plus abondante et possède une localisation majoritairement nucléolaire. La protéine NPM1.2 est localisée dans le noyau et le cytoplasme (Wang *et al.*, 1993).

La protéine NPM1 est une protéine multidomaines comprenant dans sa région hydrophobe amino-terminale un domaine d'oligomérisation très conservé au cours de l'évolution. Il lui permet de



<u>Figure 29</u> : Organisation structurelle et fonctionnelle des domaines constituants la protéine NPM1

Sur la protéine NPM1, la partie N-terminale est caractérisée par un domaine non polaire responsable de l'oligomérisation et l'hétérodimérisation qui contient le signal d'export nucléaire (NES) fonctionnel. La portion centrale de la protéine contient 2 domaines acides (A) importants pour la liaison aux histones, et un signal de localisation nucléaire bipartite (NLS); cette région confère l'activité ribonuclease. L'extrémité C-terminale de la protéine possède une activité ribonucléase et contient des régions basiques impliquées dans la liaison aux acides nucléiques. Enfin, il est suivi par un domaine aromatique spécifique de l'isoforme 1 qui contient 2 résidus tryptophane (288 et 290) nécessaires à la localisation nucléolaire de la protéine (NuLS).

(D'après (Falini *et al.*, 2007; Grisendi *et al.*, 2006)

se lier à d'autres protéines par des interactions apolaires, ce qui lui confère des propriétés thermostables, indispensables pour son activité de chaperonne moléculaire. En effet, cette propriété lui permet d'empêcher le repliement et l'agrégation de ces protéines cibles à de fortes températures (Hingorani *et al.*, 2000). Ce domaine contient également un signal d'export nucléaire (NES), riche en leucine, au niveau des acides aminés 42 et 49. Ces résidus vont être la cible du récepteur d'export nucléaire CRM1 (chromosome maintenance region 1) (Wang *et al.*, 2005). Ce domaine N-terminal est suivi de régions acides, dans la portion centrale de la protéine, requise pour une liaison aux histones et un assemblage efficace des nucléosomes (Okuwaki *et al.*, 2001a). Les fonctions biologiques de ces régions acides sont peu connues, mais il semblerait qu'elles aient un rôle crucial dans la neutralisation des charges positives des protéines basiques telles que les histones et les protéines ribosomales du nucléole (Samad *et al.*, 2007). De plus, ce domaine central est important dans l'activité ribonucléasique de NPM1 en synergie avec les segments basiques du domaine carboxy-terminal. Enfin, il contient la séquence de localisation nucléaire (NLS). Dans la partie C-terminale de la protéine se trouve le domaine de liaison aux acides nucléiques, ainsi que deux résidus tryptophanes en position 288 et 290 qui composent le signal de localisation nucléolaire (NuLS) **(figure 29)** (Nishimura *et al.*, 2002).

NPM1 est présente de manière prédominante sous forme d'hexamères, mais elle peut également exister sous forme monomérique (Umekawa *et al.*, 1993). La diminution de la capacité de NPM1 à lier l'ADN après oligomérisation met en évidence que la balance entre les formes monomériques et hexamériques régule de manière importante les fonctions de NPM1. Par exemple, son hétérodimérisation avec le variant NPM1.2 inhibe la liaison de NPM1 sur les ARN, suggérant un rôle inhibiteur de NPM1.2 sur certaines fonctions de NPM1 (Okuwaki *et al.*, 2002; Zirwes *et al.*, 1997). De nombreux résidus sont également les cibles de modifications post-traductionnelles qui régulent les fonctions de la protéine.

2. Modifications post-traductionnelles de NPM1

Parmi ces modifications, peuvent être citées les phosphorylations, l'ubiquitinylation et la sumoylation.

Il existe plusieurs sites de phosphorylation sur la protéine NPM1 : les thréonines (T) 95, 199, 219, 234 et 237 et les sérines (S) 4, 70, 125 et 254. Ces différents sites sont la cible de kinases dépendantes des cyclines (Cdk : Cyclin dependant kinase) ou non (Gjerset, 2006; Okuda *et al.*, 2000; Tokuyama *et al.*, 2001). Le complexe cyclineE/cdk2 phosphoryle la T199 au cours de la phase G1 du

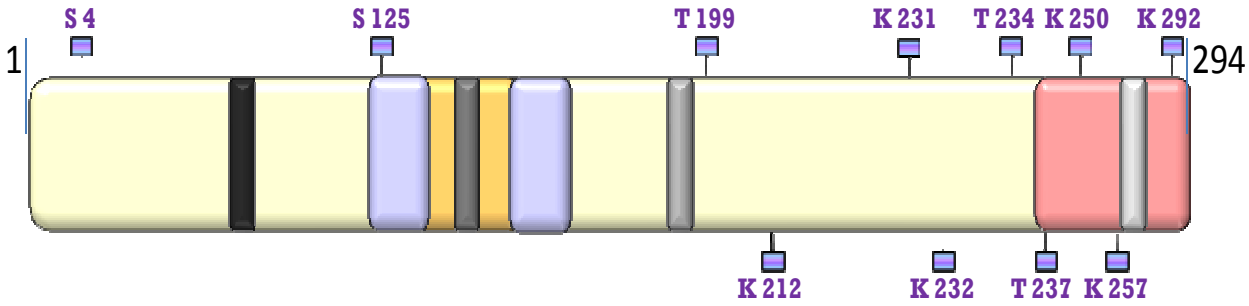


Figure 30 : Sites de phosphorylation et d'acétylation de NPM1

(D'après (Okuwaki, 2008)

Résidus	Protéines effectrices	Conséquences sur l'activité de NPM1
Sérine 4	Plk1	Participation à la duplication des centrosomes
Sérine 125	CK2	Détachement du substrat, Stabilité de NPM1
Thréonine 199	Cycline E/Cdk 2	Dissociation de NPM1 aux centrosomes
Thréonines 234-237	Cycline B/cdc 2	Ré-adressage de NPM1 vers les centrosomes
Lysines 212, 232, 250, 257, 232	p300	Remodelage de la chromatine par liaison aux histones acétylés et initiation de la transcription

Tableau 5 : Effet des modifications post-traductionnelles sur l'activité de NPM1

La phosphorylation ou l'acétylation de plusieurs résidus de NPM1 sont importants pour la régulation de ses diverses activités. Plk1, Polo-like kinase 1; CK2, Caseine Kinase 2; CDK2, Cyclin Dependant Kinase 2; cdc2, cell division control 2.

(D'après (Okuwaki, 2008)

cycle cellulaire, régulant ainsi la duplication des centrosomes (Okuwaki, 2008). La phosphorylation, par cdc2 des T199, 219, 234 et 237 régule la capacité de liaison de NPM1 sur l'ARN (Okuwaki *et al.*, 2002). Enfin, la phosphorylation de la thréonine 95 régule la localisation de NPM1 et son rôle dans la duplication des centrosomes (Wang *et al.*, 2005). La sérine 4 est phosphorylée par la protéine kinase Plk1 (Polo-like kinase 1) et est impliquée dans le processus mitotique (Zhang *et al.*, 2004). La sérine 125 est, quant à elle, la cible de CK2 (Caséine Kinase 2) pendant l'interphase et permet à NPM1 de maintenir la structure nucléolaire (Louvet *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). Enfin, les kinases responsables de la phosphorylation des sérines 70 et 254, ainsi que les conséquences de cette phosphorylation, ne sont pas clairement identifiées (Nousiainen *et al.*, 2006). La kinase Nek2A qui s'associe directement avec NPM1 pour permettre sa localisation au niveau du fuseau mitotique est un candidat potentiel (Yao *et al.*, 2004).

Outre la phosphorylation, NPM1 peut également subir d'autres modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitinylation (Sato *et al.*, 2004), la sumoylation (Tago *et al.*, 2005) et l'acétylation (Swaminathan *et al.*, 2005). Deux types de poly-ubiquitinylation de NPM1 sont décrits dans la littérature. Elle peut être la cible du complexe BRCA1-BARD1 (Breast Cancer 1-associated ring domain 1) (Sato *et al.*, 2004) et des suppresseurs de tumeurs p14ARF/p19Arf (Itahana *et al.*, 2003). Ces interactions entraînent une accessibilité de NPM1 aux E3-ligases qui assurent la poly-ubiquitinylation, conduisant NPM1 à la dégradation par le protéasome. Ces chaines poly-ubiquitinylées peuvent être retirées par la protéine USP36 pour permettre à NPM1 d'exercer ses fonctions (Endo *et al.*, 2009). Contrairement à la conjugaison d'ubiquitine qui affecte la stabilité de NPM1, sa sumoylation sur les résidus lysines (K) 230/263 régule sa localisation cellulaire. Elle est dépendante de l'expression de ARF qui favorise l'interaction de NPM1 avec la protéine SUMO-1 (Small Ubiquitin-related MOdifier-1). En effet, la substitution de ces résidus entraîne la délocalisation de NPM1 hors du nucléole et conduit à une duplication précoce des centrosomes et à la création d'instabilités chromosomiques (Liu *et al.*, 2007b). Le résidu K230 tout comme les résidus lysines 212, 215, 229, 257, 267 et 292 est la cible d'acétylation. Celle-ci est assurée par la protéine p300 dans la partie C-terminale de NPM1. Elle conduit à une augmentation de son affinité pour les cores d'histones et stimule son activité chaperonne (Swaminathan *et al.*, 2005). La déacétylation se fait par la protéine SIRT1, une protéine HDAC (Histone DeACetylace), qui retire les groupements acétyles de NPM1 **(figure 30)** (Shandilya *et al.*, 2009).

Les différents profils de modifications post-traductionnelles de NPM1 sont associés à ses multiples fonctions comme la biogenèse des ribosomes, la prolifération, la progression du cycle cellulaire ou encore la régulation de la compaction de la chromatine.

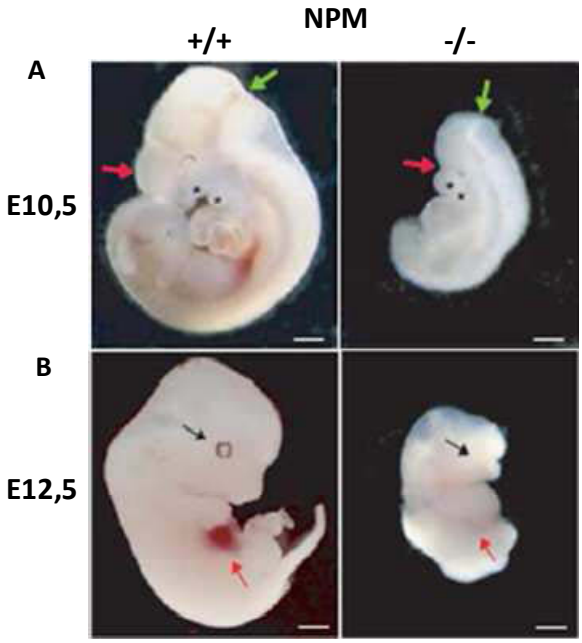


Figure 31 : Effet de l'inactivation génique de *npm1* sur le développement embryonnaire

A : Embryons de 10.5 jours montant une déficience de l'organogenèse du cerveau antérieur. L'invalidation de *npm1* provoque l'absence du pro-encéphale (flèche rouge), ainsi qu'une division entre le métencéphale et le mésencéphale retrouvé en position antérieur (flèche verte).

B : Embryons de 12.5 jours pour lesquels l'invalidation de *npm1* altère la formation du foie fœtal, (flèche rouge), ainsi que des yeux (flèche noire)

(D'après (Grisendi *et al.*, 2005)

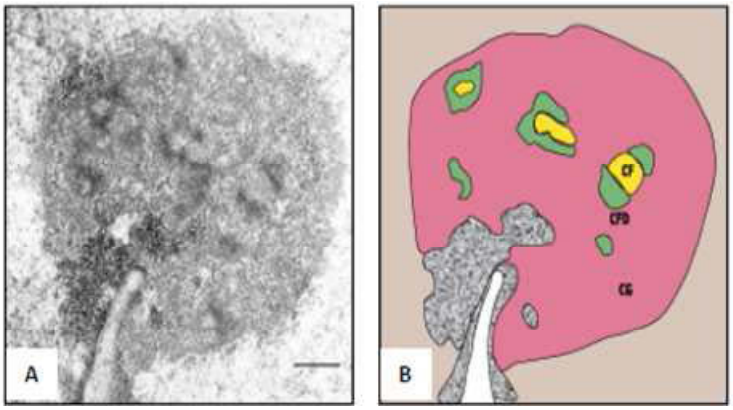


Figure 32 : Structure du nucléole

A. Organisation du nucléole observée en microscopie électronique à transmission

B. Représentation schématique de la photo de microscopie. Sur cette coupe fine, on distingue plusieurs centres fibrillaires (CF, jaune) entourés d'un composant fibrillaire dense (CFD, vert). Ces structures sont enchâssées dans le composant granulaire (CG, rose). Le contact entre nucléole et enveloppe nucléaire formant une invagination est visible sur la partie inférieure de l'image (blanc). La chromatine condensée est figurée en gris moucheté.

(D'après (Hernandez-Verdun & Louvet, 2004)

3) Les fonctions physiologiques de NPM1

a. Rôle de NPM1 dans le développement embryonnaire

Les premières analyses *in vivo* chez la souris ont consisté en l'invalidation du gène *npm1*, par remplacement des exons 1 à 7 de la séquence codante par la séquence de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) dans des cellules souches embryonnaires (Grisendi *et al.*, 2005). Ces analyses ont permis de mettre en évidence que NPM1 est indispensable au développement embryonnaire. En effet, les embryons invalidés (*npm1 -/-*) sont létaux entre les jours embryonnaires 11.5 et 12.5. Les embryons hétérozygotes ont eux un développement fœtal complet, sont viables à la naissance mais meurent au bout de quelques jours. L'analyse morphologique des embryons *npm1 -/-* révèle la présence d'organes vitaux normaux, comme le cœur et le tube neural permettant la formation du système nerveux, les arcs branchiaux et les bourgeons de membres. Ces embryons ont, malgré tout, une taille visiblement plus petite que les embryons sauvages ou hétérozygotes, ainsi qu'une structure de placenta plus petite. Il semble que la létalité des embryons *npm1 -/-* résulte d'une déficience de l'organogenèse du cerveau antérieur **(figure 31)** et des déficiences dans l'approvisionnement sanguin du sac vitellin, permettant la nutrition de l'embryon. Le nombre d'îlots sanguins, sièges du début de l'hématopoïèse, est diminué et la quantité de précurseurs de l'hématopoïèse présents dans ces îlots est fortement réduite, de même que leurs capacités à se différencier en divers lignages cellulaires (Grisendi *et al.*, 2005).

NPM1 exerce donc un rôle dans l'embryogenèse et plus particulièrement dans le développement du cerveau antérieur et la mise en place de l'hématopoïèse.

b. Rôle de NPM1 dans la biogenèse des ribosomes

La protéine NPM1 est majoritairement localisée au niveau du nucléole où elle est impliquée dans le clivage des acides ribonucléiques ribosomaux (ARNr) et donc dans l'assemblage des ribosomes, fonction très importante et conservée entre les espèces.

Le nucléole est un organite dépourvu de membrane, composé d'un ou plusieurs centres fibrillaires, bordés par un composant fibrillaire dense, puis entourés d'un composant granulaire constituant l'essentiel du nucléole **(figure 32)**. La transcription des ARN ribosomaux a lieu au niveau

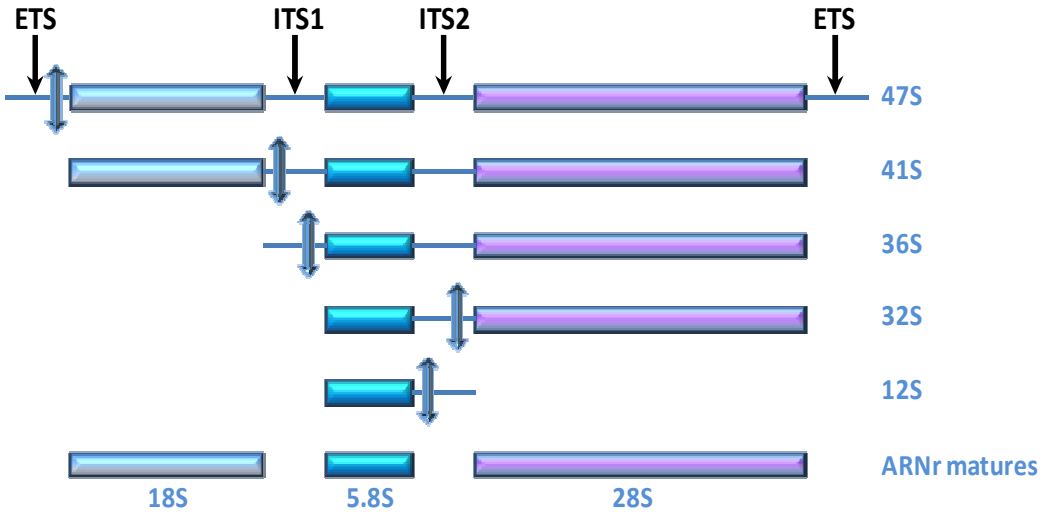


Figure 33 : Etapes de maturation du pré-ARN 47S en ARNr 18S, 5.8S et 28S

Le pré-ARN 47S subit une série de clivages séquentiels qui éliminent successivement les régions ETS et ITS. NPM1 intervient plus particulièrement dans la maturation de la forme 32S.

(D'après (Ayrault *et al.*, 2006)

des centres fibrillaires, les premières étapes de maturation de ces ARN et l'assemblage protéines/ARN se fait au niveau du composant fibrillaire dense alors que l'assemblage des sous-unités ribosomales a lieu au niveau du composant granulaire (Warner, 1990). Les ribosomes sont formés à partir de trois ARNr matures : 18S, 5.8S et 28S, qui vont constituer les deux sous-unités du ribosome en association avec des protéines ribosomiques: (i) la petite sous-unité de 40S est composée de l'ARNr 18S et de 33 protéines ribosomiques, (ii) la grande sous-unité de 60S réunit les ARNr 28S, 5.8S et 5S associés à 49 protéines ribosomiques. Les ARNr 28S, 5.8S et 18S sont formés à partir du pré-ARNr 47S synthétisé au sein du nucléole, par l'ARN polymérase de type I, sous la forme d'un précurseur de 13.9kb (Bowman *et al.*, 1981). L'ARNr 5S est quant à lui synthétisé directement par l'ARN polymérase de type III. La maturation de l'ARNr 47S résulte d'une série de clivage par des endonucléases et/ou une activité exonucléolytique afin d'éliminer les régions transcrites externes (ETS : External Transcribed Spacer), ainsi que les régions transcrites internes (ITS 1 et 2 : Internal Transcribed Spacer) **(figure 33)**. Au cours de la maturation, il y a formation d'ARNr « transitoires » (41S, 36S, 32S et 12S). NPM1 est requise pour la maturation des ARNr qui vont former la sous-unité 60S, à partir de l'ARNr 32S. Elle va couper préférentiellement au niveau de l'ITS2 de l'ARNr 12S, après les nucléotides présents dans une séquence spécifique (pGpCpU) et ainsi générer les ARNr 28S et 5.8S. En revanche, NPM1 n'exerce aucune activité endonucléase dans les autres régions (ETS, ITS1) (Savkur & Olson, 1998). NPM1 exerce aussi un rôle dans la régulation de la transcription du pré-ARNr 47S en augmentant sa synthèse par la formation d'un complexe chromatinien avec la protéine c-myc, au niveau des gènes ribosomaux (Grandori *et al.*, 2005; Murano *et al.*, 2008). L'activité endonucléase de NPM1 est permise par sa navette nucléocytoplasmique et par la présence d'un domaine de liaison aux acides nucléiques. En effet, le blocage de sa translocation et/ou une mutation dans son domaine de liaison entraîne une inhibition de la maturation des ARNr et de l'export des sous-unités ribosomales (Maggi *et al.*, 2008). L'invalidation génique de *npm1* chez la souris entraîne une inhibition de la synthèse des ribosomes dans les fibroblastes embryonnaires dérivés de ces animaux (Grisendi *et al.*, 2005). Cette activité endonuléasique de NPM1 est régulée par la formation d'un complexe avec l'isoforme NPM3, montrée pour avoir un rôle inhibiteur de la biogénèse des ribosomes (Huang *et al.*, 2005).

La biogenèse des ribosomes est importante pour permettre la traduction de transcrits de gènes et notamment des gènes impliqués dans la croissance, le cycle cellulaire et la prolifération. L'implication de NPM1 dans différentes étapes de cette biogenèse peut expliquer le rôle qu'elle exerce sur la croissance cellulaire et la prolifération.

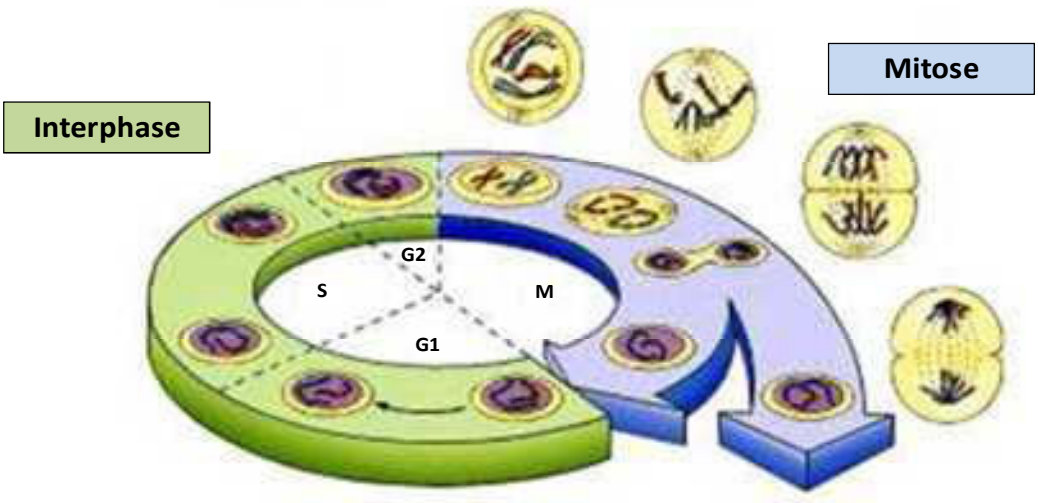


Figure 34 : Schéma des différentes phases constituant le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de quatre phases se succédant dans un ordre précis. Les phases G1, S et G2 qui constituent l'interphase puis la phase M qui représente la mitose.

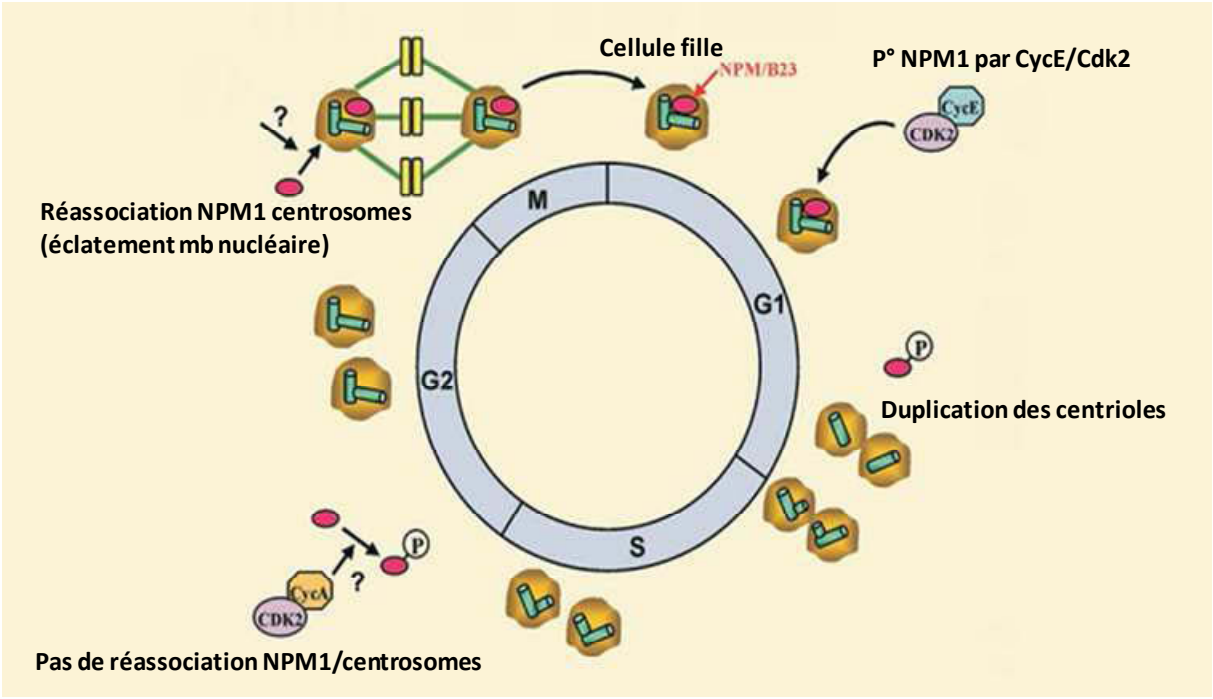


Figure 35 : Rôle de NPM1 dans la duplication des centrosomes

L'interaction de NPM1 aux centrosomes est dissociée après sa phosphorylation par le complexe CyclineE/Cdk 2, permettant ainsi la duplication des centrioles. Avant que la membrane nucléaire ne soit reformée, NPM1 re-localise au niveau des centrosomes, chaque cellule fille ayant un centrosome verrouillé par sa liaison avec NPM1.

(D'après (Okuda *et al.*, 2000).

c. Rôle de NPM1 dans le cycle cellulaire

NPM1 exerce un rôle important dans le déroulement correct du cycle cellulaire, en favorisant notamment la duplication des centrosomes. Cette duplication doit être coordonnée à la réplication de l'ADN afin de permettre l'établissement correct du fuseau mitotique et le bon alignement des chromosomes au niveau du fuseau.

Le cycle cellulaire des mammifères comprend quatre phases : G1, S, G2 et M, dont la succession s'effectue dans un ordre immuable. Durant la phase de synthèse (S) et la phase de mitose (M) les cellules exécutent les deux évènements fondamentaux du cycle que sont la réplication de l'ADN et le partage égal des chromosomes entre les deux cellules filles. Pendant les deux autres phases, G1 et G2 (G : gap), les cellules effectuent leur croissance, intègrent des signaux mitogènes ou anti-mitogènes (G1) et se préparent à la mitose (G2). Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase durant laquelle le noyau de la cellule est entouré d'une membrane, alors que la mitose est caractérisée par la disparition de l'enveloppe nucléaire et la condensation des chromosomes, alors visibles au microscope **(figure 34)**.

Pendant la phase G1, une fraction des protéines NPM1 est fixée aux centrosomes, assurant un verrouillage de leurs deux centrioles. Avant l'entrée en phase S, le complexe cyclineE/cdk2 phosphoryle NPM1 sur le résidu thréonine 199, ce qui entraîne sa dissociation des centrioles et permet leur duplication de façon coordonnée avec la réplication de l'ADN. Au terme de la duplication et avant l'entrée en phase M, NPM1 est déphosphorylée, ce qui provoque sa réassociation avec les centrosomes et ainsi la mise en place du fuseau mitotique, pour un partage correct des chromosomes entre les deux cellules filles **(figure 35)** (Okuda *et al.*, 2000). Des études suggèrent que la phosphorylation des résidus thréonines 234 et 237 par le complexe cyclineB/cdk1 permettrait la réassociation de NPM1 avec les centrosomes. La formation du fuseau mitotique et la mitose sont également permises grâce à l'intervention de la kinase Plk1 qui phosphoryle NPM1 sur la sérine 4 (Zhang *et al.*, 2004). Il en est de même pour la phosphorylation de la thréonine 95, au niveau du motif NES qui joue un rôle dans l'attachement de NPM1 aux centrosomes et dans leur duplication (Wang *et al.*, 2005). L'invalidation génique de *npm1* chez les souris entraîne des arrêts du cycle cellulaire ainsi qu'une duplication aberrante de l'ADN. De plus, l'haploinsuffisance de npm1 entraîne une amplification des centrosomes démontrant nettement l'importance de son expression et de son dosage dans le maintien du nombre de centrosomes et la stabilité génomique (Grisendi *et al.*, 2005).

Rôles associés	Protéines d'interactions avec NPM1
Réplication de l'ADN, transcription et réparation	MYC, APE1/Ref-1, NFkB, AR, MIZ1, AP2α, HEXIM1, YY1, CBF-A, IRF1, MNDA, GCN5, C/EBPα, Tpt1, DOT1L, Les histones
Contrôle du cycle cellulaire	p53, ARF, MDM2, pRB, p21, GADD45A
Biogenèse des ribosomes	EBP1, SENP3 et SENP5, RPL5, RPS9, RPL23, Nucléoline, p120, NPM3, USP36, Nucléostemine, PES1, TTF1, FRGY2a/YB1, NSUN2
Apoptose	Bax, PARP-1 et PARP-2, PIP3, GAGE
Stabilité et épissage des ARNm	hnRNPU, hnRNPA1, NSP 5a3a
Modifications, synthèse et dégradation des protéines	PKR, BRCA1-BARD1, AKT, Fbw7γ, HLJ1
Fuseau mitotique, cytosquelette et centromères	CRM1, RPGR et RPGRIP1, Eg5, Plk2, CTCF

Tableau 6 : Récapitulatif des différentes protéines qui interagissent avec NPM1

L'interaction de NPM1 avec divers protéines, parmi lesquelles des facteurs de transcription, lui permet d'exercer ses fonctions de régulation de la transcription génique.

(D'après (Lindstrom, 2011)

Par son association avec la protéine du rétinoblastome (Rb) et son interaction avec l'ADN polymérase α (Takemura *et al.*, 1999), NPM1 exerce un contrôle sur la réplication de l'ADN.

d. Rôle de NPM1 dans l'organisation de la chromatine et la transcription génique

Outre son rôle dans la progression du cycle cellulaire et la prolifération, NPM1 possède également une activité chaperonne d'histone. Elle participe à l'assemblage des nucléosomes et à la relaxation de la chromatine ce qui favorise à terme la transcription génique. Dans un premier temps, NPM1 se lie préférentiellement aux histones H3 et H4 par sa région amino terminale. Dans un second temps, elle participe à l'assemblage des nucléosomes après fixation des dimères H2A et H2B, grâce à son domaine acide A2 (Okuwaki *et al.*, 2001a; Okuwaki *et al.*, 2001b). L'acétylation conjointe de NPM1 par la protéine p300 et du core d'histones entraîne une modification de l'affinité de NPM1 pour l'histone H3, et conduit à la relaxation de la chromatine et à la stimulation de la transcription génique (Swaminathan *et al.*, 2005). Cette action n'est pas globale mais s'exerce sur des régions bien définies où se trouvent des gènes contrôlant la survie et la prolifération cellulaire (Shandilya *et al.*, 2009). Ces modifications post-transcriptionnelles de NPM1 par acétylation sont également contrôlées par un équilibre d'expression entre p300 et la déacétylase SIRT1.

NPM1 peut également réguler la transcription génique en interagissant directement avec des facteurs de transcription **(tableau 6)**. Tout d'abord, NPM1 régule la transcription génique médiée par l'ARN polymérase II par la liaison et l'inhibition de l'activité de HEXIM1, régulateur positif de cette polymérase et inhibiteur du facteur d'élongation P-TEFβ (Gurumurthy *et al.*, 2008). Ensuite, l'interaction de NPM1 avec le facteur de transcription c-myc facilite également la transcription génique par l'ARN polymérase II, et permet ainsi l'activation de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Li *et al.*, 2008). Enfin, en fonction des facteurs de transcription avec lesquels elle va interagir, NPM1 va être soit assimilée à un co-activateur, soit à un co-répresseur. Par exemple, lors de la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïde, NPM1 forme un complexe avec le facteur de transcription AP2α (Activating Protein transcription factor 2) et va agir comme un co-répresseur par le recrutement d'histones déacétylases (HDACs) empêchant ainsi la transcription (Liu *et al.*, 2007a). A l'inverse NPM1 augmente la transcription génique lors de son interaction avec des facteurs de transcription tels que IRF1 (Kondo *et al.*, 1997), p53 (Colombo *et al.*, 2002), NFκB (Dhar *et al.*, 2004), AR (Leotoing *et al.*, 2008) ou encore YY1 en interférant avec sa fonction de

répresseur transcriptionnel (Inouye & Seto, 1994).

NPM1 est également impliquée dans la régulation de la transcription dépendante de l'ARN polymérase I (Murano *et al.*, 2008). Elle favorise le recrutement de l'ARN polymérase I sur l'ARNr 47S et augmente la transcription de TAF1A, partenaire du complexe d'initiation de la transcription. NPM1 permet donc la transcription de gènes impliqués eux-mêmes dans la transcription de l'ARNr par l'ARN polymérase I (Bergstralh *et al.*, 2007; Murano *et al.*, 2008). De plus, NPM1 favorise la localisation nucléolaire du facteur de terminaison de la transcription TTF1 (Terminaison Transcription Factor 1) impliqué dans la synthèse de la majorité des ARNr par l'ARN polymérase I (Lessard *et al.*, 2010).

4) NPM1 et cancer

Au vu de sa multiplicité de modifications post-traductionnelles et ses interactions avec divers facteurs de transcription et partenaires protéiques, NPM1 est impliquée dans des processus cellulaires variés. L'altération de son expression dans de nombreuses tumeurs solides d'origines histologiques différentes et dans les tumeurs hématopoïétiques suggère que cette protéine joue un rôle important dans la tumorigenèse. Ce rôle reste encore controversé car NPM1 apparaît à la fois comme un suppresseur de tumeur et un oncogène.

a. Controverse entre suppresseur de tumeur et proto-oncogène

1. NPM1 est-elle un suppresseur de tumeur ?

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro*, montrent que NPM1 est impliquée dans la stabilité génomique et que par son interaction avec la protéine du cycle cellulaire ARF et la protéine p53, elle peut entraîner un arrêt de la croissance et permettre la mort cellulaire. ARF est une protéine nucléolaire, de la famille des Ink4, inhibiteurs des complexes cycline/Cdk, impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et dans la programmation de l'apoptose en réponse à des stimuli oncogéniques. L'inhibition du cycle cellulaire par ARF repose sur sa capacité à inhiber la protéine HDM2 (Human Double Minute 2, MDM2 chez la souris) qui, en ciblant p53 par ubiquitinylation,

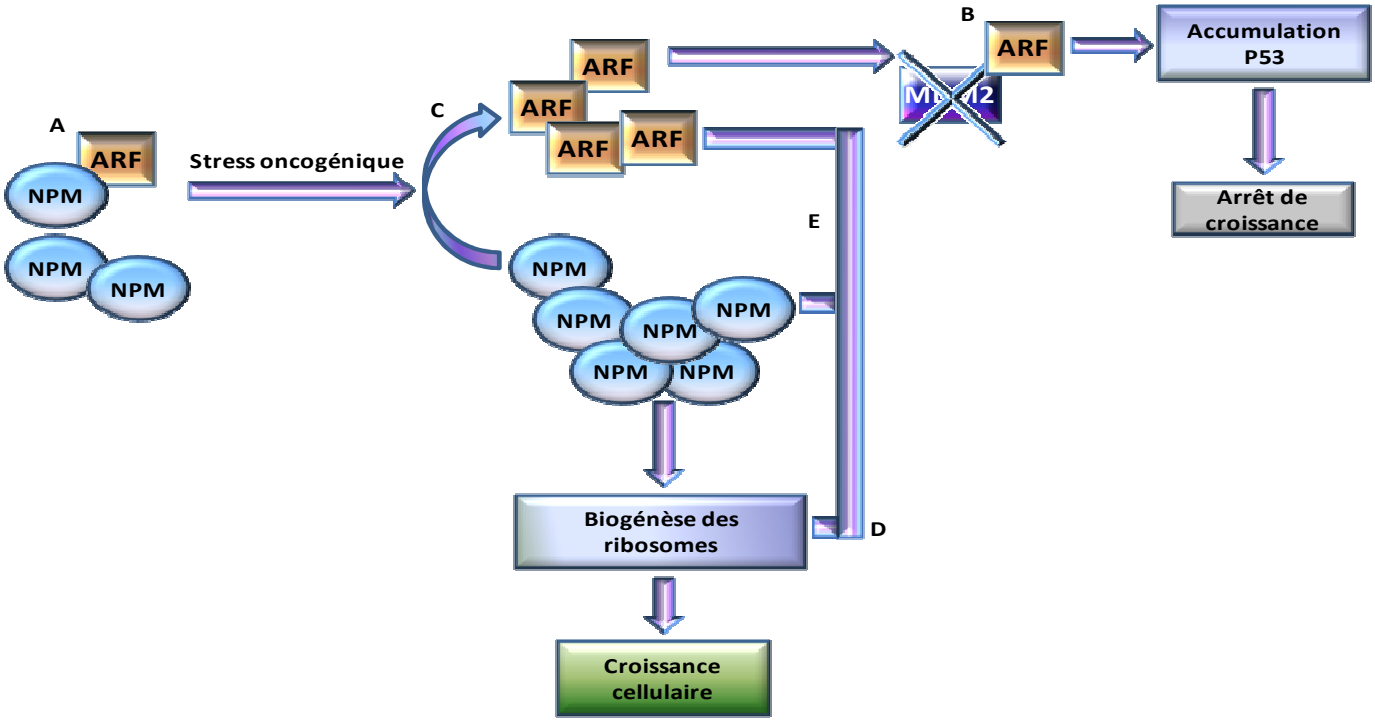


Figure 36 : Rôle de l'interaction NPM1-ARF dans le contrôle de la croissance cellulaire et la prolifération

Dans un contexte normal, NPM1 s'associe avec ARF dans le nucléole et régule son activité (A). Suite à une stimulation oncogénique, il y a augmentation de l'expression de ARF et de NPM1, ce qui permet le contrôle de la croissance cellulaire. ARF peut conduire à l'activation de P53, par l'inhibition de MDM2 et permettre ainsi l'arrêt de la croissance (B). La croissance cellulaire peut également être inhibée de manière indépendante de P53 (C, E). L'accumulation de NPM1 va entrainer une stabilisation et donc une accumulation de ARF qui en retour va exercer un effet inhibiteur sur NPM1. Il y aura alors blocage de la navette de NPM1 entre le noyau et le cytoplasme et inhibition de la synthèse des ARNr (D).

(D'après (Grisendi *et al.*, 2006)

entraîne sa dégradation par le protéasome (Weber *et al.*, 1999). Par son interaction avec ARF, NPM1 lui permet une localisation nucléolaire, empêche sa dégradation et permet l'activation de p53 (Colombo *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2004). De plus, NPM1 peut interagir directement avec HDM2, ce qui conduit à la stabilisation de p53 (Kurki *et al.*, 2004). Ces deux modes de stabilisation du facteur de transcription p53 entraînent une augmentation de la transcription de ses gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou dans l'activation de la mort cellulaire programmée **(figure 36)**. D'autres données suggérent un rôle de suppresseur de tumeur pour NPM1. Comme il a déjà été mentionné, elle est impliquée dans la régulation de la ploïdie des chromosomes en contrôlant notamment la duplication des centrosomes. La capacité de navette de NPM1 entre le cytoplasme et le nucléole est également importante pour le maintien de la stabilité génomique, et plus particulièrement dans l'assemblage du fuseau mitotique. En effet, suite à la liaison de NPM1 au complexe RAN-CRM1, par son domaine NES, permettant son transport, il y a un enrichissement de NPM1 au niveau des centrosomes, qui agit comme un verrou afin d'éviter des duplications surnuméraires des centrosomes pouvant à terme conduire à des polyploïdies ou des aneuploïdies (Shinmura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Son invalidation génique ou l'haploinsuffisance (*npm1+/-*) chez la souris entraîne une létalité embryonnaire à 12.5 jour de gestation accompagnée d'une aneuploïdie (Grisendi *et al.*, 2005). De manière intéressante, dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) inhibés pour l'expression de NPM1, le taux de prolifération est augmenté, et ce de manière plus importante lorsque les cellules sont également déficientes pour p53 (*npm1-/-, p53-/-*) (Colombo *et al.*, 2005).

NPM1 a également été identifiée comme un régulateur de l'apoptose mitochondriale par son interaction avec la protéine pro-apoptotique BAX (Bcl-2-Associated X protein) ce qui facilite sa translocation à la mitochondrie. Cela permet son activation et une induction de l'apoptose mitochondriale par la création de pores membranaires et la diffusion de cytochrome c (Kerr *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008).

NPM1 est impliquée dans le contrôle de la réparation de l'ADN. En effet, une exposition des cellules aux rayons ionisants entraîne une augmentation de la transcription de NPM1 associée à une stimulation des processus de réparations de l'ADN (Wu *et al.*, 2002). En accord avec ces données, il a également été montré qu'une perte d'expression de NPM1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris, provoque une accumulation de la protéine phosphorylée γ-H2AX, marqueur des cassures double brin de l'ADN, cible des kinases de réparation ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia Related) (Colombo *et al.*, 2005). NPM1 agit donc comme un suppresseur de tumeur en prévenant les évènements de dommage à l'ADN et les instabilités génomiques pouvant

faire suite à des erreurs de réparations.

2. NPM1 est-elle un proto-oncogène ?

Inversement, il semblerait également qu'il y ait une corrélation entre l'augmentation d'expression de NPM1 dans les cellules tumorales et l'augmentation de la croissance et de la prolifération cellulaire, ainsi que l'inhibition de l'apoptose. Ces corrélations peuvent être expliquées par son rôle dans la stimulation de l'activité de l'ADN polymérase α (Takemura *et al.*, 1999) et par le fait qu'elle soit une cible transcriptionnelle du proto-oncogène myc (Boon *et al.*, 2001; Zeller *et al.*, 2001). Corrélativement, l'expression de NPM1 diminue dans les cellules quiescentes et/ou subissant l'apoptose (Dergunova *et al.*, 2002; You *et al.*, 1999). NPM1 a la capacité d'inhiber les voies pro-apoptotiques normalement induites en réponse à divers stimuli physiques ou solubles (Ye, 2005). Dans les cellules fibroblastiques NIH-3T3, la forte accumulation de NPM1 entraîne une résistance à l'apoptose induite par les rayons ultraviolets. Elle maintient également la prolifération en stimulant la réparation des lésions à l'ADN et en augmentant l'expression de la protéine PCNA, essentielle au fonctionnement de la machinerie de réparation (Wu *et al.*, 2002). Enfin, NPM1 est capable de se fixer et d'inhiber l'activité du suppresseur de tumeur IRF-1 (Interferon Regulatory Factor-1) impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose induite lors de dommages à l'ADN ou en réponse à l'interféron γ (Kondo *et al.*, 1997; Romeo *et al.*, 2002). La perte de fonction de IRF-1, associée à une surexpression de NPM1 a notamment été observée dans des cas de syndromes myélodysplasiques et de leucémies (Kondo *et al.*, 1997). En plus du contrôle de IRF-1, la surexpression de NPM1 permet aux cellules d'échapper à la surveillance anti-tumorale controlée par une autre protéine inductible par l'interféron γ : PKR (Protein Kinase RNA-activated). Lors de son induction, PKR se lie aux ARN pour bloquer la synthèse protéique par phosphorylation et inactivation du facteur d'initiation de la traduction EIF2α (Eukaryotic translation Initiation Factor 2α) (Barber, 2001). Dans les cellules hématopoïétiques, le blocage de l'activité de PKR par NPM1 contribue au maintien de l'activité de la synthèse protéique et favorise ainsi la survie cellulaire (Pang *et al.*, 2003).

Le potentiel oncogénique de NPM1 est également révélé dans les contextes d'hypoxie. Lors de la mise en place de l'hypoxie au cours de la progression tumorale, il y a une augmentation de l'accumulation de NPM1, dont le gène est la cible transcriptionnelle du facteur d'hypoxie HIF-1α (Hypoxia-Inductible Factor 1α). Cela conduit à une réduction de la phosphorylation activatrice de p53 sur la sérine 15. p53 ne peut plus activer la transcription de ses gènes cibles, ce qui entraîne une résistance à l'apoptose (Li *et al.*, 2004a). La surexpression de NPM1 conduit également à la séquestration de ARF dans le nucléole et en cascade à l'ubiquitinylation et à la dégradation de p53

	Altérations	Produit muté	Malignités associées
Expression protéique	Surexpression	Augmentation de l'expression de NPM1	Tumeurs d'origines histologiques différentes (carcinomes de l'estomac, du colon, des ovaires et de la prostate)
Translocations génomiques	t(5;17)(q35;q12)	NPM1-RARα	Leucémies promyélocytaires aigües
	t(2;5)(p23;q35)	NPM1-ALK	Lymphomes anaplasiques à grandes cellules
	t(3;5)(q25;q35)	NPM1-MLF1	Syndromes myélodysplasiques et Leucémies myéloïdes aigües
	Mutations de l'exon 12	NPMc (mutant cytoplasmique)	Leucémies myéloïdes aigües à caryotype normal
	Délétion (-5q35,-5)		Syndromes myélodysplasiques et Carcinomes du poumon non à petites cellules

Tableau 7 : Principales altérations de NPM1 dans les cancers humains

NPM1 est impliquée dans les pathologies humaines et les cancers solides suite à des dérèglements de son expression et des modifications génétiques.

(D'après (Grisendi *et al.*, 2006)

(Korgaonkar *et al.*, 2005).

Une surexpression de NPM1 peut induire une duplication aberante des centrosomes et une aneuploïdie comme fréquemment retrouvé dans les cancers (Grisendi *et al.*, 2006).

b. Principales altérations génétiques de NPM1 dans les physiopathologies et les cancers

Les altérations de NPM1 observées peuvent résulter d'une augmentation de son expression ou encore des modifications de son gène telles que des délétions, des translocations ou des mutations, retrouvées le plus souvent dans les tumeurs hématopoïétiques **(tableau 7)**.

1. Altérations de NPM1 dans les tumeurs hématopoïétiques

Le chromosome 5, et plus spécifiquement le locus 5q35, qui porte le gène codant pour NPM1 est le siège de délétions dans le cas de syndromes myélodysplasiques (MSD) *de novo* et de leucémies (Bennet, 2002). La délétion de la région 5q35 est également retrouvée dans certaines tumeurs solides comme dans le cancer du poumon non à petites cellules (Mendes-da-Silva *et al.*, 2000)

Outre les délétions, les translocations génomiques impliquant le chromosome 5 et entraînant souvent une perte de l'allèle fonctionnel du gène, sont régulièrement associées aux maladies hématopoïétiques comme les lymphomes et les leucémies (Berger *et al.*, 2006). La région génique codant pour la partie amino- terminale de NPM1 est alors associée à différents gènes partenaires. La translocation la plus retrouvée, dans 75% des lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCL : Anaplastic Large Cell Lymphoma), et par conséquent la plus étudiée, est la t(2 ;5)(p23 ;q35) qui entraîne la fusion du gène NPM1 avec le gène ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) (Falini & Mason, 2002). Elle consiste en l'association des quatre premiers exons de NPM1, contenant le domaine d'oligomérisation, avec les exons codant le domaine catalytique du récepteur membranaire à activité tyrosine kinase ALK (Morris *et al.*, 1994). La protéine de fusion NPM1-ALK conserve la capacité d'hétérodimérisation par le domaine d'oligomérisation avec les protéines NPM1 endogènes. Ces protéines, qui possèdent toujours leur signal de localisation nucléaire ainsi que les signaux d'export, vont permettre à NPM1-ALK de faire la navette entre le noyau, le cytoplasme et le nucléole (Cordell *et al.*, 1999). NPM1 confère, en plus, une activité constitutive à ALK, normalement inactif dans les cellules lymphoïdes, ce qui entraîne un rôle oncogénique de ALK (Morris *et al.*, 1994). Bien

que plus rare, une autre translocation possible de NPM1 est la t(5 ;17)(q35 ;q12) qui provoque la fusion de NPM1 avec le récepteur aux acides rétinoïdes (RARα), suite à la fusion de l'extrémité 5' du transcrit de NPM1 avec la région 3' de RARα (Redner *et al.*, 1996). Cette translocation est retrouvée majoritairement dans les leucémies promyélocytaires aigües (APL). Cette fusion perturbe la transcription dépendante de l'acide rétinoïde et altère la différenciation myéloïde au stade promyélocyte. Elle peut également perturber d'autres fonctions biologiques, indépendantes de la fonction transcriptionnelle de RARα, l'homo et l'hétéro-oligomérisation de NPM1 entraînant son changement de localisation et pouvant modifier les fonctions de RARα sauvage et endogène (Redner *et al.*, 1996). Une dernière translocation connue dans les syndromes myélodysplasiques est la t(3 ;5)(q25 ;q35) conséquence de la fusion de la région codant pour les 171 premiers acides de NPM1, dans sa partie 5', avec le gène MLF1 (Myelodysplasia-Myeloid Leukemia Factor 1). MLF1, normalement localisé au niveau du cytoplasme, se retrouve, lors de la fusion NPM1-MLF1, localisé dans le noyau et plus fortement dans le nucléole dans les cellules de leucémies myéloïdes. Cette localisation anormale interfère avec l'activité de MLF1 et altère sa capacité à contrôler l'érythropoïèse et le cycle cellulaire (Winteringham *et al.*, 2004; Yoneda-Kato *et al.*, 1996).

Dans le cas de cellules normales, NPM1 peut faire la navette entre les différents compartiments cellulaires afin d'y exercer ses fonctions. Dans des cas de leucémies myéloïdes aigües, NPM1 est délocalisé dans le cytoplasme (NPMc+) suite à une mutation dans l'exon 12 entraînant un décalage du cadre de lecture dans sa partie carboxy-terminale (Falini *et al.*, 2007). Ces mutations sont présentes dans environ 35% des leucémies à caryotype normal (Falini *et al.*, 2008). Dans les dix dernières années, plus de 40 mutations qui affectent principalement la partie carboxy-terminale de NPM1 ont été répertoriées. La mutation la mieux caractérisée est la mutation de type A, présente dans 75% à 80% des cas de leucémies qui entraîne la formation d'un motif NES et consécutivement la perte du motif NuLS. Cette mutation entraîne donc la délocalisation de NPM1 dans le cytoplasme, la perte de ses interactions avec ses différents partenaires, ainsi que la délocalisation de ARF du nucléole ce qui conduit à sa perte d'activité (den Besten *et al.*, 2005). Cette mutation provoque aussi la délocalisation des protéines NPM1 sauvages endogènes dans le cytoplasme par effet trans-dominant positif (den Besten *et al.*, 2005).

2. *Altérations de NPM1 dans les tumeurs solides*

Contrairement aux hémopathies malignes, les translocations de NPM1 ainsi que les mutations au niveau de l'exon 12 sont absentes dans les tumeurs solides (Jeong *et al.*, 2007). NPM1 est souvent fortement exprimée dans des tumeurs humaines d'origines histologiques différentes, tels que les

cancers gastriques (Tanaka *et al.*, 1992), du colon (Nozawa *et al.*, 1996), de l'ovaire (Shields *et al.*, 1997) ou encore de la prostate (Leotoing *et al.*, 2008; Subong *et al.*, 1999). Les causes de cette surexpression sont encore mal connues mais il est supposé que l'oncogène c-Myc pourrait être impliqué. En effet, c-Myc est capable de se fixer sur la région promotrice de NPM1 afin d'activer la transcription du gène (Zeller *et al.*, 2001) et les deux protéines sont conjointement fortement exprimées dans les tumeurs osseuses (Kikuta *et al.*, 2009). La forte accumulation de NPM1 dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains peut être associée à des altérations de son profil de modifications post-traductionnelles. En effet, il y a une augmentation de la forme phosphorylée de NPM1 dans les mélanomes (Bernard *et al.*, 2003b) et de la forme acétylée dans les cancers oraux (Shandilya *et al.*, 2009) et les cancers de la thyroïde (Pianta *et al.*, 2011). Dans ce dernier cas, cette acétylation conduit à une forte relocalisation de NPM1 dans le nucléoplasme (Pianta *et al.*, 2011). Ces altérations sont retrouvées dans les phases tardives de la carcinogenèse et plus particulièrement dans les phases d'échappements thérapeutiques (Bergstralh *et al.*, 2007). Elles peuvent également engendrer des modifications d'interactions de NPM1 avec ses différents partenaires protéiques (Korgaonkar *et al.*, 2005) tels que FOXM1 (FOrkhead boX M1) (Bhat *et al.*, 2011) et AKT. Sa liaison avec AKT protège NPM1 du clivage protéolytique (Lee *et al.*, 2008). D'autres auteurs supposent que cette interaction puisse former une unité oncogénique impliquée dans la tumorigenèse (Kim *et al.*, 2011).

Présentation du sujet

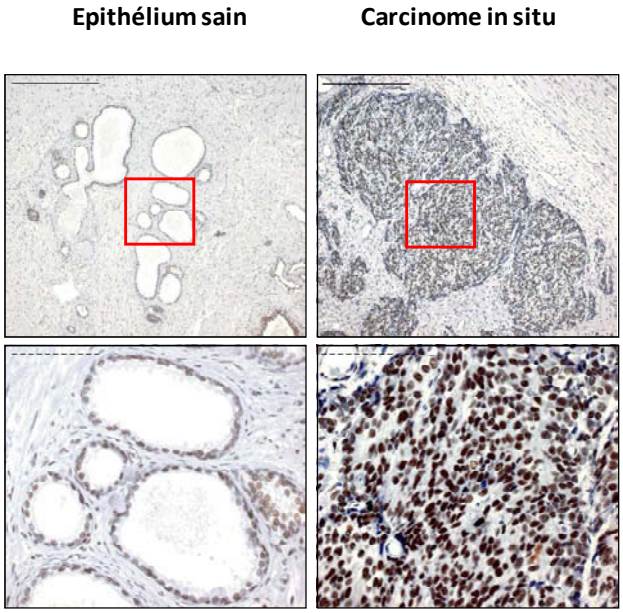


Figure 37 : Niveaux d'expression de NPM1 dans des échantillons de biopsies humaines

Analyse immunohistochimique des niveaux d'expression de la protéine NPM1 dans des biopsies de prostate. Comparaison entre l'épithélium adjacent sain (gauche) et le tissu tumoral (droite).

(D'après (Leotoing *et al.*, 2008)

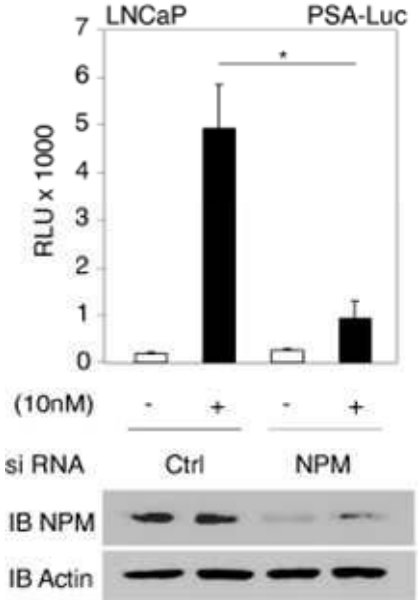


Figure 38 : Activité transcriptionnelle de AR en fonction des niveaux d'expression de NPM1

Analyse de l'activité luciférase sous contrôle du promoteur du PSA, gène cible de AR, régulé par les androgènes dans des cellules LNCaP contrôles (siGFP) ou inhibées pour l'expression de NPM1 (siNPM) en réponse à la dihydrotestostérone (DHT).

(D'après (Leotoing *et al.*, 2008)

Le cancer de la prostate est une pathologie de l'homme âgé pouvant avoir des conséquences néfastes sur la qualité de vie mais surtout sur la survie des hommes atteints. La carcinogenèse prostatique est un processus multi-étapes qui se caractérise par la formation de néoplasies intraépithéliales, puis par le passage à un stade de carcinome invasif ou de cancer localement avancé, avant d'atteindre le stade le plus agressif : le stade métastatique. Comme il a été décrit dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, la progression du cancer de la prostate s'accompagne d'altérations génétiques, comme des mutations ponctuelles ou des translocations chromosomiques, conduisant à la perte d'expression de régulateurs importants dans le maintien de la glande prostatique. Associée à la perte de ces régulateurs, la progression cancéreuse est également dépendante de la mise en place d'une dérégulation des voies de signalisation répondant aux facteurs de croissance tels que IGF-1, IL-6 ou EGF. En effet, la prolifération et la survie des tumeurs peuvent être assurées suite à l'acquisition d'une autonomie des cellules vis-à-vis de leur environnement. Cette autonomie est due à une augmentation de l'activité des récepteurs de ces facteurs de croissance dont la synthèse est directement assurée par les cellules épithéliales. Ainsi, l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur sera augmentée. Ces modifications d'expression des facteurs de croissances sont concomitantes avec des modifications d'accumulations de plusieurs protéines pour lesquelles nous ne savons pas si elles ont un rôle causal ou incident dans la carcinogenèse prostatique.

Avant mon arrivée au laboratoire, il a été montré au sein de l'équipe que la protéine NPM1 est surexprimée dans les tissus tumoraux d'échantillons de biopsies de patients atteints de cancer de la prostate, en comparaison avec le tissu adjacent sain **(figure 37)**. NPM1 est une protéine nucléolaire multifonctionnelle qui a un rôle important dans la croissance et la prolifération par la régulation de processus variés tels que la biogenèse des ribosomes, la duplication des centrosomes ou la transcription génique (Lindstrom, 2011; Okuda *et al.*, 2000; Okuwaki, 2008). Cette protéine est donc un régulateur clé d'activités cellulaires souvent altérées dans plusieurs tumeurs. De plus sa co-localisation et son interaction avec AR dans les cellules épithéliales de cancer de la prostate localisés, et son activité co-activatrice de la transduction dépendante de AR, montrent que NPM1 est un acteur important dans la physiologie prostatique et que sa dérégulation joue un rôle dans la carcinogenèse **(figure 38)** (Leotoing *et al.*, 2008). De même, elle peut influencer l'état prolifératif de cellules de canal déférent de souris (VDEC), dans lesquelles NPM1 est plus fortement exprimée dans les cellules en prolifération en comparaison avec les cellules dans un état de différenciation **(figure 39)**. Ces données suggèrent une corrélation entre les niveaux d'accumulation de NPM1 et la progression des cancers de la prostate. Cependant, la question essentielle est celle-ci : Est-ce-que NPM1 est un acteur de la progression tumorale ou est-ce-que sa surexpression est une conséquence du

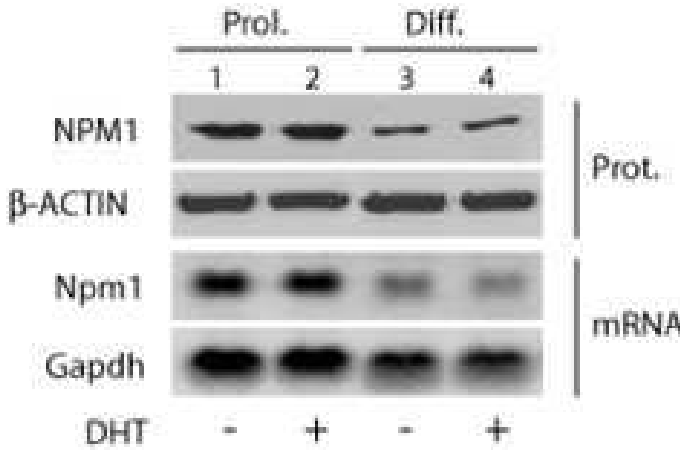


Figure 39 : Niveaux d'expression de NPM1 dans les cellules de canal déférent de souris (VDEC)

Analyse des taux protéiques et d'ARNm de NPM1 dans les cellules VDEC en prolifération (Prol.) et en différenciation (Diff.), par Western Blot et Northern Blot, respectivement. Les taux de NPM1 sont plus élevés dans les cellules en prolifération par rapport aux cellules en différenciation.

(D'après Léotoing L., Maquaire S. *et al.,* en révision)

développement tumoral ? De plus, les mécanismes sous-jacents par lesquels NPM1 exerce ses fonctions restent flous.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc: 1) de déterminer si le niveau d'accumulation de NPM1 a un impact sur le comportement des cellules cancéreuses de prostate ; 2) En ce cas, d'identifier les mécanismes par lesquels elle exerce ces effets ?

Modèle d'étude :

Comme peu d'informations sont disponibles sur le rôle de NPM1 dans la progression des cancers de la protate, et dans le but de répondre à la question posée, nous avons choisi une approche *in vitro* plus simple à mettre en œuvre qu'une approche *in vivo*. La grande majorité des modèles cellulaires utilisés pour étudier les processus cancéreux sont dérivés de tumeurs. Nous avons choisi d'utiliser deux lignées de cellules tumorales de prostate : (i) la lignée cellulaire LNCaP (Lymph Node carcinoma of the prostate), cellules issues d'un ganglion métastatique ayant un récepteur des androgènes, intéressante pour leur prolifération accrue et leur forte expression de NPM1 (ii) et la lignée PC-3, dérivée d'une métastase osseuse ayant également une forte expression de NPM1, mais une abscence de récepteur des androgènes. La stratégie privilégiée et réalisée au laboratoire a été de diminuer le niveau d'accumulation de la protéine NPM1 par la transfection de particules lentivirales shARN dirigés spécifiquement contre NPM1.

Résultats

La nucléophosmine, un acteur protéique qui permet d'accroitre les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses de prostate par l'activation de la voie de signalisation ERK1/2

1) Présentation succinte du contexte de recherche

La phase de progression du cancer de la prostate est majoritairement associée à des altérations de l'expression génique et de la signalisation cellulaire. Ces altérations font suite à la mise en place de boucles autocrines de régulation consécutives à la surexpression de facteurs de croissance (EGF, IGF-I) et de cytokines (IL-6, oncostatine). La chaperonne d'histone NPM1 est une protéine du remodelage chromatinien qui participe au contrôle de l'expression génique dans la prostate et qui est surexprimée dans les cellules tumorales. Nos travaux ont cherché à déterminer le rôle de NPM1 dans la progression tumorale en analysant son impact sur la mise en place d'une boucle autocrine de régulation dépendante de EGF et sur les capacités invasives des cellules. L'inhibition ciblée de NPM1 entraîne une diminution de la réplication des cellules et de la transcription du marqueur de prolifération PCNA. Ces données *in vitro* sont en accord avec nos résultats *in vivo* qui montrent une incapacité des cellules invalidées pour NPM1 à développer des tumeurs après greffe sur souris *nude* contrairement aux cellules témoins. Le contrôle de la prolifération cellulaire résulte d'un impact sur la signalisation EGF puisque la diminution de NPM1 altère à la fois la transcription du gène codant ce facteur de croissance, l'activité de son promoteur ainsi que la phosphorylation des effecteurs intracellulaires EGFR et ERK1/2. Cette action n'est néanmoins pas directe sur EGF mais passe par le contrôle des effecteurs de la voie EGF/EGFR, en amont de MEK puisque son activation constitutive restaure la prolifération et l'activité du promoteur.

Lors de la progression tumorale, l'augmentation du taux de prolifération des cellules de prostate et la mise en place de la boucle autocrine de régulation dépendante de EGF participe à l'acquisition des capacités migratoires et invasives par les cellules. Ces processus sont indispensables pour l'établissement de métastases et sont corrélés à une agressivité des cancers (Coman, 1953). Ainsi, la diminution d'expression de NPM1 dans les cellules LNCaP conduit à une diminution de leurs capacités migratoires et invasives.

Ces données indiquent que NPM1 pourrait conférer un avantage prolifératif et invasif aux cellules tumorales de prostate. Il est alors pertinent d'envisager d'inhiber spécifiquement NPM1 pour limiter la croissance cellulaire et la migration pendant la phase de progression et/ou d'invasion après

la mise en place de la boucle autocrine de régulation par l'EGF. Cette voie est actuellement ciblée pour définir de nouveaux traitements chimiothérapeutiques lors des phases d'échappement hormonal. L'association d'un antagoniste du récepteur de l'EGF (trastuzumab®) à un inhibiteur de tyrosine kinases (gefitinib®) a donné des résultats encourageants même si ces traitements restent encore palliatifs. Dans ce contexte et sur la base de nos travaux, nous proposons comme perspective que l'inhibition de NPM1, protéine qui active la voie de signalisation ERK1/2 et qui agit parallèlement sur la disponibilité de contrôleurs du cycle cellulaire et de l'apoptose (e.g. p53), puisse potentialiser l'action de ces agents thérapeutiques.

2) Article: Nucleophosmin/B23 enhances migration and invasion by activating the ERK1/2 pathway in prostate cancer cells

G Loubeau[1], R Boudra[1,] S Maquaire[1], C Lours-Calet[1], C Beaudoin[1,] P Verrelle[2] and L Morel[1]

1 : GReD, UMR CNRS 6293 - Clermont Université - INSERM U1103, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France ; 2 : EA 7283 CREaT : Cancer Resistance Exploring and Targeting, Clermont-Université, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert BP392, 63011 Clermont-Ferrand, France

En cours de soumission dans International Journal of Cancer

Nucleophosmin/B23 enhances migration and invasion by activating the ERK1/2 pathway in prostate cancer cells

G Loubeau[1], R Boudra[1,] S Maquaire[1], C Lours-Calet[1], C Beaudoin[1,] P Verrelle[2] and L Morel[1]

1 : GReD, UMR CNRS 6293 - Clermont Université - INSERM U1103, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France ; 2 : EA 7283 CREaT : Cancer Resistance Exploring and Targeting, Clermont-Université, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert BP392, 63011 Clermont-Ferrand, France

Correspondance : Pr L Morel, GReD, UMR CNRS 6293 - Clermont Université - INSERM U1103, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. E-mail : laurent.morel@univ-bpclermont.fr, Tel : +(33)473407756, Fax : +(33)473407042

Running Title: NPM1 regulates PCa invasion via MAPK pathway

Abstract

Prostate cancer development is associated with alterations in the expression of key genes that control cellular homeostasis thus leading to abnormal proliferative and/or invasive features of cancer cells. The chaperone nucleophosmin (NPM1) is over-expressed in the epithelial compartment of tumoural prostate glands compared to adjacent healthy tissue and may represent one of the key actors that lead to epithelial dysregulation. Here we show that NPM1 favors cell migration, cell invasion and colony forming of prostate tumor cells. Furthermore, *in vivo* knock-down of NPM1 leads to a decrease in the growth of LNCaP-derived tumors grafted in nude mice. Such oncogenic-like properties are exerted *via* a positive regulation of NPM1 on the ERK1/2 kinase phosphorylation in response to EGF stimuli, stimuli which are emphasized in prostate tumours following the setting of an autonomous production of the growth factor. NPM1 could be a target to switch off specifically ERK1/2 pathway activation in order to decrease or inhibit proliferation and to potentiate actual targeted therapies based on EGFR specific inhibition.

Keywords: Nucleophosmin/B23, epithelial growth factor, migration, invasion and prostate cancer

Introduction

Prostate cancer development is associated with alterations in the expression of key genes that control cellular homeostasis thus leading to abnormal proliferative and/or invasive features of cancer

cells. Given its heterogeneity, it is difficult to clearly delineate the genetic defects responsible for the progression of the disease. In addition to the androgen receptor, which gene is amplified in both hormone-dependent prostate cancer (HDPC) and in 20 to 30% of cancers hormone refractory prostate cancers (HRPC), previous work correlated tumour progression to the expression level of the chaperone Nucleophosmin (NPM1) (1). Our previous studies show that NPM1 is expressed at a high level in prostate carcinoma compared to normal adjacent tissue (2), suggesting that it could act as a enhancer of prostate cancer progression. NPM1 is a major multifunctional nucleolar phospho-protein expressed at high level in the granular region of the nucleolus with capacities of shuttling between the nucleolus and the cytoplasm (3). Initially identified as a major regulator of the ribosome biogenesis (4), it was more recently demonstrated to bind to histones, to mediate nucleosome formation and to relax chromatin (5) thereby controlling gene expression. Furthermore, NPM1 was shown to interact with and to inhibit the tumour suppressor proteins P53 and Rb (6), and consequently to potentiate cell growth and proliferation. All these data emphasize a proto-oncogenic function of NPM1 although some authors described a tumour suppressive function for NPM1 as it acts as a regulator of centrosome duplication and thus may lead to cell apoptosis (7). All this studies revealed that NPM1 acts as both tumour suppressor and proto-oncogene during tumourigenesis (8). Although NPM1 detailed functions are starting to be clarified, the role of NPM1 in solid tumours remains to be determined.

Here we addressed the question whether NPM1 could potentiate proliferation, migration and invasion capacities of prostate cancer cells and deciphered the mechanism by which it exerts such a control on tumour cell behaviour.

Results

NPM1 regulates clonogenic and proliferative capacities of prostate tumour cells

NPM1's control on cell proliferation was analysed in the human prostate carcinoma cell line LNCaP. As these metastatic cells have a high proliferation rate and express NPM1 at high level, analyses were conducted by using LNCaP cells stably expressing control (shScr) or NPM1 specific shRNA (shNPM1) in order to knock-down NPM1 expression. As shown in figure 1a, shNPM1 cells have more than a 50% decrease of NPM1 mRNA level and a 30% decrease of NPM1 protein expression. Although knock-down of NPM1 does not affect cells' morphology, it greatly decreases their ability to form colonies after seeding at low confluence (figure 1b). This decrease of clonogenic capacities is accompanied by a parallel decrease of proliferative capacities. In fact, we show that down-regulation

of NPM1 resulted in a 30% decrease of BrdU incorporation (figure 1c) associated with a 60% decrease of PCNA mRNA level, a key marker of cell proliferation (figure 1d). Interestingly, NPM1 blockade with the specific inhibitor NSC348884 does not alter cell survival as evaluated by the measure of the remaining apoptotic fraction in the cell culture, thus indicating that this decrease of the proliferation rate is not associated to an increase of apoptosis (supplementary figure 1). These results suggest that NPM1 is involved in the increase of proliferation and clonogenic capacities of prostate tumour cells.

NPM1's impact on proliferation is associated with the control of migration, invasion, three-dimensional growth capacities of prostate cancer cells and tumour growth

Our finding that NPM1 have an effect on controlling clonogenic capacities of prostate cancer cells, suggests that, beside the proliferative rate, it could regulate mechanisms supporting cell migration or invasion. Wound healing assays show that knock-down (figure 2a) or specific inhibition of NPM1 using the NSC348884 compound (supplementary figure 2) lead to a decrease of LNCaP cells migration to the denuded zone 72 hours after the wound. Similarly, Boyden chamber invasion assay put in evidence a decrease of cell ability to invade a membrane when NPM1 is at low level (figure 2b). Interestingly, NPM1's effects on migration and on invasion processes are similar in PC-3 cancer cells that lack the androgen receptor (supplementary figure 3). The decrease of migration and invasion capacities is accompanied by a decrease of three-dimensional growth of shNPM1 LNCaP cells in soft agar (figure 2c). *In vivo* analyses in nude mice revealed that LNCaP shNPM1-derived tumours were smaller and have slower rate of formation than LNCaP shScr-derived tumours. Accordingly, this decrease of tumour size is accompanied with an important decrease of tumour weight (figure 2d, 2e, 2f). Taken together, these data clearly demonstrate that NPM1 is involved in tumour growth by controlling migration and invasion of prostate cancer cells.

NPM1 is involved in the control of EGF expression and the setting of the EGF self-regulation loop

In order to better understand mechanisms by which NPM1 can regulate these processes, we performed a qPCR Array analysis (RT^2 Profiler^{TM}, Qiagen) and determined the nature of genes whose transcription levels are modulated by NPM1 knock-down. The Epidermal Growth Factor (EGF) mRNA showed the most significant decreased accumulation in the low NPM1 condition (data not shown). Complementary RT-qPCR assays showed that the knock-down of NPM1 leads to a 40% decrease of EGF mRNA accumulation (figure 3a). This modulation of EGF expression by NPM1 does not result from a global effect on genes expression as mRNA levels of housekeeping genes are not affected by such a NPM1 knock-down. This effect of NPM1 is likely to be exerted at transcription level as the EGF gene's promoter activity is concomitantly decreased when NPM1 is down-regulated (figure 3b).

These results thus suggest that NPM1 controls directly or indirectly EGF expression. As the EGF is known to specifically activate the EGF receptor (EGFR), we investigated whether the activation of the EGF/EGFR complex as well as of the downstream transduction effectors are modulated according to NPM1 expression level in LNCaP cells. Analyses of phosphorylation status revealed that activation of EGF receptor (pEGFR) is altered and that ERK1/2 activation (pERK1/2) is almost abolished in a context where NPM1 expression is inhibited whereas the PI3K/AKT signalling pathway is not altered (figure 3c). These impacts of NPM1 in EGF expression and ERK1/2 pathway suggest that NPM1 might be involved in the setting of the EGF self-regulation loop.

NPM1 potentiates ERK1/2 pathway activity for the control of proliferation and migration capacities of prostate cancer cells

The above data demonstrate that NPM1 is involved in the control of EGF expression at transcription level. It was therefore interesting to investigate if exogenous intake of EGF could restore the activation of EGF/EGFR pathway effectors and the cells phenotypes previously observed. Control (shScr) or NPM1 knock-down (shNPM1) LNCaP cells were then seeded in a 6-well plate in RPMI 10%FBS and incubated for 36 hours. After 12 hours of serum starvation in order to switch off the signalling pathways, cells were treated with EGF at 100nM in RPMI 2%FBS for 5 minutes. Western blot analyses show that exogenous EGF supplementation leads to activation of EGF receptor and of PI3K/AKT signalling pathway in both shScr and ShNPM1 cells, but that down-regulation of NPM1 specifically impedes the activation of ERK1/2 (figure 4a). In agreement with this results, proliferation and migration assays show that exogenous EGF does not rescue migration nor invasion capacities of LNCaP cells knocked-down for NPM1 (figure 4b,c). These results clearly demonstrate that NPM1 is required for activation of the effectors of the ERK1/2 pathway and that potentiation of this transduction pathway is involved in the control of proliferation and migration capacities of prostate cancer cells.

NPM1 acts upstream of MEKK1 and downstream of EGFR to activate ERK1/2 pathway, for the control of EGF self-regulation loop in prostate cancer cells

To identify on which effector(s) of the EGFR-induced signalling pathway NPM1 could act and whether this action is direct or not on the EGF's gene promoter, we performed transfection assays with a constitutively active form of MEKK1 (caMEKK1), which phosphorylates and thereby activates ERK1/2 constitutively. We demonstrated that caMEKK1 induced ERK1/2 phosphorylation in LNCaP cells knocked-down or not for NPM1, suggesting that this constitutive activation rescues EGFR signalling pathway and that NPM1 functions downstream of the EGFR but upstream of MEKK1 to regulate ERK1/2 (figure 5a). Moreover, caMEKK1 construct also rescues EGF promoter activity (figure 5b).

These results demonstrated that NPM1 does not impact directly the EGF promoter activity in prostate cancer cells but that it stimulates EGF expression by acting *via* the ERK1/2 pathway.

Discussion

NPM1 is a multifunctional nucleolar phospho-protein that plays an essential role in cell growth and proliferation by regulating cell cycle progression, ribosome biogenesis and centrosome duplication (7, 9, 10). Through its multiples functions NPM1 acts as a key regulator for many cellular activities, mechanisms deregulated in a wide variety of cancer. Therefore, NPM1 is frequently over-expressed in solid tumour of diverse histological origins, such as gastric cancer (11, 12), colon (12), kidney (13) or ovaries tumours (14), and correlation between NPM1 expression level and tumour progression were established. Nevertheless several studies revealed that NPM1 acts as both tumour suppressor and proto-oncogene during tumourigenesis (8). On the one hand, NPM1 is a potential tumour suppressor by maintaining chromosome stability and regulating ARF activity (15). On the other hand, NPM1 functions as a tumour promoter through inhibition of several tumour suppressors including P53 and Rb or interaction with the proto-oncogene c-Myc to enhance its transforming activity (16). Our previously finding show that the molecular chaperone NPM1 is over-expressed in prostate carcinoma tissue, compared to control adjacent tissue (2). To investigate its role in prostate cancer, we used down-regulation assays in LNCaP prostate cancer cell lines whose tumour characteristics such as migration, proliferation and invasion capacities are well established. We show that NPM1 is a positive regulator of clonogenic and proliferation capacities of prostate cancer cells and that this is associated with the control of migration and invasion. These decreased properties of tumour cells which are knock-downed or inhibited for NPM1 have to be correlated with the inhibition of tumour growth in nude mice xenograft assay. Similarly, an over-accumulation of NPM1 in LNCaP cells increases the number and the size the clones (data not shown). These results demonstrate that NPM1 expression level is involved in prostate cancer progression characteristics. In accordance with these findings, a recent study show that the elevated expression of NPM1 correlated with distant metastasis and poor survival of patients with colon cancer. It also provided evidence that the expression level of NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells (17). One of the mechanisms targeted in prostate cancer treatment, is androgenic signalling by using anti-androgens. Although, NPM1 enhances the action of AR in prostate cancer cells (2), its effects on proliferation, migration and invasion capacities seems to be androgen receptor independent. In fact, phenotypic defects observed in LNCaP cells decreased for NPM1 are similar in PC-3 cells, which are characteristic of a metastatic state and have the particularity to be null for the androgen receptor.

Beside androgen receptor transactivation, tumour progression is associated to altered gene expression and activation of signalling pathway consecutive to the setting of growth factors self-regulation loop. Such a self-regulation loop is a characteristic of advanced localized cancer and of therapy resistant cancer. The increased sensitivity to EGF and the sustained activation of EGF/EGF receptor complex and of downstream signalling pathways are clearly associated to prostate tumour progression. Other evidence that EGF signalling through the EGFR is important in prostate cancer cells proliferation is that (i) human prostate cell lines produce EGF (18), (ii) express EGFR *in vitro* (19) and *in vivo* (20), and addition of EGF to culture of prostate cancer cells stimulates growth (21). It has been shown that EGF expression may be higher in prostate cancer than benign prostate (22), and that the establishment of an EGF-dependent autocrine loop involving the ERK1/2 transducers contributes to the autonomous growth of human prostate cancer (23). Moreover, in the TRAMP mouse model, ERK1/2 activation is linked to prostatic epithelial proliferation and initiation of prostate cancer progression (24). Other important issue of this pathway in tumour development is that the phosphorylation by ERK1/2 of proteins such as myosin, calpain, focal adhesion kinase and paxillin promotes cancer cell migration (25). Also, ERK1/2 can promote the degradation of extracellular matrix proteins and consequent tumour invasion (26). Accordingly, these data led us to investigate if NPM1 protein could interfere with EGF signalling and our results highlight that it's involved in EGF expression and more especially in EGF transcription regulation. Moreover, the more detailed analysis of promoter activity revealed that NPM1 is a positive regulator of EGF promoter activity. In fact, in cells down-regulated for NPM1, EGF mRNA level and EGF promoter activity are decreased. Interestingly, this decrease is associated with an alteration of EGF receptor pathway activation i.e. an abrogation of ERK1/2 phosphorylation. This data suggested that NPM1 is involved in the setting of the self-regulation loop EGF dependent. Interestingly, supplementation assay demonstrated that even if NPM1 partially controls EGF expression, the major impact of NPM1 seems to occur on ERK1/2 pathway activation downstream of EGFR. This regulation of ERK1/2 activation could be involved in proliferation, migration and invasion phenotypes observed in prostate cancer cells. Our results show that exogenous intake of EGF rescues partially EGFR activation but not ERK1/2 phosphorylation. Moreover, despite EGF intake, proliferation and migration capacities of cells inhibited to NPM1 expression are not restored. In accordance with our data, several studies reported that EGF acts as an enhancer of cells invasion and migration by activation of signal transduction via mitogen activated protein kinases (MAPKs), especially ERK1/2 pathways (27-29). We also demonstrated that NPM1 does not impact directly EGF promoter, as transfection with a constitutive activated MEKK1 leading to constitutive activation of ERK1/2 pathway rescues ERK1/2 phosphorylation and above all, EGF promoter activity in cells down-regulated for NPM1. Moreover, EGF can activate ERK1/2 and also PI3K/AKT pathways. The latter is not affected by NPM1 expression

level and is always responsive to EGF stimulation. Altogether, these data suggested that the involvement of NPM1 in the setting of EGF self-regulation loop, and in the stimulation of EGF promoter activity, takes place following specific activation of the EGF dependent pathway ERK1/2. We can suppose that this regulation may be occur through k-RAS specific interaction and its level stabilization on the plasma membrane leading to the increase of the MAPK pathway and especially to ERK1/2 activation (30).

Altogether, this data demonstrated that NPM1 is a positive regulator of cell invasion, proliferation and migration by controlling the EGF-dependent self-regulation loop and that it promotes ERK1/2 activation, involved in proliferation of prostate cancer cells. Some tyrosine kinase inhibitors (*e.g.* gefintinib) that target the EGF receptor have already been tested in clinical trials against HRPC, but it lacks some valuable effects when used in monotherapy (31) consecutively to a therapeutic escape. EGFR kinase inhibition induces HER kinase receptors to engage in alternative dimerization that can ultimately influence therapeutic selection and responsiveness (32) by maintaining an active MAPK signaling. Decreasing NPM1 expression represents a mean to specifically turn off the ERK1/2-dependent proliferation downstream of EGFR without altering the PI3K/AKT survival pathway. A combinatorial use of tyrosine kinases and NPM1 inhibitors may then have relevance in the clinical evolution of PCa.

Materials and methods

Cell culture and stable transfection

LNCaP cells were cultured in phenol red Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Saint-Aubin, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). For depletion of NPM1 we performed stable transfection using B23 shRNA lentiviral particles recommended for the inhibition of B23 expression in human cells. Lentiviral particles are a pool of concentrated transduction-ready viral particles containing three target-specific constructs that encode 19-25 nucleotides shRNA (sc-29771-V, Santa Cruz, Heidelberg, Germany). Puromycine at 1µg ml-1 was added to select stably transduced cells after infection and monoclonal selection was performed using limited dilution.

Wound healing migration assay

LNCaP cells control (shScr) and inhibited for NPM1 expression (shNPM1) were seeded in a 24-well plate and grown to confluence for 24 hours. The monolayer culture was then scrape-wounded with a

sterile micropipette tip in order to create a gap of constant width. After removing the cellular debris with Phosphate Buffered Saline 1X (PBS) (Gibco, Saint-Aubin, France) cells were grown in RPMI 1640 10%FBS and medium was replaced 12hrs after wound and then every 24 hours. LNCaP cells that migrated to the wounded region were observed by inverted microscopy and photographed at 24, 48 and 72 hours following scraping (100x magnification). Histograms show wound areas following quantification with Image J software.

Boyden Chamber invasion assay

The polycarbonate filter (8µm pore) of insert was pre-coated with matrigel at the bottom of the 12-well plate. $3x10^5$ LNCaP shScr and shNPM1 cells were seeded in serum free RPMI 1640 in inserts at confluence. Complete medium (10%FBS) was applied to the lower chamber as chemoattractant. Cells were incubated for 24 to 48 hours at 37°C. At the end of the incubation, the cells in the upper surface of the membrane were carefully removed with a cotton swab and the cells that invaded the lower of the membrane were fixed with methanol and stained with 5% Giemsa solution. The invaded cells were observed under microscope and photographed (100x or 200x magnification).

Soft agar colony formation assays

A 2ml of lower layer of 0.6% low melting agarose (agarose Sea plaque FMS product low melting, 50101, LONZA, Ozyme, Montigny-le-bretonneux, France) in RPMI 1640, 10%FBS was placed into each well of 6-well plate. After agar solidified, 500µl of 0.3% agarose in RPMI1640, 10%FBS containing $5x10^3$ LNCaP shScr or shNPM1 cells was added to each well. The cells were fed in every 3-4 days with RPMI 1640, 10%FBS. The plates were incubated at 37°C, in 5% CO_2 incubator for 2 weeks. Colonies were visualized under inverted microscope and photographed (100x magnification).

Clonogenic assay

$1x10^4$ LNCaP shScr and shNPM1 cells were seeded, in a 6-well plate at low confluence in RMPI 10%FBS. The medium was changed in every 3-4 days. After 2 weeks, medium was removed, cells washed with PBS1X, fixed with methanol and stained with 5% Giemsa solution. The colonies were visualized and photographed under inverted microscope (100x magnification).

Cell proliferation assay

Cell proliferation was performed with Cell proliferation ELISA BrdU colorimetric kit (Roche, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly $5x10^3$ LNCaP shScr or shNPM1 cells, treated or not with different concentrations of EGF (E9644, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), were seeded in a 96-well plate in a final volume of 200µl per well and incubate 24hrs. Then BrdU labelling solution was added at final concentration of 10µM during 2.5 hours. After fixation, anti BrdU-POD solution was added during 1 hour, and DO was measured at 655nm.

Western Blotting

Cells previously seeded were harvested using Buffer C supplemented with Nonidet-40, phosphatase inhibitors (NaF, Na_3VO_4) and the protease inhibitor IP25X (cOmplete Roche, Meylan, France). Total proteins (40 µg) were boiled in Laemmli sample buffer and subjected to SDS–PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Biosciences, Life sciences, Velizy-Villacoublay, France) followed by blocking in Tris-buffered saline 1×, 10% powdered milk, and incubated with indicated antibodies in the same buffer overnight at 4°C. Membranes were washed 3 times with Tris-buffered saline 1×, 0.05% Tween 20, and then incubated 1 hour with appropriate secondary antibodies peroxidase-conjugated IgG (P.A.R.I.S, Compiègne, France). Detection was performed using the ECL system (PerkinElmer Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Three independent experiments were used for analysis with Quantity One (Bio-Rad). The antibodies using were anti-actin (A2066, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-NPM1 (sc-6013-R, Santa Cruz, Heidelberg, France), anti-EGFR (NB100596, Novus), anti-phospho-EGFR Tyr 1068 (2236S, Cell Signaling, Ozyme, Montigny-le-bretonneux, France), anti-ERK1/2 (M5670, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-phospho-ERK1/2 p42/44 (9101S, Cell Signaling, Ozyme, Montigny-le-bretonneux, France), anti-AKT (9272, Cell signaling, Ozyme, Montigny-le-bretonneux, France) and anti-phospho-AKT Ser 473 (2118-1 Epitomics).

Promoter construct, transfection and luciferase assays

The human EGF promoter fragment (-392/+123) was generated using the following primers: 5'-GATCAAGCTTGGGCTGAAGGTGAACTATCTTTAC-3' (Forward) and 5'-GATCCTCGAGGACAGAGCAAGGCAAAGGCTTAGA-3' (Reverse) and cloned into the HindII/XhoI restriction sites in pGL3-basic vector (Promega, Charbonnieres, France). The constitutively active MEKK1 (caMEKK1) expression plasmid was a kind gift from Dr. Dirck Bohmann (University of Rochester Medical Center, Rochester, USA). The pGL3-hEGF and/or caMEKK1 plasmids were transfected in LNCaP shScr and shNPM1 cells in OPTI-MEM using Metafectene transfectant according

to the manufacturer's instructions (Biontex, Martinsried-Planegg, Germany). Twenty-four hours after transfection, cells were lysed into Reporter lysis buffer 1X (Promega, Charbonnieres, France) and the luciferase activity was measured with the assay system Genofax A (Yelen, Ensue la Redonne, France).

Preparation of RNA and real-time quantitative PCR

Total cellular RNA were extracted using TRIzol reagent and reverse transcribed with Random Primers (C1181, Promega, Charbonnieres, France). mRNA levels were quantitated using real-time RT-PCR technology (MasterCycler2, Eppendorf, Le Pecq, France) with Mesagreen QPCR Mastermix plus for SYBR (Promega, Charbonnieres, France). For human EGF, primers were from Qiagen (Qiagen, Courtaboeuf, France). For NPM1 the primers were 5'-ATGGAAGATTCGATGGACATGG-3' (Forward) and 5'-CGAGAAGAGACTTCCTCCACTGC -3' (Reverse), PCNA: 5'-TGCCTTCTGGTGAATTTGCACGT-3' (Forward) and 5'- ACCGTTGAAGAGAGTGGAGTGGC-3' (Reverse), Actin: 5'-CGCGAGAAGATGACCCAGATC-3' (Forward) and 5'TCACCGGAGTCCATCACGA-3' (Reverse) (Eurogentec, Angers, France).

In vivo Nude mouse tumour Xenograft model

LNCaP cells shScr and shNPM1 were grown to confluence, and then cells were resuspended in matrigel (BD matrigel Basement membrane matrix phenol red free, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) to a concentration of $3x10^6$ cells. Cell suspension (300µl) was injected subcutaneously in 6 weeks old nude mice (Swiss NU/NU, Charles River, L'Arbresle, France). Tumour sizes were measured for 3 to 4 weeks and when mice were sacrificed, tumours were dissected and weighed.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by the Region Auvergne. We are grateful to Marcin Ratajewski for helpful caMEKK1 construct, Angélique De Haze and Jean-Paul Saru for technical assistance.

References

1. Grisendi S, Mecucci C, Falini B and Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; **6**: 493-505.
2. Leotoing L, Meunier L, Manin M, Mauduit C, Decaussin M, Verrijdt G*, et al.* Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. *Oncogene*. 2008; **27**: 2858-67.
3. Szebeni A, Herrera JE and Olson MO. Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry*. 1995; **34**: 8037-42.
4. Savkur RS and Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA byprotein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*. 1998; **26**: 4508-15.
5. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M and Nagata K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett*. 2001; **506**: 272-6.
6. Takemura M, Sato K, Nishio M, Akiyama T, Umekawa H and Yoshida S. Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. *J Biochem*. 1999; **125**: 904-9.
7. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK*, et al.* Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*. 2000; **103**: 127-40.
8. Di Fiore PP. Playing both sides: nucleophosmin between tumor suppression and oncogenesis. *J Cell Biol*. 2008; **182**: 7-9.
9. Lindstrom MS. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem Res Int*. 2011; **2011**: 195209.
10. Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem*. 2008; **143**: 441-8.
11. Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T and Terada M. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res*. 1992; **52**: 3372-7.
12. Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, Dinjens WN and Bosman FT. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol*. 1996; **178**: 48-52.
13. Sari A, Calli A, Altinboga AA, Pehlivan FS, Gorgel SN, Balci U*, et al.* Nucleophosmin expression in renal cell carcinoma and oncocytoma. *Apmis*. 2011; **120**: 187-94.
14. Shields LB, Gercel-Taylor C, Yashar CM, Wan TC, Katsanis WA, Spinnato JA*, et al.* Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. *J Soc Gynecol Investig*. 1997; **4**: 298-304.
15. Brady SN, Yu Y, Maggi LB, Jr. and Weber JD. ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol*. 2004; **24**: 9327-38.
16. Li QF, Tang J, Liu QR, Shi SL and Chen XF. Localization and altered expression of nucleophosmin in the nuclear matrix during the differentiation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells induced by HMBA. *Cancer Invest*. 2010; **28**: 1004-12.
17. Liu Y, Zhang F, Zhang XF, Qi LS, Yang L, Guo H*, et al.* Expression of Nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. *J Biomed Sci*. 2012; **19**: 53.
18. Connolly JM and Rose DP. Production of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha by the androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cell line. *Prostate*. 1990; **16**: 209-18.
19. Tillotson JK and Rose DP. Endogenous secretion of epidermal growth factor peptides stimulates growth of DU145 prostate cancer cells. *Cancer Lett*. 1991; **60**: 109-12.
20. Traish AM and Wotiz HH. Prostatic epidermal growth factor receptors and their regulation by androgens. *Endocrinology*. 1987; **121**: 1461-7.
21. Jones HE, Eaton CL, Barrow D, Dutkowski CM, Gee JM and Griffiths K. Comparative studies of the mitogenic effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha and the

expression of various growth factors in neoplastic and non-neoplastic prostatic cell lines. *Prostate*. 1997; **30**: 219-31.
22. Davies P and Eaton CL. Binding of epidermal growth factor by human normal, hypertrophic, and carcinomatous prostate. *Prostate*. 1989; **14**: 123-32.
23. Scher HI, Sarkis A, Reuter V, Cohen D, Netto G, Petrylak D*, et al.* Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res*. 1995; **1**: 545-50.
24. Junttila MR, Li SP and Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *Faseb J*. 2008; **22**: 954-65.
25. Huang C, Jacobson K and Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*. 2004; **117**: 4619-28.
26. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003; **253**: 269-85.
27. Jarrad DF, Blitz BF, Smith RC, Patai BL and Rukstalis DB. Effect of epidermal growth factor on prostate cancer cell line PC3 growth and invasion. *Prostate*. 1994; **24**: 46-53.
28. Anand M, Van Meter TE and Fillmore HL. Epidermal growth factor induces matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression and invasion in glioma cell lines via the MAPK pathway. *J Neurooncol*. 2011; **104**: 679-87.
29. Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ*, et al.* Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem*. 2011; **112**: 2508-17.
30. Inder KL, Lau C, Loo D, Chaudhary N, Goodall A, Martin S*, et al.* Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. *J Biol Chem*. 2009; **284**: 28410-9.
31. Small EJ, Fontana J, Tannir N, DiPaola RS, Wilding G, Rubin M*, et al.* A phase II trial of gefitinib in patients with non-metastatic hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int*. 2007; **100**: 765-9.
32. Jain A, Penuel E, Mink S, Schmidt J, Hodge A, Favero K*, et al.* HER kinase axis receptor dimer partner switching occurs in response to EGFR tyrosine kinase inhibition despite failure to block cellular proliferation. *Cancer Res*. 2010; **70**: 1989-99.

Supplementary Materials and methods

Cell culture and transient transfection

PC-3 cells were cultured in phenol red Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Saint-Aubin, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and gentamycin (50µg ml^{-1}). For depletion of NPM1, transient transfections were performed using 2 siRNA duplexes : 5'-CCACAGAAAAAAGUAAAACTT-3' and 5'-UGAUGAAAAUGAGCACCAGTT-3'. GFP siRNA duplex (5'-ACTACCAGCAGAACACCCCTT-3') was used as a control (MWG, operon). $3.5x10^5$ cells per well were plated in 6-well plates and transfected at the same time by electroporation (Nucleofector® II, Lonza) and maintained for 48hrs to 72hrs in medium.

Wound healing migration assay

PC-3 cells were seeded in a 24-well plate and grew to confluence for 24 hours. The monolayer culture was then scrape-wounded with a sterile micropipette tip in order to create a gap of constant width. After removing the cellular debris with Phosphate Buffered Saline 1X (PBS) (Gibco, Saint-Aubin, France), LNCaP cells were exposed continually to various concentrates of NSC348884, an inhibitor of NPM1 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were then grown in RPMI 1640 10% FBS and medium was replaced 12hrs after wound and then every 24hrs. Cells migrated to the wounded region were observed by inverted microscope and photographed at 24hrs, 48hrs and 72hrs (100x magnification). The wound area was measured by the program Image J.

Boyden Chamber invasion assay

The polycarbonate filter (8µm pores) of insert was pre-coated with matrigel as the bottom of the 12-well plate. $3x10^5$ PC-3 cells siGFP or siNPM1 were seeded in FBS free RPMI 1640 in insert in order to be at confluence. RPMI 1640 medium containing 10% FBS was applied to the lower chamber as chemoattractant. Cells were incubated for 24 to 48hrs at 37°C. At the end of the incubation, the cells

in the upper surface of the membrane were carefully removed with a cotton swab and the cells that invaded the lower of the membrane were fixed with methanol and stained with 5% Giemsa solution. The invaded cells were observed under microscope (100 or 200x magnification).

Flow cytometry analysis

LNCaP cells were seeded in RPMI 1640 10%FBS before 24 hours of serum starvation. Twenty four hours later, cells were treated with NSC348884 at 1µM in RMPI 1640 10%FBS. LNCaP cells were washed with PBS 1x and pelleted immediately, 12 hours and 24 hours after cell cycle released. For flow cytometry, pellets were resuspended in an RNase A (500µg/ml) propidium iodide (50µg/ml) solution. Cells suspensions were analysed using a Backman Coulter fluorescence-activated cell sorter. The percentage of apoptotic cells was determined by evaluating sub G1 nuclei accumulation. At less 15000 events were measured for each sample.

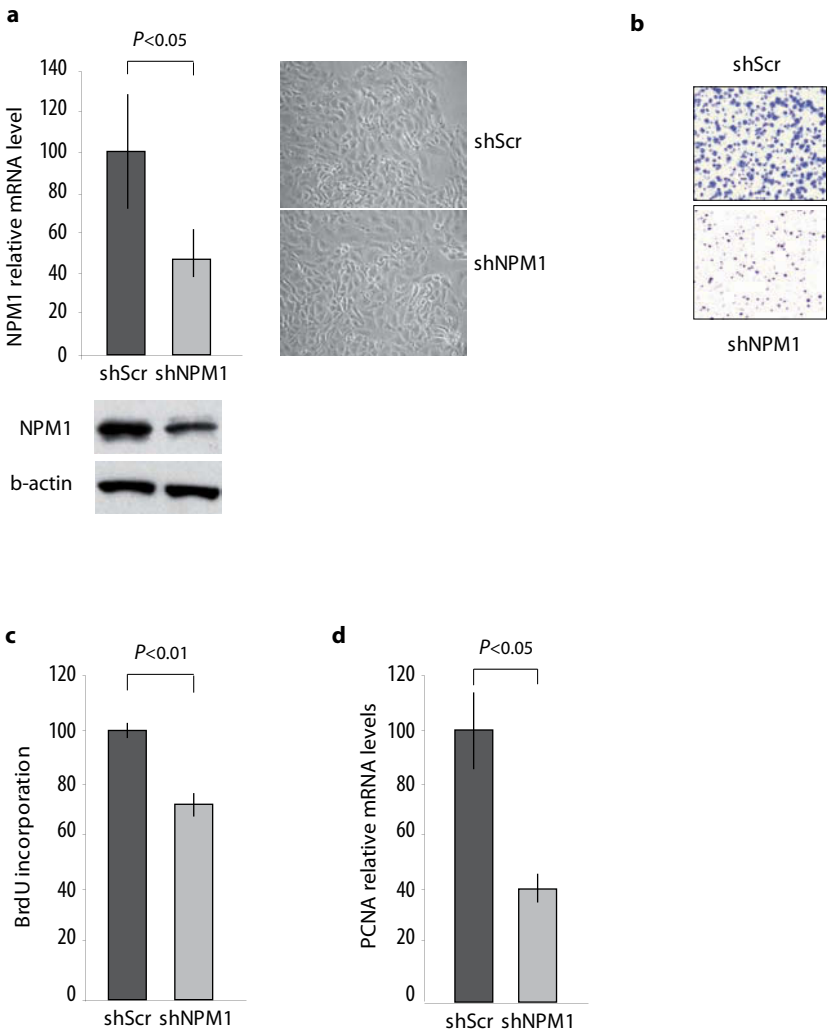
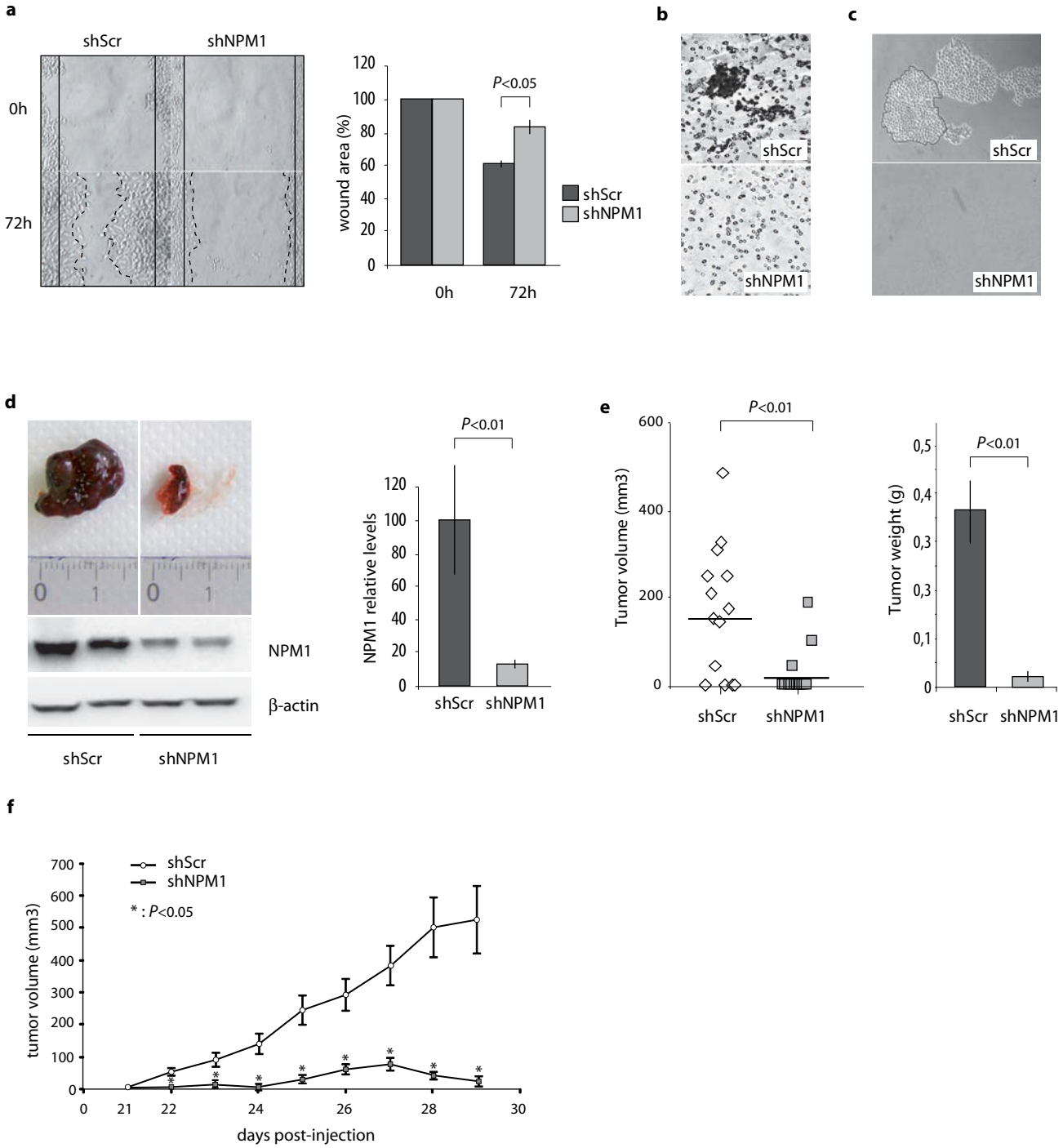


Figure 1: Regulation of LNCaP cells clonogenic capacities and proliferation rate by NPM1. (a) NPM1 knock-down does not alter LNCaP cells morphology. LNCaP cells were transfected with control shRNA (shScr) or specific NPM1 shRNA (shNPM1). NPM1 mRNA and protein levels were analysed by RT-qPCR and western blotting respectively. Morphology of cells was observed by inverted microscopy and photographed. **(b)** NPM1's knock-down inhibits LNCaP cells clonogenicity. Cells were seeded at low confluence over one week, then fixed with methanol and stained with 5% Giemsa blue before microscopic observation. Pictures are representative of three independent experiments with consistent results. (c, d) NPM1 control proliferation of prostate cancer cells. Five thousand cells were seeded per well in a 96-wells plate and cultured for 48hrs. **(c)** Cells were then incubated with a BrdU labeling solution for 2.5hrs and and BrdU incorporation was measured by densitometric analysis at 655 nm. **(d)** Proliferation was also analysed by RT-qPCR assay by evaluating PCNA relative mRNA levels accumulation normalized using β-actin mRNA level. All data are representative of at least three independent triplicate experiments and BrdU incorporation as mean of triplicate experiments of 96 points each.



<u>Figure 2:</u> NPM1 knock-down impacts migration, invasion and growth of prostate cancer cells. (a) NPM1 controls migration capacities of LNCaP cells. Cells were seeded at confluence in order to create a wound 24hrs later. Wound recolonization was observed after 72h of culture by inverted microscopy and photographed. Histograms show wound area quantification using Image J and pictures are representative of three independent experiments with consistent results. **(b)** NPM1 knock-down inhibits the invasive potential of prostate cancer cells. shScr and shNPM1 LNCaP cells were seeded at confluence in RPMI 1640 without FBS on matrigel coated microporous membrane. 48hrs later, migrated cells present on the opposite side of the membrane were fixed and stained with 5% Giemsa blue and observed at microscope (200 x magnification). **(c)** NPM1 impacts three-dimensional growth of prostate cancer cells. Control or NPM1 knock-downed cells were seeded at low confluence on agarose/RPMI 1640 10% FBS for 2 weeks. Number and size of the emerging clones were then observed under inverted microscope and photographed. **(d, e, f)** NPM1 knock-down abrogates tumorigenicity of LNCaP cells when injected in nude mice. shScr (n=14) and shNPM1 (n=14) LNCaP cells were subcutaneously grafted on nude mice and tumour size was measured for 5 weeks following engraftment. Tumour weight was measured when mice were sacrified. The data shown in (a), (b) and (c) are representative of at least three independent experiments.

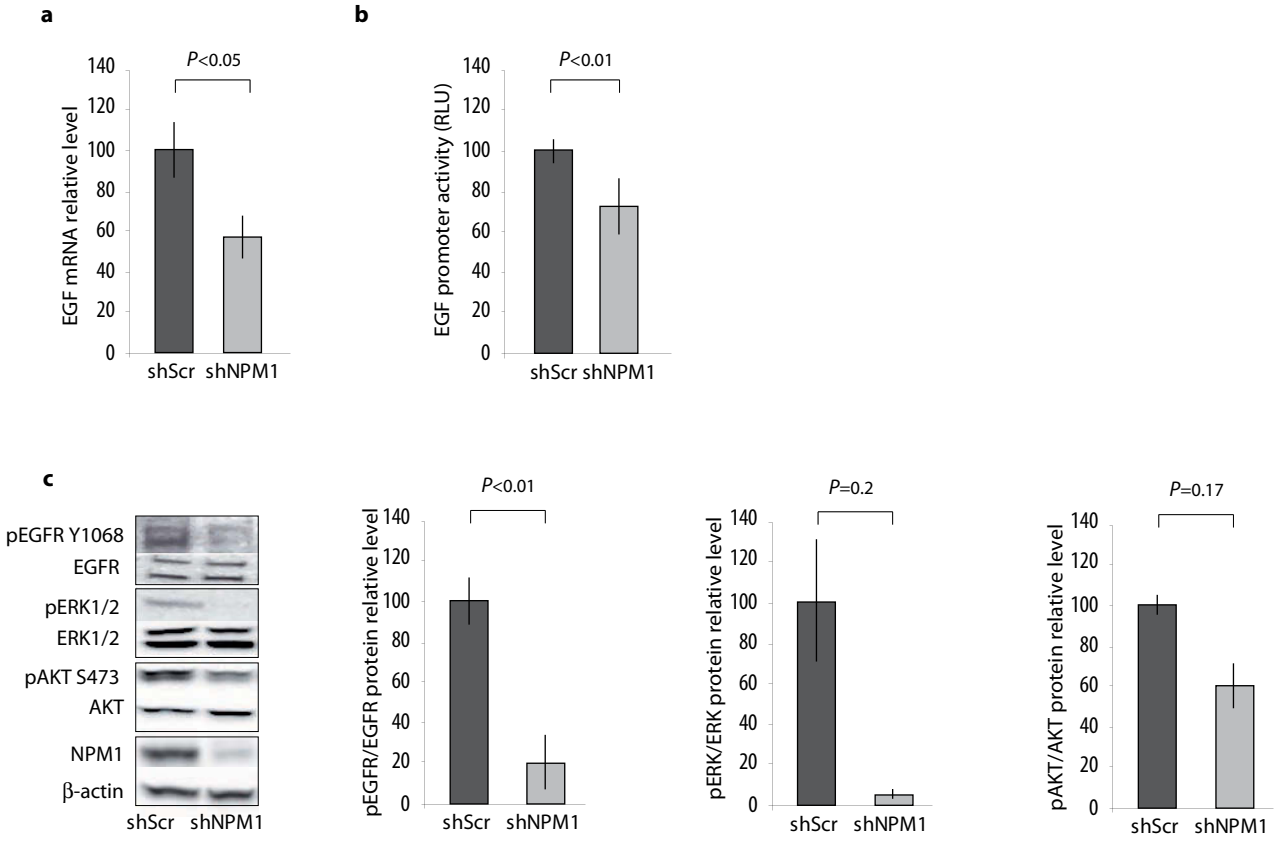


Figure 3: NPM1 knock-down decreases EGF expression. (a) NPM1 controls EGF expression. Relative EGF mRNA levels were analyzed by RT-qPCR in LNCaP cells expressing control (shScr) or NPM1 specific shRNA (shNPM1). **(b)** NPM1 control EGF promoter activity. LNCaP shScr and shNPM1 cells were transfected with the phEGF-luciferase reporter plasmid. EGF promoter activity was evaluated by measuring the luciferase activity 24hrs later. Results of the assay were standardized using the CMV promoter as control and expressed as fold-induction over control cells (shScr). **(c)** NPM1 controls activation of the EGF/EGFR pathway downstream effectors. Proteins, extracted from LNCaP cells shScr and shNPM1 cultured in RPMI 1640 10%FBS, were electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with indicated antibodies. Histograms show the band quantification reported to the actin level. The blot is representative of three independent experiments with consistent results. The data shown in (a) and (b) are representative of at least three independent experiments.

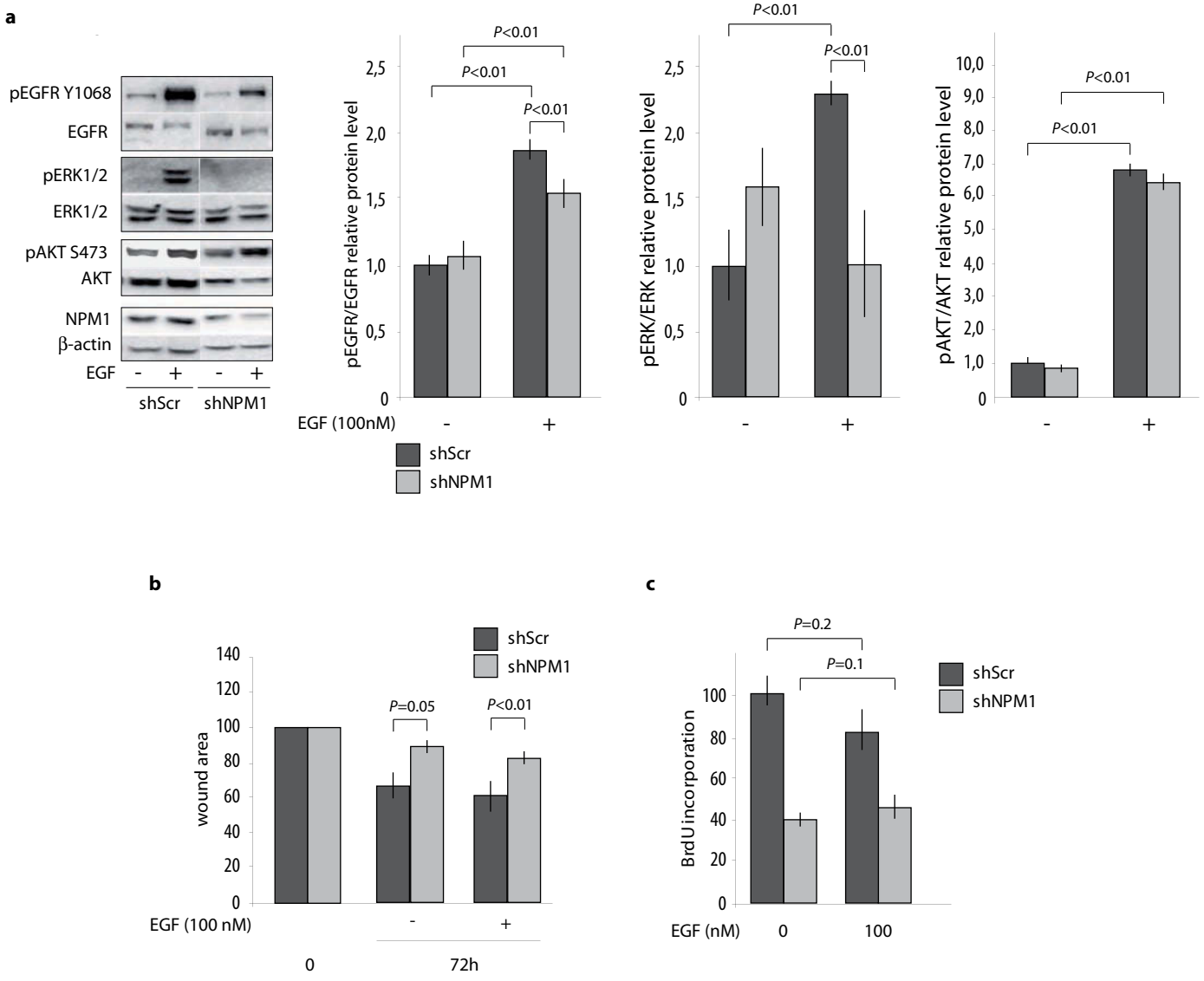
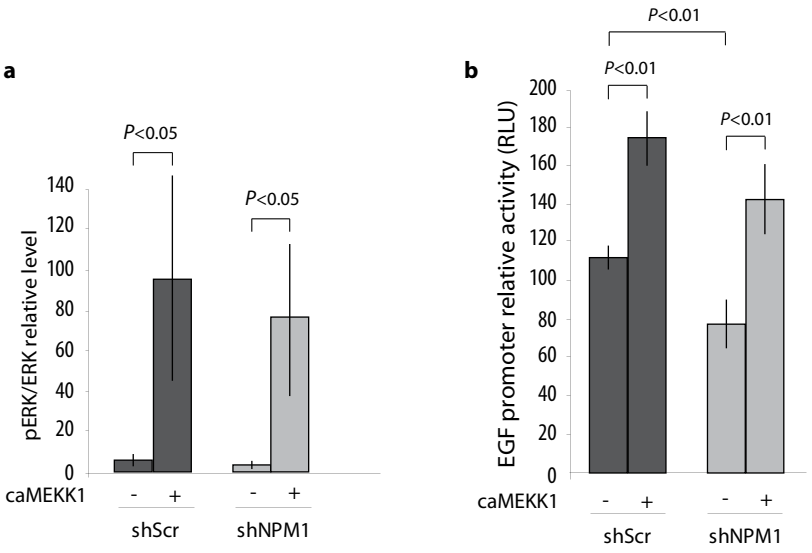
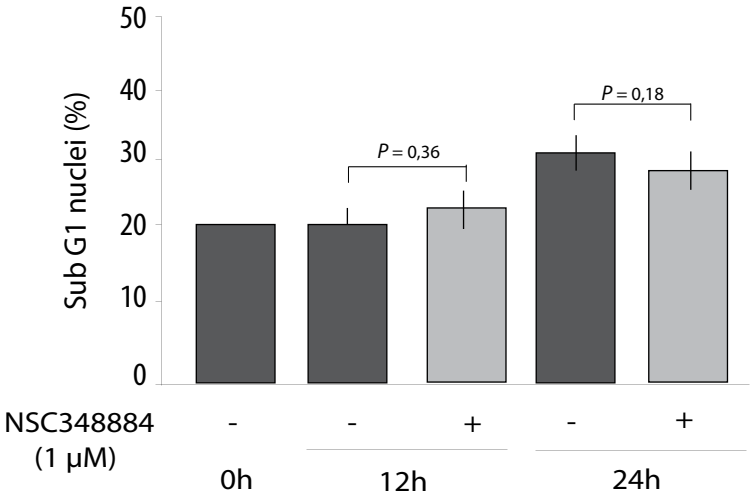


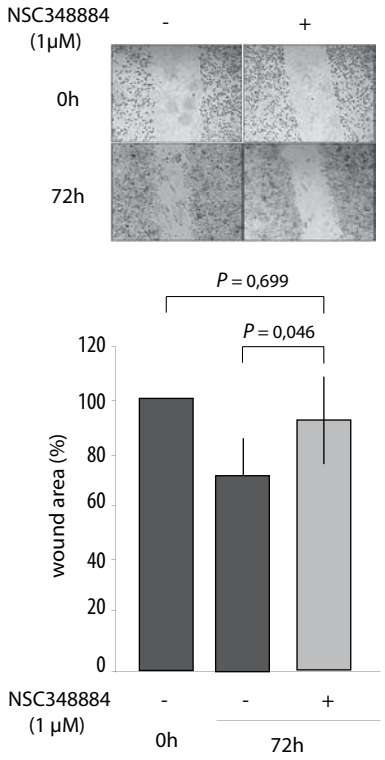
Figure 4: NPM1 knock-down in prostate cancer cells reduces proliferation and migration capacities by inhibiting the EGF/EGFR pathway activity. (a) NPM1 downregulation inhibits EGF induced ERK1/2 pathway activity. LNCaP shScr and shNPM1 cells were treated with 100nM EGF and EGF/EGFR pathway effectors phosphorylation was analysed using Western Blotting. Histograms show the band quantification reported to the actin level. The blot is representative of three independent experiments with consistent results. **(b)** Despite EGF treatment, migration capacities of LNCaP downregulated for NPM1 were not restore. Wound closure, in LNCaP shScr and shNPM1, was analysed 72hrs after continuous treatment with 100nM EGF. Cells were observed under inverted microscope and photographed. Histograms show wound area quantification using Image J. **(c)** EGF treatment does not rescue proliferation of NPM1 knock-down LNCaP cells. BrdU incorporation assay was performed in LNCaP shScr and shNPM1 24hrs after 100nM EGF treatment. Densitometry was measured at 655nm. Data (b) and (c) are shown as mean of triplicate experiments.



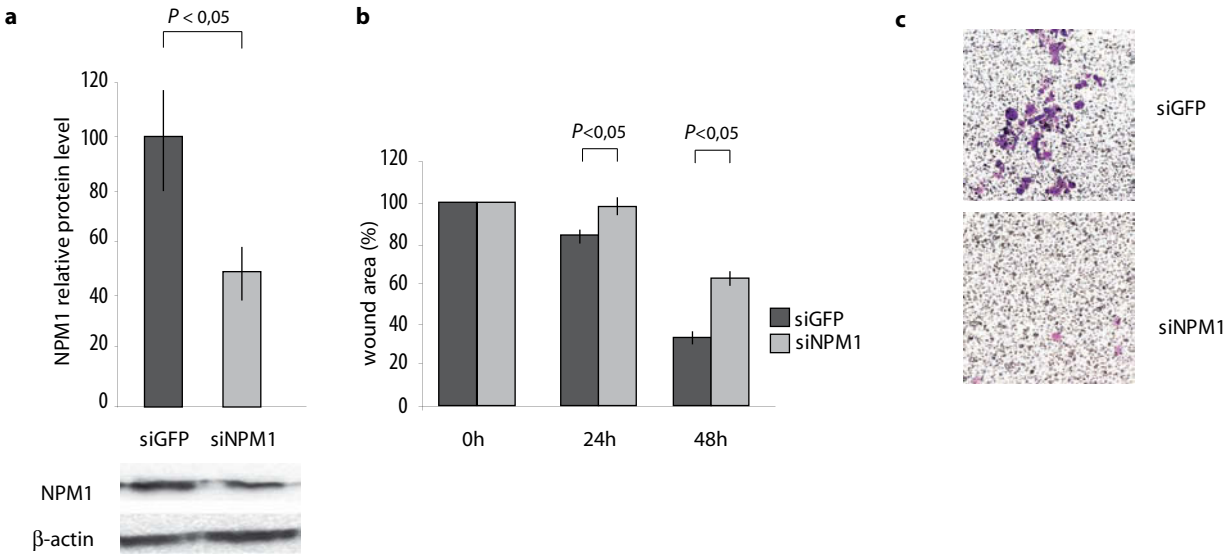
<u>Figure 5:</u> NPM1 does not act directly on EGF expression but upstream of the MEKK effector to activate the MAPK pathway in prostate cancer cells. (a) ERK1/2 activation is rescued by caMEKK1. LNCaP shScr and shNPM1 cells are transfected with a constitutively activated construct of MEKK1 (caMEKK1) and ERK1/2 phosphorylation level was analysed using western blotting. **(b)** ERK1/2 pathway activation restore EGF promoter activity in LNCaP cells downregulated for NPM1. LNCaP shSCR and shNPM1 cells were transiently co-transfected with phEGF and caMEKK1. EGF promoter activity was evaluated by measuring the luciferase activity 24hrs after. Results of the assay were standardized against control reporter activity CMV-Luc and expressed as fold-induction over control cells (shScr).



<u>Supplementary figure 1:</u> NPM1 knock-down does not induce LNCaP cells apoptosis. LNCaP cells were seeded and serum starved for 24 hours in order to block their cycle in the G0/G1 phase. Once synchronized, cells were released by addition of serum then treated with NSC348884 1µM and collected immediately, 12 hours or 24 hours later for flow cytometry analysis and apoptose measurement.



<u>Supplementary figure 2:</u> NPM1 inhibition by a specific inhibitor leads to a decrease of prostate cancer cells migration capacities. LNCaP cells were seeded at confluence in order to create a wound 24hrs later and exposed continually to 1µM NSC348884. Migration capacities of cells were photographed after 72hrs of culture by inverted microscopy (100x magnification). Histograms show wound areas following quantification with Image J software. Pictures are representative of three independent experiments with consistent results.



<u>Supplementary figure 3:</u> NPM1 knock-down impacts migration and invasion capacities of androgen receptor null prostate cancer cells. (a) PC-3 cells were transiently transfected using control siRNA (siGFP) or specific NPM1 siRNA (siNPM1). mRNA and protein levels of NPM1 were analysed respectively by RT-qPCR and Western Blotting. **(b)** NPM1 controls migration capacities of PC-3 cells. PC-3 siGFP and siNPM1 cells were plated at confluence in order to create a wound 24hrs following seeding. Cells were photographed 72hrs later by inverted microscopy (100x magnification). Histograms show wound areas following quantification with Image J software. **(c)** NPM1 downregulation has an impact on the invasive potential of PC-3 cells. siGFP and siNPM1 transfected PC-3 cells were seeded at confluence in RPMI 1640, 0%FBS on matrigel in inserts. 48hrs later, cells that invaded the lower of the membrane were fixed and stained with 5%Giemsa and observed at microscope (200 x magnification). The data shown are representative of at least three independent triplicate experiments.

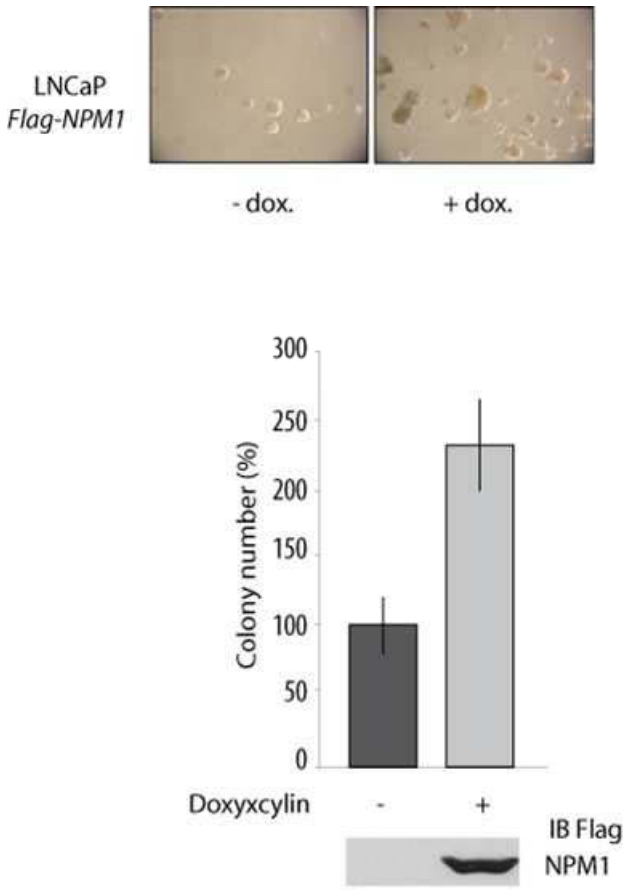


Figure 40 : Analyse de la clonogénicité des cellules tumorales de prostate suite à la surexpression de NPM1

Les cellules stablement transfectées ou non avec la construction Flag-NPM1 sont ensemencées à faible confluence dans un milieu agarose/RPMI1640 10% SVF pendant 2 semaines. Le nombre et la taille des colonies sont ensuite déterminés par une observation microscopique.

3) Résultat complémentaire à l'article en cours de soumission

Quel est l'impact d'une surexpression de NPM1 sur la clonogénicité des cellules tumorales de prostate ?

Les données sur la clonogénicité des cellules LNCaP montrent que la diminution de l'accumulation de la protéine entraîne une diminution de la capacité des cellules à former des clones en absence d'ancrage. Nous avons choisi de conduire le même type d'analyse suite à la surexpression de NPM1 dans ces mêmes cellules. Pour cela nous avons transfecté les cellules avec une construction Flag-NPM1, inductible par la doxycycline, permettant la surexpression de la protéine. Nos résultats mettent en évidence que la surexpression de NPM1 entraîne une augmentation du nombre et de la taille des colonies formées en agar mou par rapport aux cellules contrôles qui n'expriment pas la construction. NPM1 est donc impliquée dans l'acquisition des capacités de croissance des cellules tumorales de prostate en absence d'ancrage **(figure 40)**.

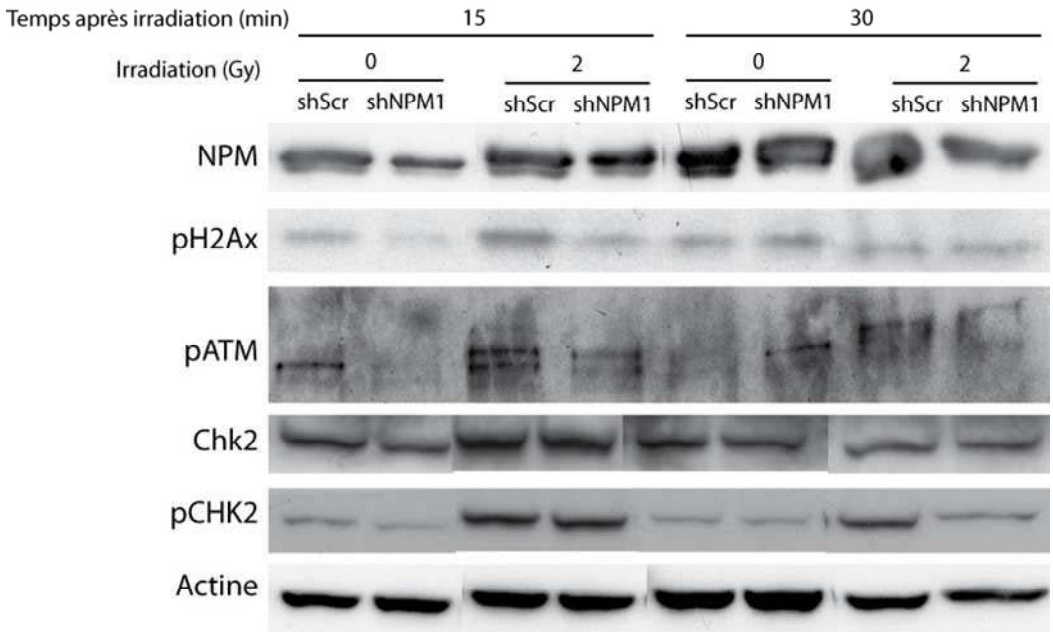


Figure 41: Analyse des marqueurs de réparation dans les cellules LNCaP contrôles et inhibées pour NPM1

Les cellules LNCaP shScr et shNPM1 ont été soumies ou non à une irradiation de 2 Gray, 24 heures après ensemencement. Les protéines extraites 15 ou 30 minutes après irradiation ont été séparées par électrophorèse avant immunodétection des protéines de réparations pH2AX, pATM, Chk2 et pChk2. L'actine est un témoin de charge.

4) Résultats complémentaires

Le niveau d'accumulation de NPM1 a-t-il un impact sur le processus de réparation mis en place suite à l'exposition des cellules aux radiations ionisantes ?

Comme il sera plus amplement développé dans le deuxième paragraphe de la partie Discussion et Perpectives, des données bibliographiques mettent en évidence que NPM1 a un rôle dans la reconnaisance des cassures doubles brins provoquées par les rayons et la mise en place du processus de réparation. Afin de savoir si NPM1 exerce un rôle similaire dans les cas de cancers de la prostate, nous avons analysé par Western Blot l'état d'activation des acteurs de la cascade de réparation. Nous avons pour cela utilisé les cellules de la lignée LNCaP diminuées ou non pour l'expression de NPM1 et irradiées à une dose de 0 ou 2 Gray. Les résultats obtenus montrent que la combinaison de l'inhibition de NPM1 avec des irradiations de 2 Gray, entraîne une diminution d'expression des marqueurs de réparation ATM et Chk2 de manière cinétique. En effet 15 minutes après irradiation, nous constatons une diminution de l'activation par phosphorylation de la kinase ATM suivie, 30 minutes après irradiation, d'une diminution de l'activation de ChK2 **(figure 41)**. L'accumulation de NPM1 dans les cellules cancéreuses de prostate semble donc donc avoir un effet bénéfique sur l'activation des protéines de réparations.

Discussion & Perspectives

1) Rôle de la Nucléophosmine dans les processus invasifs des cellules tumorales de prostate

La prolifération, la migration et l'invasion sont des processus cellulaires biologiques fondamentaux qui sont régulés par une multitude de signaux extracellulaires de nature chimique ou mécanique. L'intégration de ces stimuli au niveau de différentes voies de signalisation intracellulaires, permet d'adapter les capacités des cellules à exercer ces fonctions aux conditions du milieu extérieur. Une régulation étroite de ces mécanismes est donc cruciale pour maintenir l'homéostasie cellulaire mais également la taille et la fonction spécifique de chaque organe ainsi que le renouvellement cellulaire nécessaire aux cellules au cours du temps. Outre des évènements génétiques tels que les mutations ou les translocations chromosomiques, initiateurs de la tumorigenèse prostatique, des dérégulations des capacités de prolifération, de migration et d'invasion des cellules sont retrouvées lors de la mise en place d'un processus tumoral.

La protéine nucléophosmine (NPM1) membre de la famille de protéines nucléophosmine/nucléoplasmine, est un acteur important dans le contrôle de l'équilibre prolifération/apoptose (Grisendi *et al.*, 2005; Korgaonkar *et al.*, 2005). Initialement décrite pour son rôle dans la biogenèse des ribosomes et pour sa capacité à faire la navette entre le nucléole et le cytoplasme (Savkur & Olson, 1998; Szebeni *et al.*, 1995) NPM1 participe à de multiples processus cellulaires comme la duplication des centrosomes, la progression du cycle cellulaire ou encore l'organisation de la chromatine et la transcription génique. Par ses multiples fonctions, la protéine NPM1 est donc un régulateur de nombreuses activités cellulaires qui sont souvent dérégulées dans une grande variété de cancers. NPM1 est ainsi fréquemment surexprimée dans les tumeurs solides d'origines histologiques variées, parmi lesquelles les cancers gastriques (Tanaka *et al.*, 1992), du colon (Nozawa *et al.*, 1996), du poumon (Sari *et al.*, 2011), de la thyroïde (Pianta *et al.*, 2011) ou encore les tumeurs ovariennes (Brady *et al.*, 2004). Les travaux antérieurs du laboratoire ont également mis en évidence que la protéine NPM1 est surexprimée dans les tissus de carcinomes prostatiques en comparaison avec le tissu adjacent sain (Leotoing *et al.*, 2008).

Dans ce cadre de recherche, la question était de savoir si NPM1 était un acteur de la progression tumorale ou si son accumulation d'expression était la conséquence du développement tumoral prostatique. Ainsi, l'objectif de ces travaux de thèse était : 1) de déterminer si le niveau d'accumulation de NPM1 a un impact sur le comportement des cellules cancéreuses de prostate, 2)

en ce cas, d'identifier les mécanismes par lesquels elle exerce ces effets dans les cellules tumorales de prostate.

1°) Le niveau d'accumulation de NPM1 a-t-il un impact sur le comportement des cellules cancéreuses de prostate ?

Dans un premier temps et afin de déterminer si l'accumulation d'expression de NPM1 a un impact sur les capacités prolifératives des cellules tumorales de prostate, nous avons conduit des analyses d'incorporation de BrdU et d'expression du marqueur de prolifération PCNA. Cette étude a mis en évidence que l'inhibition d'expression de NPM1 entraîne une diminution de la réplication et de la prolifération des cellules tumorales de prostate. Cet effet pourrait, en partie, s'expliquer par un ralentissement global du métabolisme suite à la diminution de la biosynthèse des protéines dans les cellules inhibées pour l'expression de NPM1. En effet, par son rôle de régulateur positif de la biogenèse des ribosomes, NPM1 régule indirectement la traduction de transcrits de gènes impliqués dans la prolifération des cellules tumorales de prostate. L'inhibition de l'accumulation de NPM1 s'accompagne également d'une diminution de la capacité des cellules à croître en absence d'ancrage comme le souligne nos résultats de clonogénicité *in vitro* et d'une très faible prise de greffes associée à une très faible croissance tumorale *in vivo*. Inversement, la surexpression de NPM1 permet de réverser ce phénotype et conduit à une augmentation du nombre et de la taille des colonies qui croissent en trois dimensions. De manière intéressante, NPM1 influence également positivement les capacités invasives et migratoires des cellules tumorales de prostate. Comme le montre nos études en chambre de Boyden, l'inhibition de l'accumulation de NPM1 diminue les capacités des cellules à dégrader une matrice et à migrer.

Notre équipe a préalablement mis en evidence que les niveaux d'expression de la protéine NPM1 contrôlent positivement les capacités de liaison de AR sur les éléments de réponse AREs et l'activation de la transcription des gènes cibles des androgènes (Leotoing *et al.*, 2008). Le récepteur des androgènes a un rôle important dans la progression des cancers de la prostate. Il agit comme un facteur de transcription pour permettre l'expression de gènes favorisant la prolifération et la survie tels que EGFR ou c-Myc (Bernard *et al.*, 2003a; Torring *et al.*, 2003). Cependant l'implication de NPM1 dans les processus prolifératifs, migratoires et invasifs semble être indépendante de l'activité de AR. En effet, les conséquences d'une inhibition de l'expression de NPM1 sont similaires dans la lignée cellulaire androgéno-sensible LNCaP et dans la lignée PC-3 qui a la particularité de ne plus exprimer le récepteur des androgènes. De plus, et en accord avec nos résultats, plusieurs autres auteurs mettent en évidence que la forte accumulation de NPM1 dans des lignées cellulaires n'exprimant pas AR, comme les cellules de cancers du colon (HTC116 et HT29), est corrélée à une augmentation des

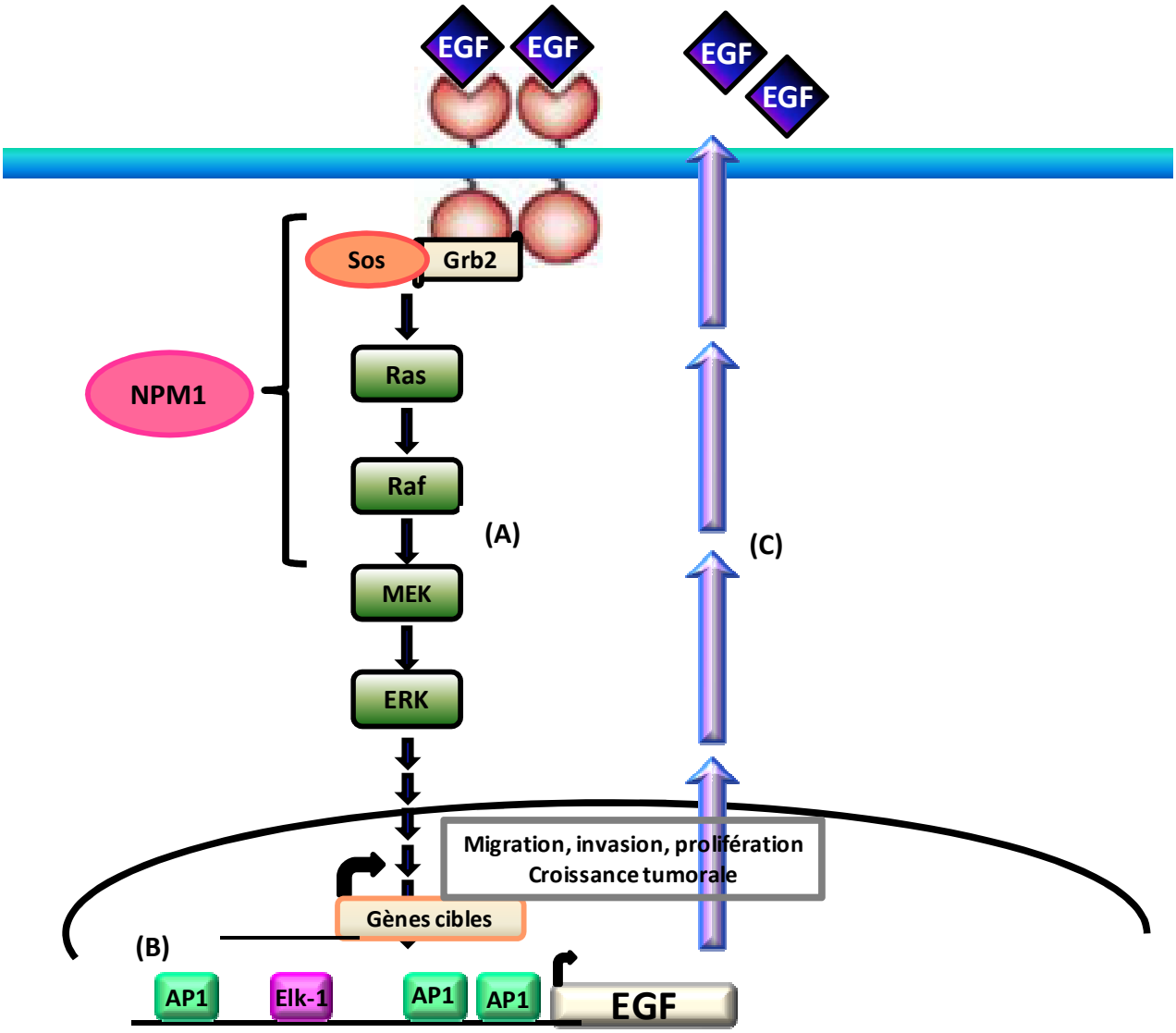


Figure 42 : Modèle d'action de NPM1 dans les cellules tumorales prostatiques

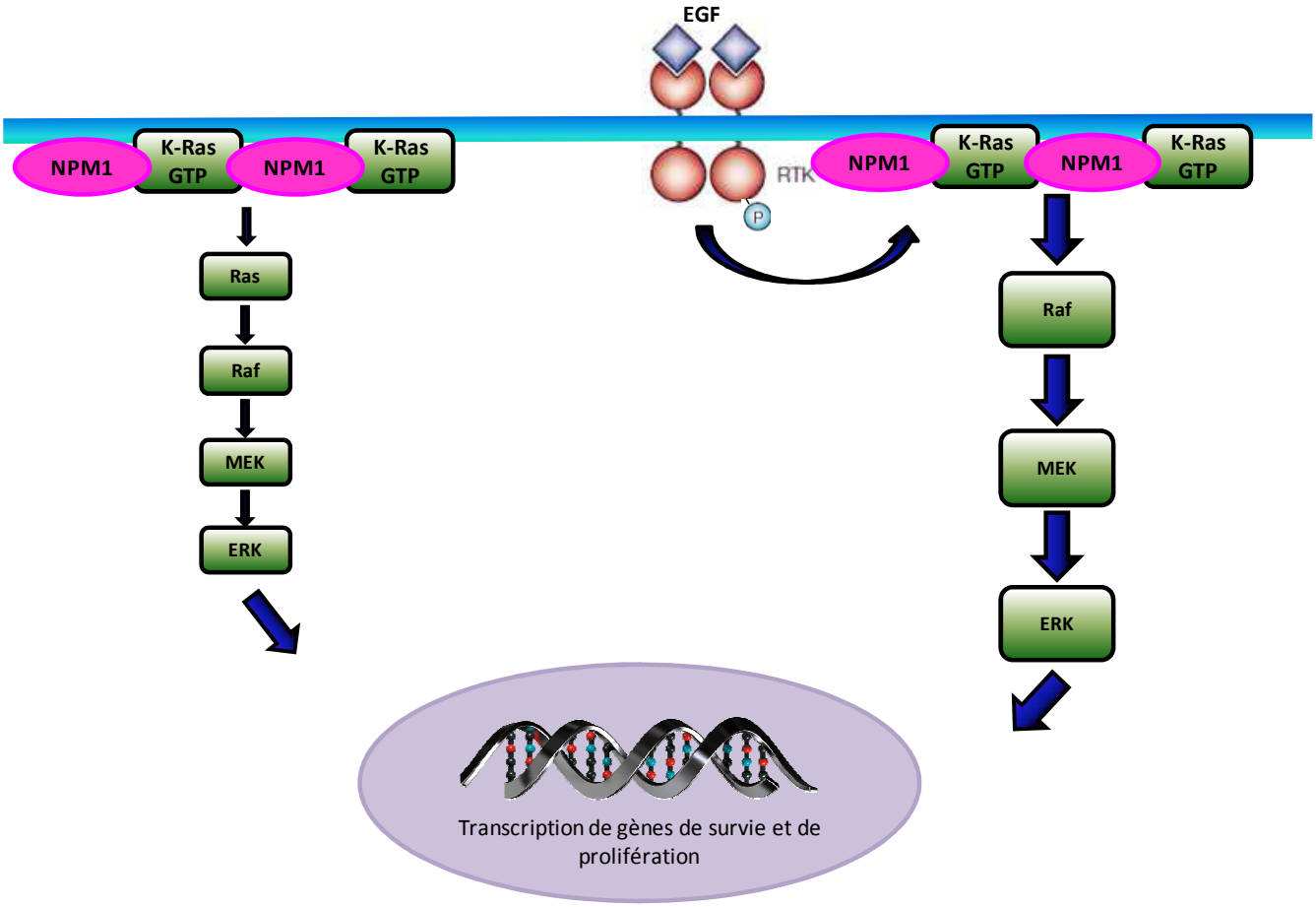
(A) Suite à la fixation de EGF sur son récepteur, l'activation spécifique de la voie ERK1/2 est contrôlée par NPM1. Ce dernier s'effectue en aval de EGFR et en amont de la kinase MEK. Par cette fonction, NPM1 contrôle l'activité transcriptionnelle de gènes cibles impliqués dans les processus de migration, d'invasion, et de prolifération permettant la croissance tumorale. (B) NPM1 semble également réguler l'activité transcriptionnelle du gène EGF via son contrôle de l'activation de la voie ERK1/2. Ainsi, NPM1 aurait un éventuel rôle dans la mise en place de la boucle autocrine de régulation (C).

capacités migratoires et invasives de ces cellules (Liu *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données indiquent que NPM1 est un des acteurs de la régulation positive des processus prolifératifs et invasifs dans les cancers de la prostate.

2°) Par quel(s) mécanisme(s) NPM1 exerce t-elle cet effet ?

En plus du rôle important joué par les stéroides, la progression tumorale de la prostate est associée à des altérations dans la transduction des signaux mitogènes. Ces modifications conduisent d'une part à la synthèse et à la sécrétion des facteurs de croissance tel que EGF par les cellules tumorales elles-mêmes, et d'autre part, à l'augmentation de l'expression des récepteurs de ces facteurs de croissance et/ou à l'augmentation des effecteurs primaires des voies de signalisation qu'ils contrôlent. Au final, cela aboutit à la mise en place de boucles autocrines de régulation qui soutiennent la prolifération et la survie des cellules tumorales de prostate. Nos analyses en qPCR montrent que la diminution du niveau de NPM1 entraîne une diminution de l'accumulation des messagers codant EGF. Cet effet est au moins en partie transcriptionnel comme en témoigne la diminution de l'activité du promoteur du gène *EGF* dans les tests d'activité luciférase. NPM1 n'est pas un facteur de transcription mais plusieurs données soulignent cependant son rôle dans les processus transcriptionnels en tant que partenaire du remodelage chromatinien: (i) elle forme un complexe avec p300 pour stimuler la transcription du gène *TNFα* (Shandilya *et al.*, 2009), (ii) elle lie la déméthylase d'histones LSD1 et le récepteur des androgènes et (iii) elle stimule la transcription dépendante de AR comme le fait LSD1 sur les gènes androgéno-régulés (Léotoing *et al.,* données de l'équipe non publiées). De plus, une diminution de son accumulation, entraîne des modifications globales des marques d'acétylations et de méthylations des lysines de l'histone H3 ce qui entraîne des modifications de la structure de la chromatine et diminue l'accessibilité des promoteurs. Nous proposons donc que NPM1 stimule l'expression du gène *EGF* par un mécanisme similaire à celui décrit pour le *TNFα*. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps NPM1 nous permettraient de déterminer si le contrôle de l'activation transcriptionnelle du gène codant *EGF* fait intervenir la fixation de NPM1 sur le promoteur EGF.

Il est bien établi que les niveaux d'expression élevés d'EGF sont corrélés avec les stades avancés de la tumorigenèse prostatique (Davies & Eaton, 1989; Scher *et al.*, 1995). Ainsi, en stimulant l'expression d'EGF, NPM1 pourrait participer à l'amplification de la boucle d'autorégulation dépendante de l'EGF caractéristique d'une progression tumorale vers des stades avancés et/ou d'échappement. Outre la production autocrine d'EGF, le maintien de la prolifération des cellules cancéreuses est soutenu par un niveau d'expression plus élevé du récepteur de EGF (EGFR) et l'hyperactivation consécutive des voies de signalisation effectrices situées en aval. La voie MAPKs



<u>Figure 43</u> : Modèle de régulation des fonctions de K-Ras par NPM1

La fraction de NPM1 localisée dans le feuillet interne de la membrane plasmique se lie spécifiquement à K-Ras permettant ainsi son recrutement à la membrane. K-Ras est alors stabilisé ce qui entraine son accumulation sous sa forme active. Cette accumulation protéique permet l'activation de la voie MAPK entrainant la transcription des gènes cibles impliqués dans la survie et la prolifération. L'activation du récepteur EGFR par fixation de son ligand permet d'augmenter l'état d'activation initial de la voie MAPK.

(D'après (Inder *et al.*, 2010; Weber & Gioeli, 2004)

(ERK1/2) est la voie majeure activée en réponse à l'EGF. A l'image de ce qui est observé en présence de concentrations élevées du facteur de croissance, l'augmentation d'activité de la voie ERK1/2 est corrélée à la prolifération de l'épithélium prostatique, à l'initiation et à la progression des cancers de la prostate (Junttila *et al.*, 2008). Notre étude des voies de signalisation met en évidence que la diminution de l'accumulation de NPM1 entraîne une diminution de l'activation de la voie de signalisation ERK1/2. Cela pourrait bien sûr refléter une moindre disponibilité du facteur de croissance, mais un apport exogène d'EGF ne permet pas de restaurer l'activation de la voie ERK1/2 et les capacités prolifératives et migratoires des cellules lorsque NPM1 est inhibée. En revanche, l'activation de la voie par une forme constitutivement active de MEKK1 restaure les capacités proliférative de ces cellules. Nos résultats suggèrent donc que l'effet de la surexpression de NPM1 sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales de prostate fait suite à une activation intracellulaire de la voie ERK1/2, en aval du récepteur à l'EGF et en amont de la kinase MEKK1. L'impact proliférati et invasif de cette voie n'est pas spécifique à la prostate puisqu'il a clairement été démontré dans d'autres types cellulaires tumoraux comme les glioblastomes, les carcinomes de la tête et du cou et les adénocarcinomes du sein (Anand *et al.*, 2011; Maheshwari *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2011) **(figure 42)**.

Des acteurs importants de la voie MAPK sont les protéines Ras activées de manière paracrine et autocrine par les facteurs de croissance dans les cancers de la prostate (Weber & Gioeli, 2004). Leur organisation spatiale au sein de clusters au niveau de la membrane plasmique permet une activation de la signalisation MAPK et notamment l'activation des kinases ERK1/2. La nucléophosmine et la nucléoline, autre phosphoprotéine nucléolaire impliquée dans la biogenèse des ribosomes, ont été montrées comme étant des régulateurs spécifiques de la protéine k-Ras. Par sa capacité à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, NPM1 peut être délocalisée du compartimemnt nucléaire et exercer des fonctions dans le cytoplasme ou dans dans la région sous-membranaire. Ainsi, la fraction de NPM1 localisée dans le feuillet interne de la membrane plasmique interagit spécifiquement avec la protéine k-Ras active et induit une activation de la voie MAPK. Cette intéraction entre les deux protéines est renforcée par l'activation de EGFR suite à la fixation de EGF. Ainsi, on peut supposer que la régulation positive des processus migratoires et invasifs secondaire à l'activation de ERK1/2, passe par le recrutement à la membrane de k-Ras par NPM1 dans un contexte tumoral où NPM1 est surexprimée et les niveaux de EGF augmentés **(figure 43)** (Inder *et al.*, 2010; Inder *et al.*, 2009; Weber & Gioeli, 2004).

La voie ERK1/2 est également impliquée dans la dégradation des protéines constituant la matrice extracellulaire des cellules afin de promouvoir l'invasion tumorale (Chakraborti *et al.*, 2003).

En effet, l'invasion et la migration des cellules lors des processus tumoraux impliquent une interaction avec et une dégradation des protéines de la matrice des cellules grâce à l'activation de métalloprotéinases de matrices (MMPs) tels que MMP1, MMP2 ou MMP9. Il s'agit d'enzymes protéolytiques impliquées dans l'invasion du milieu par les cellules tumorales dans un grande variété de cancers (Egeblad & Werb, 2002). L'expression des MMPs est régulée par une balance d'expression entre des activateurs et des inhibiteurs spécifiques comme les TIMPs (Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase). Nos premières données en qPCR array montrent une augmentation du taux d'ARNm de TIMP-1 (x2) lorsque le niveau d'accumulation de NPM1 est diminué. Ces résultats suggèreraient une régulation positive de l'activation des MMPs par NPM1 pour assurer son rôle dans la migration et l'invasion des cellules tumorales de prostate. Dans les glioblastomes et les carcinomes de la tête et du cou, l'activation de la voie ERK1/2 par EGF entraîne une augmentation d'expression des métalloprotéinases, en particulier de MMP1 et MMP9 (Anand *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2011). Nous proposons que l'activation de la voie ERK1/2 suite à la surexpression de NPM1, entraîne une activation des MMPs qui vont contribuer à la migration et l'invasion des cellules tumorales de prostate. Il serait donc intéressant d'analyser le niveau d'activation de ces enzymes dans nos lignées LNCaP en fonction des niveaux d'accumulation de NPM1 par des tests de zymographie. Ces données pourraient être complétées par l'étude de l'état de phosphorylation d'autres protéines cibles de ERK1/2 telles que la myosine, la calpaine ou la paxilline, toutes connues pour favoriser la migration des cellules cancéreuses de prostate (Huang *et al.*, 2004).

Lors de la phase d'échappement hormonal et compte tenu que EGF et EGFR sont souvent surexprimés dans les tumeurs prostatiques, cette voie de signalisation est actuellement ciblée pour définir de nouveaux traitements. L'association d'un antagoniste de EGFR (trastuzumab®) à un inhibiteur de tyrosine kinases (gefitinib®), déjà montré pour inhiber la croissance tumorale prostatique (Vicentini *et al.*, 2003), a donné des résultats encourageants. Même si ces traitements restent encore palliatifs, ils permettent à court terme de ralentir la progression des cancers de la prostate. Comme nous avons démontré que la surexpression de NPM1 conduit à une augmentation de l'activité de la voie ERK1/2 par une régulation en aval de EGFR, nous pouvons suggérer que ce type de traitement ne soit pas le plus approprié chez des patients ayant des forts taux d'accumulation de NPM1. Dans ce contexte, l'utilisation de la protéine NPM1 comme biomarqueur prédictif est interessante. La recherche de son niveau d'expression, en plus des autres marqueurs de routine, permettrait d'adapter au mieux le traitement des patients. Il semble également pertinent dans ce cas d'associer l'inhibition spécifique de NPM1, pour limiter la croissance cellulaire et la migration, à d'autres thérapeutiques ciblées, tels que déjà décrits, afin de potentialiser leurs effets et ainsi mieux contrôler la croissance de la maladie.

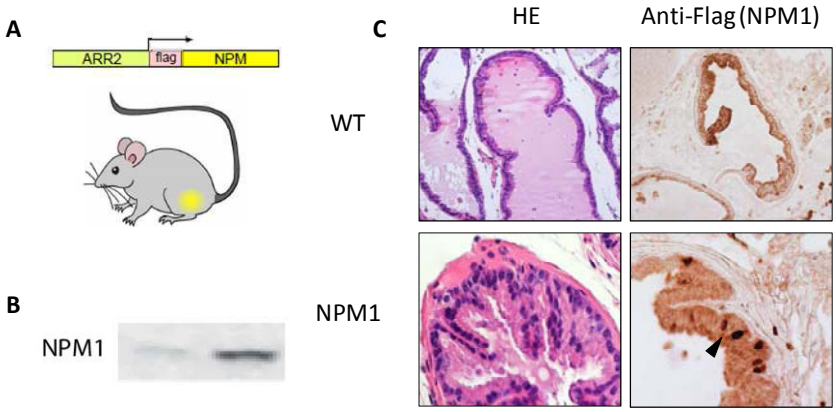


Figure 44 : Analyse histologique de la prostate des souris Wild Type ou surexprimant NPM1

A : Modèle de surexpression de la forme sauvage de la nucléophosmine humaine au niveau de la prostate. Le gène est étiquetté par un épitope flag pour le repérage de son expresson et sous le contrôle du promoteur probasine contenant les régions ARR2 qui permet une expression spécifique dans l'épithélium prostatique.

B : Validation de l'expresion du transgène codant pour la forme humaine de NPM1 dans le lobe prostatique ventral par analyse de l'accumulation de la protéine par western blot avec un anticorps anti-flag.

C : Coloration HE (hématoxyline/éosine) de coupes de prostate ventrale de souris surexprimant ou non NPM1. Vérification de l'expression de la protéine NPM1 en immunohistologie à l'aide d'un anticorps anti-Flag.

(Résultats du laboratoire, Rafik Boudra)

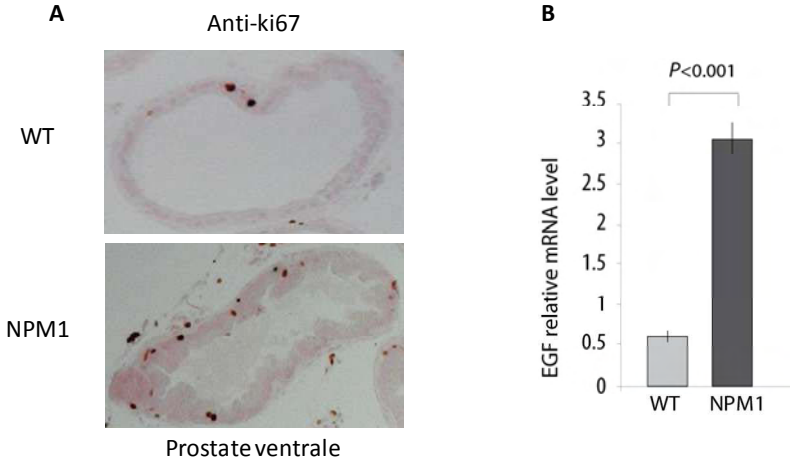


Figure 45 : Caractérisation des souris transgéniques qui surexpriment NPM1

A : Analyse de l'expression du marqueur de prolifération ki67 en immunohistologie dans le lobe ventral de la prostate des souris qui surexpriment NPM1.

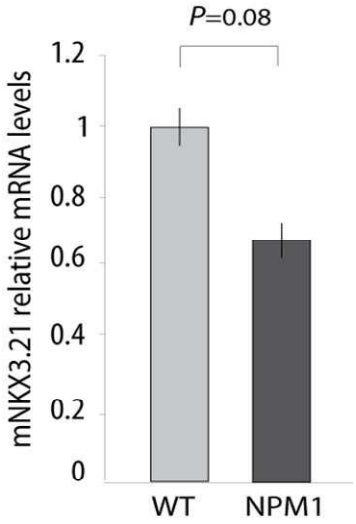
B : Analyse des taux relatifs d'ARNm d'EGF murin par RT-qPCR dans les souris sauvages et surexprimant NPM1.

(Résultats du laboratoire, Rafik Boudra)

3°) NPM1 est-elle un initiateur ou un acteur de la tumorigenèse prostatique ?

Les résultats obtenus *in vitro* mettent en évidence une régulation positive des capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales de prostate *via* une activation de la voie de signalisation ERK1/2 par la protéine NPM1. Il semblerait également que NPM1 puisse participer à la régulation de la boucle autocrine dépendante de EGF. Cependant NPM1 est-elle un initiateur de la tumorigenèse prostatique ou un acteur dans les phases de promotion et de progression ? Afin d'analyser le rôle de la surexpression de NPM1 sur la physiologie prostatique, avant mon arrivée au laboratoire, il a été développé un modèle de souris par transgenèse additive. Les souris expriment la forme humaine de NPM1 sous contrôle du promoteur probasine, contenant les séquenses de fixation de AR, ARR2, afin d'assurer une expression spécifique au sein de la prostate **(figure 44A)**. Les analyses en histologie montrent un épaississement de l'épithélium prostatique et des cellules non associées à la lame basale. Cependant celles-ci ne présentent pas de noyaux atypiques caractéristiques de néoplasies intraépithéliales **(figure 44B et C)**. La surexpression de NPM1 s'accompagne tout de fois d'une hausse du nombre de cellules positives pour le marqueur de prolifération Ki67 chez ces animaux agés de 4 mois par rapport aux animaux contrôles **(figure 45A)**. Cette augmentation de Ki67 s'accompagne également d'une augmentation de PCNA démontrant un rôle de NPM1 dans la prolifération des cellules tumorales de prostate. Concernant les données *in vitro*, sur la diminution d'expression d'EGF suite à une inhibition de NPM1, le même type d'analyse chez les souris transgéniques qui surexpriment NPM1 montre une augmentation du taux de transcription de l'EGF **(figure 45B)**. Néanmoins, cette surexpression de NPM1 n'est pas suffisante pour initier le développement tumoral de la prostate et NPM1, bien qu'elle soit associée à des phénomènes prolifératifs et invasifs, ne se comporte pas comme un oncogène.

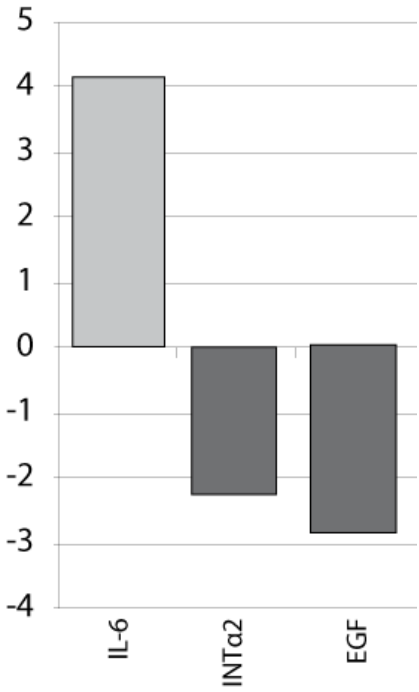
Pour autant, la surexpression de NPM1 conduit à une diminution de l'accumulation de Nkx3.1, marqueur d'une différenciation terminale des cellules épithéliales et absent dans les premières étapes du processus de différenciation **(figure 46)**. Lors du développement tumoral de la prostate, malgré des controverses, deux hypothèses sont envisagées : (i) une transformation directe des cellules luminales normales suite à la perte de contrôle de la croissance et des interactions cellulaires, (ii) une dédifférenciation des cellules épithéliales luminales en cellules progénitrices suivie d'une augmentation de la prolifération de ces dernières (Maitland *et al.*, 2011). NPM1 pourrait donc participer au maintien des cellules dans un état progéniteur et prolifératif suite à une dé-différenciation. Dans les cellules de canal déférent de souris (VDEC), notre équipe à mis en évidence une forte accumulation de NPM1 dans les cellules en prolifération alors que son niveau d'expression diminue fortement après leur différenciation. De plus, nos données en qPCR array sur les cellules



<u>Figure 46</u> : Analyse de l'état d'accumulation du marqueur de différenciation Nkx3.1 dans les souris transgéniques

Analyse du taux transcriptionnel de la forme murine de NKX3.1 dans les souris contrôles en comparaison avec les souris qui surexpriment NPM1.

(Résultats du laboratoire, Rafik Boudra)

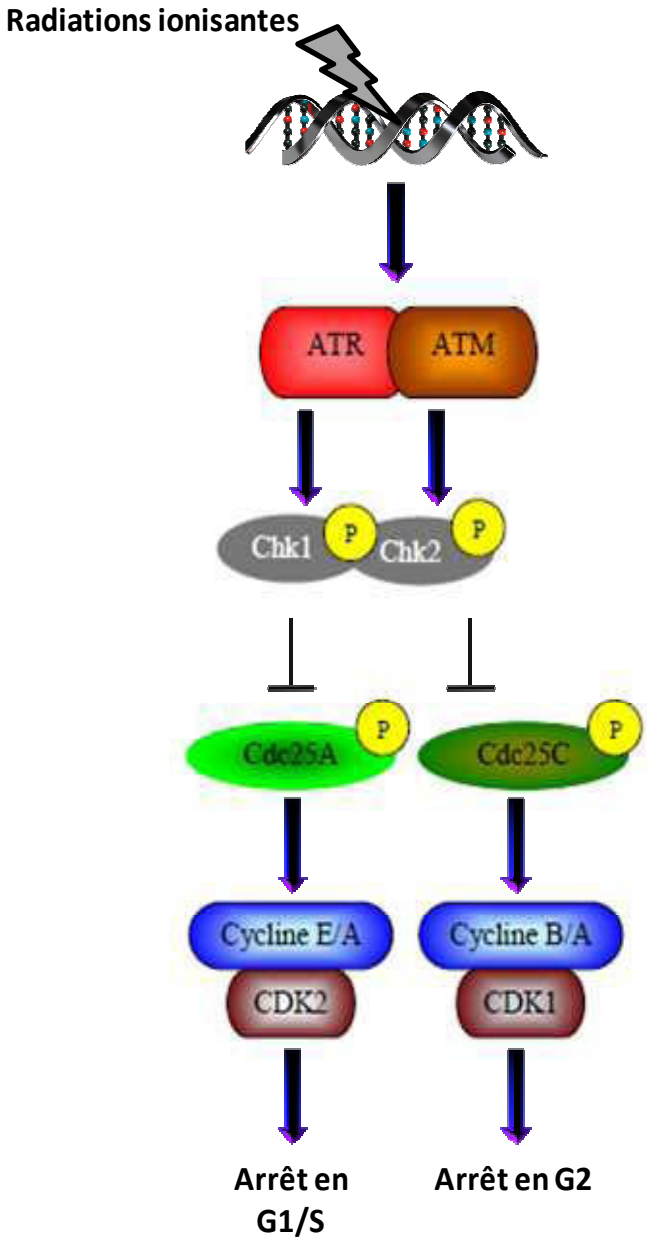


<u>Figure 47</u> : Niveaux d'expression de marqueurs de différenciation suite à l'inhibition de NPM1

Analyse en qPCR array de l'expression des gènes IL-6, intégrine α2 et EGF, impliqués dans le processus de différenciation en fonction des niveaux d'accumulation de NPM1. Le seuil de significativité d'expression entre les cellules contrôles et les cellules inhibées pour NPM1 est de 2.

(Résultats du laboratoire, Rafik Boudra)

LNCaP mettent en évidence que la diminution d'accumulation de NPM1 entraîne une augmentation d'IL-6, impliquée dans la neurodifférenciation, et une diminution de l'INα2, marqueurs des cellules progénitrices **(figure 47)**. Ces modifications d'expression sont en faveur d'une différenciation des cellules tumorales de prostate caractéristiques d'un état moins agressif. Inversement, la surexpression de NPM1 dans les souris transgéniques entraîne une diminution d'expression de la chromogranine A, spécifique des cellules neuroendocrines et de la probasine, caractéristique des cellules épithéliales luminales. Ces modifications d'expression sont favorables pour la perte de l'état différencié des cellules et l'acquisition des caractéristiques prolifératives de cellules progénitrices. Afin de compléter cette analyse, il serait interessant d'étudier les niveaux d'expression de l'intégrine α2 et de l'IL-6 dans les souris transgéniques. NPM1 pourrait être un acteur de la différenciation des cellules de prostate. Elle agirait comme un « reprogrammateur » de cette différenciation en favorisant l'expression de marqueurs permettant le maintien des cellules tumorales de prostate dans un état caractéristique de cellules progénitrices. De manière interessante et en accord avec cette hypothèse, une recherche de facteurs de pluripotence réalisée à partir de cellules cancéreuses embryonnaires P19 à mené à l'isolement de la protéine NPM1. Elle ser ait un régulateur potentiel de la capacité de prolifération des cellules souches embryonnaires et permettrait le maintien de l'expression de facteurs de pluripotence comme Nanog, Oct4 et Sox2 (Abujarour *et al.*, 2010). La surexpression de ces facteurs, retrouvée dans plus de 10% des lésions prostatiques de types néoplasies intraépithéliales de haut grade (HGPINs), chez l'homme (Ugolkov *et al.*, 2011), pourrait contribuer à la dédifférenciation des cellules néoplasiques positives pour NPM1 et ainsi promouvoir le développement de tumeurs prostatiques plus agressives. Cette hypothèse est renforcée par une étude qui montre que l'inhibition d'expression de NPM1 dans des cellules ES de souris CGR8 entraîne une diminution du taux de prolifération de ces cellules et une réduction de 60% de leur capacité de croissance (Wang *et al.*, 2006a).



<u>Figure 48</u> : Mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire suite à la présence de dommages à l'ADN après irradiation.

Suite à l'exposition des cellules aux radiations ionisantes, la reconnaissance des cassures double brin générées va permettre la mise en place du processus de réparation. L'activation par phosphorylation des kinases Chk1 et Chk2, par ATM et ATR, entraine l'inactivation et la dégradation des protéines du cycle Cdc25A et Cdc25C, activateurs des complexes cyclines/Cdk. Ces complexes inactivés, la progression du cycle cellulaire est stoppée avec un arrêt des cellules aux phases G1/S ou G2/M. Le processus de réparation terminé, il y aura la reprise du cycle cellulaire.

(D'après (Lan *et al.*, 2004; Lukas *et al.*, 2004)

2) Rôle de la Nucléophosmine dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN et cible thérapeutique potentielle.

Le cancer de la prostate est un cancer de l'homme agé, le choix du traitement doit être fait non seulement en fonction de l'état de santé du patient mais également du stade auquel le cancer se trouve. La radiothérapie externe est le traitement de référence des cancers de la prostate localisés à risques faible et intermédiaire. Malheureusement, après un an en moyenne de rémission, une récidive du cancer est souvent constatée par une augmentation du taux sanguin de PSA. Cette récidive, à l'intérieur même du volume irradié, est principalement la conséquence d'une reprise de la prolifération des cellules cancéreuses ayant résisté aux traitements grâce à l'expression de protéines impliquées dans la prolifération et la survie. Du fait de sa surexpression dans les cellules tumorales de prostate et son implication dans les processus prolifératifs, migratoires et invasifs, la protéine NPM1 pourrait être un acteur de cette récidive.

Un des modes d'action de la radiothérapie est de provoquer un nombre important de cassures pour saturer le système de réparation et entrainer la mort des cellules tumorales par mort mitotique ou apoptose. Dans un contexte physiologique, après irradiation, les kinases de réparation ATR et ATM vont être activées au niveau des cassures double brin. Cela conduit à l'activation des protéines kinases Chk1 et Chk2 qui, après avoir entrainé la dégradation des Cdc25 par le protéasome, permettent l'accumulation de p53, une activation de p21 et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2 **(figure 48)**. Des auteurs ont constaté qu'après exposition des cellules aux radiations ionisantes il y a une augmentation de la transcription de NPM1 associée à une amélioration des processus de réparations de l'ADN (Wu *et al.*, 2002). NPM1 agit ainsi comme un suppresseur de tumeur en favorisant la reconnaissance des cassures et la mise en place de l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation avant la reprise du cycle (Colombo *et al.*, 2005). Comme initialement décrit, les modifications post-traductionnelles de NPM1 ont une influence sur ses fonctions. Dans le cas des dommages à l'ADN, la forme phosphorylée de NPM1 sur le résidu T199, faciliterait le recrutement de γ-H2AX au niveau des cassure doubles brin induites par les rayons et l'activation des kinases ATM et ATR permettant la cascade de réparation (Koike *et al.*, 2010). En effet l'inhibition de la phosphorylation de NPM1 ou de son expression entraine une augmentation de l'apoptose induite par les rayons (Chen *et al.*, 2010). Dans le cas des cancers de la prostate, l'accumulation de la protéine NPM1 est constatée à des stades auxquels un traitement par les rayons est envisageable.

Une inhibition des niveaux d'expression de NPM1 associée aux rayons pourrait donc permettre d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie. L'objectif de cette partie du travail était de savoir: 1) si le niveau d'accumulation de NPM1 peut avoir un impact sur le processus de réparation et par quels mécanismes ; 2) si la forte expression de NPM1 dans les cancers de la prostate est associée à la résistance aux rayons et si elle peut être utilisée comme biomarqueurs prédictif de la réponse à la radiothérapie

1°) Le niveau d'accumulation de NPM1 a-t-il un impact sur le processus de réparation et par quels mécanismes ?

Des résultats très préliminaires ont mis en évidence que la diminution de l'accumulation de NPM1 entraîne une diminution de l'activation des marqueurs de réparations (figure 41). L'effet des rayons sur la survie cellulaire est classiquement analysé par des tests de survie clonogénique. Il s'agit de la mesure de la capacité des cellules irradiées à former des colonies de plus de 100 cellules 10 jours après leur ensemencement à très faibles densités. Afin de compléter les résultats déjà obtenus et d'étudier l'impact d'une accumulation de NPM1 sur l'efficacité de la radiothérapie il serait interessant de comparer la variation de survie clonogénique après irradiation des cellules inhibées pour NPM1 à celle des cellules témoins.

2°) Le niveau d'expression de NPM1 est-il associé à la résistance à la radiothérapie ? A-il une valeur prédictive ?

D'après mes données préalables, les résultats obtenus au laboratoire et celles de la littérature, il semblerait que NPM1 ne soit pas un initiateur de la tumorigenèse mais un potentialisateur de la progression des cancers de la prostate suite à des évènements génétiques initiateurs. Un retour vers la pathologie humaine permettrait de déterminer si NPM1 est un biomarqueur prédictif et/ou pronostic pertinent dans le cancer prostatique. La nécessité de connaître le niveau d'expression total de NPM1 et de sa forme phosphorylée sur la thréonine 199 chez des patients atteints de cancer de la prostate et de les corréler à l'efficacité de la radiothérapie serait une perspective interessante. Dans ce cadre une étude rétrospective à 5 ans sur un échantillonage de biopsies de prostate de patients atteints de cancer de la prostate à été initiée, en collaboration avec le Professeur Laurent Guy et le Professeur Jean-Louis Kemeny du CHU de Clermont-Ferrand. On dispose d'une cohorte de 100 patients agés de 67 à 80 ans dont on connaît les scores de Gleason des tumeurs ainsi que le taux de PSA initial, au cours du traitement et lors du suivi clinique. L'analyse histologique de ces tumeurs pour NPM1 nous permettra d'établir des corrélations entre le score de Gleason, le délai de la récidive et l'efficacité de la réponse à la radiothérapie.

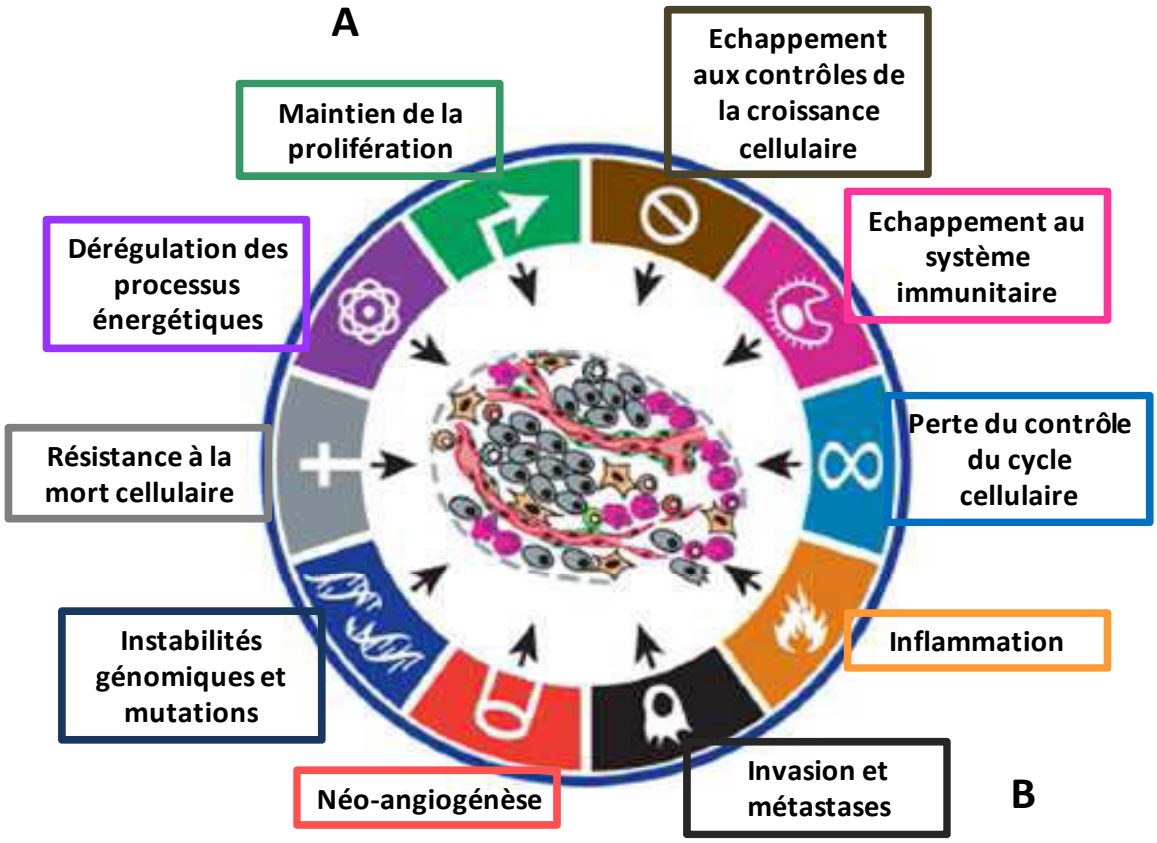


Figure 49 : Caractéristiques cellulaires mises en place au cours de la tumorigenèse

Schéma intégratif des caractéristiques acquisent par les cellules pour leur permettre d'évoluer vers un état néoplasique, tumorigène puis agressif.

(D'après (Hanahan & Weinberg, 2011)

3) Conclusion générale

En 2011, Weinberg a proposé un schéma intégratif permettant d'expliquer comment une cellule normale peut progressivement évoluer vers un état néoplasique, tumorigène et finalement malin. Il a mis en évidence qu'au cours de la tumorigenèse les cellules vont acquérir diverses caractéristiques permettant la croissance tumorale comme par exemple la résistance à la mort cellulaire, le maintien de la signalisation de prolifération ou encore l'induction de l'angiogenèse **(figure 49)** (Hanahan & Weinberg, 2011). Les résultats obtenus dans ce travail de thèse mettent en exergue que NPM1 participe à la mise en place et au maintien de certaines de ces capacités dans le cancer de la prostate.

Tout d'abord, dans un tissu sain, les cellules contrôlent la production et la sécrétion de facteurs impliqués dans la croissance et la prolifération assurant ainsi l'homéostasie du nombre de cellules et le maintien de l'architecture et des fonctions tissulaires. Les cellules cancéreuses par dérégulation de ces signaux vont assurer leur propre survie. Par son rôle dans l'activation de la voie ERK1/2 et le contrôle de l'activité du promoteur EGF, la nucléophosmine est majoritairement impliquée dans la mise en place de l'autosuffisance des cellules cancéreuses vis-à-vis des facteurs de croissance **(figure 49A)**. De plus, les modifications des capacités invasives en fonction du niveau d'accumulation de NPM1 impliquent, en partie, cette protéine dans le processus invasif et éventuellement métastatique dans les cas de cancers de la prostate **(figure 49B)**.

L'ensemble de cette étude, associé aux données bibliographiques, révèle un rôle important de NPM1 dans la croissance des tumeurs prostatiques.

Annexes

Les deux articles présentés en annexes font suite à des résultats obtenus pendant mon stage de Master 2 au sein de l'équipe CREaT, Centre Jean Perrin, sous la direction du Pr Pierre Verrelle.

Article1: STAT3 activation in human malignant glioma: S727 rather than Y705?

Emmanuel Chautard, Zangbéwendé Guy Ouédraogo, Gaëlle Loubeau, Claudine Vermot-Desroches, Andreï Tchirkov, Richard Veyrat-Masson, Toufic Khalil, Ines Raoelfils, Jean-Louis Kemeny, Laurent Morel et Pierre Verrelle

En cours de soumission dans Neuro-oncology

Article2: Akt signaling pathway : a target for radiosensitizing human malignant glioma

Emmanuel Chautard, Gaëlle Loubeau, Andreï Tchirkov, Jacques Chassagne, Claudine Vermot-Desroches, Laurent Morel et Pierre Verrelle

Publié dans Neuro-Oncology, 2010

STAT3 activation in human malignant glioma : S727 rather than Y705 ?

Emmanuel Chautard, Zangbéwendé Guy Ouédraogo, Gaëlle Loubeau, Claudine Vermot-Desroches, Andreï Tchirkov, Richard Veyrat-Masson, Toufic Khalil, Ines Raoelfils, Jean-Louis Kemeny, Laurent Morel and Pierre Verrelle.

Clermont Université, Université d'Auvergne, EA7283 CREaT, 28 Place Henri Dunand, 63000 Clermont-Ferrand, France (E.C., ZG.O., G.L., R.V-M., J-L.K. and P.V.)
Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale, 58 Rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France (E.C., ZG.O., and P.V.)
OPi EUSA Pharma, 27 chemin des Peupliers, 69570 Dardilly France (C.V-D.)
Laboratoire de Cytogénétique Médicale (A.T.), Laboratoire d'Hématologie Biologique (R.V-M), Service de Neurochirurgie (T.K.), Servie de d'Anatomopathologie (J-L.K.), CHU, Clermont-Ferrand, 58 rue Montalembert, Clermont Ferrand, 63000, France
Service d'Anatomopathologie, Centre Hospitalier Jacques Coeur, 45 A venue François Mitterrand, Bourges, 18020, France (I.R.)
Clermont Université, Université Blaise-Pascal, GReD, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, 24 Avenue des Landais BP80026, 63171 Aubière 63177 Aubière, France (G.L., L.M.).

Running head: STAT3-S727 : a relevant target in glioma?

Address correspondence to: Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale, EA7283 CREaT – Université d'Auvergne, 58 rue Montalembert, Clermont Ferrand, 63011, France. Tel : +33.4.73.27.81.42 ; Fax : +33.4.73.27.81.25; E-mail : Emmanuel.CHAUTARD@cjp.fr

Funding : This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy De Dôme), by the Institut National du Cancer and by the Region Auvergne. E.C. was the recipient of a fellowship from the MENESR (Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).
Conflict of interest : None.

Abstract
STAT3 is frequently activated in human malignant glioma, and its functions in many cellular processes including apoptosis inhibition could be involved in resistance to anticancer treatment. STAT3 is thereby a hub in glioma signaling and has significant potential as a relevant therapeutic target. In this study we investigate the impact of STAT3-Y705 inhibition on glioma cells using monoclonal antibodies directed against IL-6 itself or its receptor subunits. We found that pSTAT-Y705 inhibition did not affect proliferation, apoptosis and expression of STAT3 pathway target genes. We finally demonstrated that pSTAT3-S727 activation is a common feature of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* highlighting that this phosphorylation residue could explain the tolerance to IL-6/gp130/STAT3 pathway inhibition observed in glioma cells and thereby could be a relevant target in this disease.

Keywords : malignant glioma, STAT3 activation, Y705, S727

Introduction

Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) is a transcription factor, that has been reported to be involved in several components of tumor aggressiveness by inhibiting apoptosis (upregulation of survivin,[1] BCL-XL[2] and Mcl-1[3] expression) and increasing proliferation,[2] angiogenesis (upregulation of VEGF[4] expression), invasion (upregulation of MMP9[5] expression), or local immune suppression (decrease in T cells activation[6]). STAT3 pathway activation has been described in many cancers including malignant gliomas which are the most common primary tumors of the central nervous system. These neoplasms are extremely resistant to treatment, including radiotherapy and/or chemotherapy so that patient median survival does not exceed 14 months.[7,8] Regarding its functions, STAT3 pathway which is aberrantly activated in human malignant glioma,[9,10] could be involved in glioma resistance to treatment and is therefore a potential therapeutic target.

Most studies associate STAT3 pathway activation to the Y705 residue phosphorylation. The binding of Interleukin 6-family cytokine receptors to the gp130 receptor triggers STAT3 phosphorylation by Janus Kinases 2 (JAK2) on Y705 residue.[11] Activated STAT3 proteins dimerize, and translocate to the nucleus where they regulate expression of several genes involved in proliferation, migration, invasion, and survival.[12] In this study we investigated the impact of STAT3-Y705 inhibition on glioma cells using monoclonal antibodies (MAbs) directed against IL-6 itself or its receptor subunits (IL-6R : gp80 and gp130). Besides Y705, STAT3 can also be phosphorylated on another residue (Serine 727, S727) with a biological role that is not fully understood.[11] Because S727 constitutive activation and involvement in gene expression has been reported in other malignancies[13] we decided to explore both phosphorylation sites. MAbs treatment induced a striking inhibition of pSTAT3-Y705 in SF763 and SNB19 (only with anti-gp130) cells but did not affect pSTAT3-S727 activation. However, pSTAT-Y705 inhibition did not affect glioma cell proliferation, apoptosis and expression of STAT3 pathway target genes. We finally found that pSTAT3-S727 activation is a common feature of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* highlighting that this phosphorylated residue could explain the tolerance to IL-6/gp130/STAT3 pathway inhibition observed in glioma cells and thereby could be a relevant target in this disease.

Materials and Methods

Materials - For Western blot, polyclonal rabbit antibodies directed against STAT3 (No 4904), and pSTAT3 Y705 (No 9145) were purchased from Ozyme (Saint Quentin Yvelines, France). β-actin antibody (No A2066) was from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and pSTAT3 S727 (No 1121-1) was from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Anti rabbit-peroxidase was from P.A.R.I.S. (Compiègne, France). All culture reagents were purchased from GIBCO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The MAbs anti human gp130 (No 852.060.000, clone B-R3), anti human gp80 (No 852.030.000, clone B-R6), anti human IL-6 (No 855.050.005, clone B-E8) and isotype-matched control antibody IgG2a (No 857.080.000, clone B-Z2) or IgG1 (No 857.070.000, clone B-Z1) were purchased from Diaclone (Besançon, France).

Cell culture - SF763, SF767, U87MG and U251MG cell lines were kindly provided by Dr C. Delmas (Centre Claudius Regaud, Toulouse, France). SW1783, SNB19, and U373MG were obtained from N. Auger (Institut Curie, Paris, France). T98G, U118MG and CB193 cell lines were kindly provided by G. Pennarun (CEA, Grenoble, France). M059K, MO59J, CCF, LN229 and U138MG cell lines were given by N. Foray and Claire Rodriguez Lafrasse (Centre Léon Bérard, Lyon, France). All cell lines were cultured in DMEM (with 4500mg/l glucose and L-glutamine) supplemented with Sodium Pyruvate 1%, Non-Essential Amino

Acids 1%, Gentamicin 10µg/ml and 10% Foetal Calf Serum (20% for U138MG and CCF) in a humidified incubator containing 5% CO2 at 37°C.

Western blot - Cells in exponential phase of growth were harvested using Buffer C supplemented with NP-40, phosphatase inhibitors (NaF, Na3VO4) and protease inhibitor IP25X (Roche). Total proteins (30µg) were boiled in Laemmli sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Biosciences) followed by blocking in Tris-buffered saline 1X, 10% powdered milk (Fat free), and incubated with indicated antibodies in the same buffer overnight at 4°C. Membranes were washed three times with 1X Tris-buffered saline, 0.05% Tween 20, and then incubated 1h with anti-rabbit (P.A.R.I.S) peroxidase-conjugated IgG. Detection was performed using ECL system (PerkinElmer Life Sciences). Three independent experiments were used for analysis with Quantity One (BioRad).

Real Time PCR - Total RNA was extracted from the cells using the Trizol Reagent (Invitrogen). The cDNA template was prepared using random hexamer primers and Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen). After the reverse transcription IL-6, VEGF, Mcl-1L and Abl mRNA were quantified using real-time RT-PCR technology (LightCycler, Roche) with SYBR green as the fluorophore and using previously reported primers.14-17 Abl gene was used as an internal endogenous standard and the results were expressed as a target gene/Abl ratio. The reactions were performed in duplicate, with a variation between two crossing point values ≤ 0.5.

Apoptosis and proliferation - Cells were seeded at a density of 1 500 per well in 96 well plates. Twenty four hours after seeding, they were incubated with medium alone or exposed for 96 hours to MAb (gp80, gp130 or IL-6) or control (IgG1, IgG2a) antibodies. For flow cytometry analysis, cells were recovered after treatment and washed in PBS. Pellets were resuspended in an RNase A (500 µg/ml), propidium iodide (50 µg/ml) solution and kept 1 h at 4 °C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter Analyser XL2. The percentage of apoptotic cells was determined by evaluating sub-G1 nuclei accumulation. At least 8 000 events were measured for each sample. DNA-synthesis was determined by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (4h) using the Cell Proliferation ELISA (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) which is based on incorporation of BrdU into newly synthesized DNA and antibody-mediated detection of incorporated BrdU, as described by Herold *et al*.[14] Proliferation was evaluated by percentage of BrdU incorporation compared to control (medium alone). Proliferation and apoptosis experiments were performed in triplicate.

Immunohistochemistry analysis of tumor samples - Glioblastoma samples were taken from the material of surgical resection during the course of standard diagnostic procedure. 36 tumours, classified as gliobastoma (grade IV), according to histological diagnosis and grading criteria (World Health Organization, 2000) were used in this study. Patients were treated by surgery followed by radiotherapy and concomitant temozolomide followed by monthly cycles of adjuvant temozolomide.[8] Immunostaining of pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 was performed with a Benchmark XT immunostainer (Ventana, Illkirch, France) on 3-µm paraffin sections. After deparaffinization, antigen retrieval was carried out for 30 minutes in CCI buffer. pSTAT3-Y705 (No 9145, Ozyme) or pSTAT3-S727 (No 1121-1,Euromedex) antibodies were incubated for 44 minutes at 37°C and the revelation was made with the Ultraview detection kit (Ventana). Sections were scored semiquantitatively by light microscopy by two pathologists (J-L. Kemeny and I. Rahoelis) Cytoplasmic and nuclear staining and the percentage of stained tumor cells and staining intensity (no, weak, moderate, strong) for each localization were specified.

Results

STAT3 pathway activation in glioma, impact of IL-6 inhibition on STAT3 signaling – Prior to any investigation and in agreement with previous results, we confirmed by ELISA that all cell lines used secreted IL-6 except the cell line SF767 (data not shown). All cell lines were then tested by Western blot for STAT3 activation on both Y705 and S727 residues. The results show that S727 is always phosphorylated whereas Y705 residue activation is more heterogeneous (arbitrary units, Table 1). Two IL-6 positive cell lines (SF763 and SNB19) were chosen to study the impact of IL-6 pathway down modulation on STAT3 signaling. STAT3 phosphorylated Y705 and S727 residues and total STAT3 protein were analyzed by Western blot after IL-6 pathway inhibition. As shown in Figure 1A, the exposure of SF763 cells to MAbs anti-gp130, anti-gp80, or anti-IL-6 treatment abrogated activation of pSTAT3-Y705 (24h, 10µg/ml). This decrease is highly specific regarding to IgG1 and IgG2a control antibodies' effect. In the second cell line SNB19, we found that the MAb anti-gp-130 was able to decrease STAT3 Y705 phosphorylation whereas anti-gp80 and anti-IL-6 MAbs did not (Figure 1B). For both cell lines, STAT3-S727 was unaffected by MAbs exposure.

IL-6/gp130/STAT3 pathway inhibition did not affect glioma proliferation and apoptosis - Despite a strong decrease of pSTAT3-Y705 the antibody exposure did not affect proliferation and apoptosis in SF763 cells determined by BrdU and Sub G0/G1 respectively (Figure 2A and B). To complete these unexpected results, we explored the impact of Y705 inhibition on STAT3 gene expression by real time PCR but no decrease in both VEGF and Mcl-1 mRNA was observed (Figure 2B and C). Same results were obtained in SNB19 cell line too (Supplementary Figure 1).

STAT3 pathway activation in glioma sections –Because *in vitro* analysis revealed that STAT3-S727 is phosphorylated in all malignant glioma cell lines studied by Western Blot (Table 1), we finally assessed the level of activation of pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 in human glioblastoma paraffin sections (Figure 3). pSTAT3-Y705 staining was found in 24/30 patients and exclusively in the nucleus with an average of 38% of positive cells. Moreover, staining intensity was found equally in the 3 groups: weak (10%), moderate (17%) and strong (11%). By contrast pSTAT3-S727 staining was found in all sections tested, also exclusively in the nucleus but in all tumor cells (100% positive cells). Staining intensity was distributed as follow: weak (4%), moderate (41%) and strong (55%). Pathologists observed pSTAT3-S727 negative cells in tumor free margin only. So STAT3-S727 activation is a common feature of malignant glioma *in vitro* and *in vivo*.

Discussion

STAT3 is frequently activated in human malignant glioma, and its functions in many cellular processes including apoptosis inhibition could be involved in resistance to anticancer treatment. STAT3 is thereby a hub in glioma signaling and has significant potential as a relevant therapeutic target.[15] In this study we investigated the impact of STAT3-Y705 inhibition on glioma cells using MAbs directed against IL-6 cytokine or its receptor subunits. After MAbs exposure an abrogation of pSTAT3-Y705 activation in SF763 cell line was observed. These results demonstrate that IL-6 acts in an autocrine manner on SF763 cells. In SNB19 cells, only the anti gp-130 but not the anti-gp80 nor the anti-IL-6 antibodies inhibited pSTAT3-Y705. As gp130 is a receptor subunit common to many receptors such as Interleukin-11 receptor, Leukemia Inhibitory Factor receptor or Oncostatin M receptor,[16] STAT3-Y705 activation involving gp130 might rather result from the binding of another ligand than IL-6 in these cells. Interestingly, the phosphorylation of another conserved STAT3 residue, serine 727 (S727), is not affected by antibodies treatment. Previous data demonstrated the ability of the MAbs against gp80, gp130 or IL-6 to inhibit proliferation in other cell lines.[17-19] Janus kinase inhibitor AG490 or WP1066 treatment inhibited STAT3-

Y705 activation, markedly reduced the proliferation and induced apoptosis of U251MG glioma cells but pSTAT-S727 has not been investigated in these studies.[9,20] By contrast, in the present study, we did not found any effect on proliferation and apoptosis of glioma cells. Because we did not find any decrease in *VEGF* and *Mcl-1* expression contrarily to some authors,[9,20,21] we assume that pSTAT3-S727 can maintain STAT3 target gene expression in the absence of pSTAT3-Y705 activation. In view of the fact that (i) a strong pSTAT3-Y705 inhibition is well tolerated in our glioma cell lines, and that (ii) the inhibition of STAT3 expression using siRNA in glioma cells is known to lead to apoptosis,[22,23] we suggest that pSTAT3-S727 could explain the tolerance to IL-6/gp130/STAT3 pathway inhibition observed in glioma cells.

Strengthening this, pSTAT3-S727 was recently reported to be involved in the maintenance of glioma stem cell features.[24] We here confirmed that STAT3-S727 activation is a common feature of malignant glioma *in vitro* and *in vivo* because we reported for the first time that all malignant glioma cell line and glioma patients tumor sections tested were positive. Moreover, a recent work suggests that pSTAT3-S727 is sufficient to activate STAT3 and to drive prostate tumorigenesis independently of Y705 phosphorylation.[25] A constitutive serine 727 phosphorylated form of STAT3 that translocates to the nucleus, binds DNA, and activates transcription was also recently described in B-cell chronic lymphocytic leukemia.[13] The current limit is that S727 phosphorylation function is not fully understood because some authors reported that both Y705 and S727 phosphorylation are necessary for full activation of STAT3[26] and others observed an inhibition of pY705 in presence of pS727.[27] The mechanism by which STAT3 is phosphorylated on its S727 residue remains also unclear. There is some evidence that this phosphorylation occurs in the nucleus.[11] Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) and c-Jun N-terminal kinases (JNKs) pathways have been described to phosphorylate STAT3-S727 residue.[28] Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and p90 Ribosomal protein S6 Kinase (RSK2) have also been reported to be involved in STAT3-S727 activation[29]. This residue could be phosphorylated by Protein Kinase C epsilon (PKCε) as recently described[30] or PKC delta (PKCδ).[31] STAT3-S727 phosphorylation could occur during S phase and this phosphorylation could be done by CDK5 in response to DNA damage.[32] Courapied *et al.,* speculate that after S727 phosphorylation by CDK5, STAT3 could form a complex with NFκB that can lead to specific gene expression especially involved in DNA repair. This STAT3-NFκB complex was previously described and composed by NFκB and STAT3 that is unphosphorylated on Y705 residue however the level of STAT3-S727 was not assessed in these studies.[33,34] Despite our negative results, targeting IL-6/gp130/STAT3-Y705 pathway in glioma remains of interest as attested by sensitization of glioma to temozolomide using STAT3 siRNA,[35] and by IL-6 role in relationship between tumor cells and microenvironment.[36]

In summary, our results strongly suggest that (i) *in vitro* tolerance to IL-6/gp130/STAT3 pathway inhibition could be a characteristic of glioma cells and (ii) STAT3-S727 residue activation, a common feature in malignant glioma, could be involved in this mechanism. At the moment no specific inhibitor is available to evaluate the impact of pSTAT3-S727 inhibition and the mechanism(s) responsible of STAT3-S727 phosphorylation in malignant glioma remain(s) to be determined. These unexpected results underline the need to explore the role of pSTAT3-S727 in survival and progression of malignant glioma.

Funding : This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy De Dôme), by the Institut National du Cancer and by the Region Auvergne. E.C. was the recipient of a fellowship from the MENESR (Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

Acknowledgments
We are grateful to Mélanie Barthélémy, Yves Communal, Angélique DeHaze, Annette Quinsat, and Jean-Paul Saru for technical assistance.

References

1 Barre B, Vigneron A, Perkins N, Roninson IB, Gamelin E and Coqueret O. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med.* 2007;13:4-11
2 Bowman T, Garcia R, Turkson J and Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000;19:2474-2488
3 Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, et al. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology.* 2005;42:1329-1338
4 Niu G, Wright KL, Huang M, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2002;21:2000-2008
5 Song Y, Qian L, Song S, et al. Fra-1 and Stat3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene. *Mol Immunol.* 2008;45:137-143
6 O'Neill DW, Adams S and Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood.* 2004;104:2235-2246
7 DeAngelis LM, Burger PC, Green SB and Cairncross JG. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol.* 1998;44:691-695
8 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-996
9 Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA and Haque SJ. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene.* 2002;21:8404-8413
10 Schaefer LK, Ren Z, Fuller GN and Schaefer TS. Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene.* 2002;21:2058-2065
11 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G and Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374:1-20
12 Buettner R, Mora LB and Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res.* 2002;8:945-954
13 Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z, et al. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood.* 2010;115:2852-2863
14 Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Hermann M, Hahn EG and Schuppan D. Combined in vitro anti-tumoral action of tamoxifen and retinoic acid derivatives in hepatoma cells. *Int J Oncol.* 2002;20:89-96
15 Brantley EC and Benveniste EN. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol Cancer Res.* 2008;6:675-684
16 Kamimura D, Ishihara K and Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149:1-38
17 Chevalier S, Fourcin M, Robledo O, Wijdenes J, Pouplard-Barthelaix A and Gascan H. Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem.* 1996;271:14764-14772
18 Fourcin M, Chevalier S, Lebrun JJ, et al. Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. *Eur J Immunol.* 1994;24:277-280
19 Wijdenes J, Clement C, Klein B, et al. Human recombinant dimeric IL-6 binds to its receptor as detected by anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Mol Immunol.* 1991;28:1183-1192
20 Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, et al. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2007;26:2435-2444
21 Loeffler S, Fayard B, Weis J and Weissenberger J. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer.* 2005;115:202-213
22 Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM and Cochran BH. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer.* 2003;3:23
23 Li GH, Wei H, Chen ZT, Lv SQ, Yin CL and Wang DL. STAT3 silencing with lentivirus inhibits growth and induces apoptosis and differentiation of U251 cells. *J Neurooncol.* 2009;91:165-174

24 Villalva C, Martin-Lanneree S, Cortes U, et al. STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas : A potential for targeted therapy ? *Int J Cancer.*
25 Qin HR, Kim HJ, Kim JY, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation. *Cancer Res.* 2008;68:7736-7741
26 Schuringa JJ, Schepers H, Vellenga E and Kruijer W. Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Lett.* 2001;495:71-76
27 Chung J, Uchida E, Grammer TC and Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6508-6516
28 Lim CP and Cao X. Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem.* 1999;274:31055-31061
29 Zhang Y, Cho YY, Petersen BL, Bode AM, Zhu F and Dong Z. Ataxia telangiectasia mutated proteins, MAPKs, and RSK2 are involved in the phosphorylation of STAT3. *J Biol Chem.* 2003;278:12650-12659
30 Aziz MH, Hafeez BB, Sand JM, et al. Protein kinase Cvarepsilon mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression, and cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene.* 2010
31 Schuringa JJ, Dekker LV, Vellenga E and Kruijer W. Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J Biol Chem.* 2001;276:27709-27715
32 Courapied S, Sellier H, de Carne Trecesson S, et al. The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem.* 2010;285:26765-26778
33 Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE and Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev.* 2007;21:1396-1408
34 Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res.* 2005;65:939-947
35 Kohsaka S, Wang L, Yachi K, et al. STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression. *Mol Cancer Ther.* 2012;11:1289-1299
36 Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W and Yong VW. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis.* 2012;33:312-319

Table 1

		Western Blot								
Cell line	origin	pSTAT3-Y705/STAT3 activation				pSTAT3-S727/STAT3 activation				
T98G	glioblastoma	0.31	+/-	0.07		0.79	+/-	0.23		
CB193	glioma grade III	0.13	+/-	0.03		1.68	+/-	0.8		
U118MG	glioblastoma	0.04	+/-	0.01		0.46	+/-	0.09		
U87MG	glioblastoma	0.01	+/-	0.01		1.08	+/-	0.51		
SW1783	astrocytoma garde III	0.01	+/-	0.01		0.92	+/-	0.33		
SF767	glioblastoma	0	+/-	0		1.18	+/-	0.16		
SNB19	glioblastoma	0.18	+/-	0.01		1.05	+/-	0.48		
U373MG	glioblastoma	0.17	+/-	0.02		1.11	+/-	0.67		
SF763	glioblastoma	0.34	+/-	0.04		1.55	+/-	0.96		
U251MG	glioblastoma	0.1	+/-	0.01		0.6	+/-	0.24		
LN229	glioblastoma	0.21	+/-	0.02		0.56	+/-	0.16		
MO59J	glioblastoma	0.02	+/-	0.01		0.53	+/-	0.2		
MO59K	glioblastoma	0.06	+/-	0.01		0.33	+/-	0.1		
CCF	glioblastoma	0.32	+/-	0.03		0.51	+/-	0.14		
U138MG	glioblastoma	0	+/-	0		0.5	+/-	0.24		

Table 1 : STAT3 pathway activation in glioma cell lines.
Cells were harvested during exponential growth phase and thirty micrograms of total proteins were loaded per lane and electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Y705, anti-pSTAT3-S727. To ensure equal protein loading the blots were stripped and reprobed with anti-β-actin antibody. Three independent experiments with consistent results were done prior to densitometric analyses presented as relative ratios of phosphoprotein/total protein (Mean values ± standard error of triplicate determinations, arbitrary units).

Figure 1

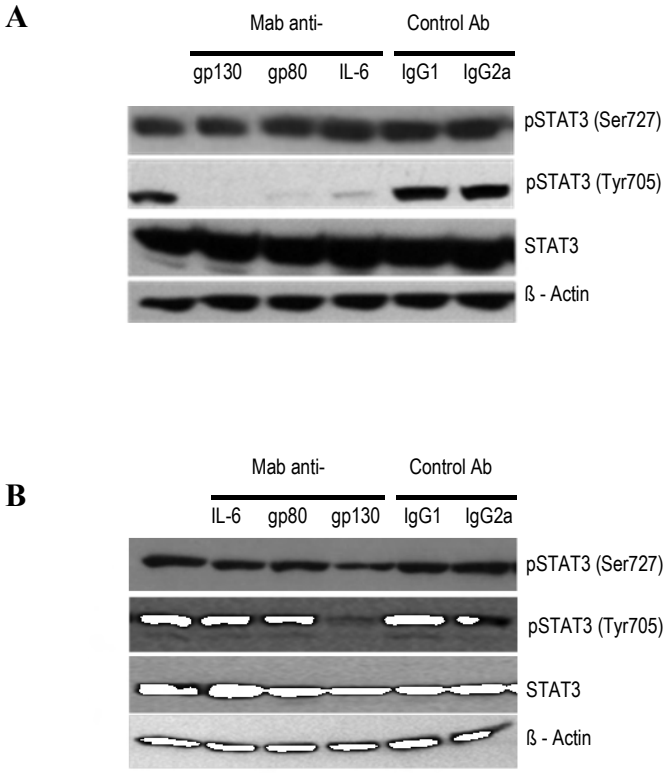


Figure 1: Impact of MAbs anti- IL-6/IL6R on intracellular signaling.
SF763 (***A***) and SNB19 (***B***) cells were treated for 24h with or without MAbs or isotype related control antibodies (10µg/ml). Total proteins were electrophoresed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-STAT3, anti-Akt, anti-pSTAT3-Tyr705, anti-pAkt-Ser473 and anti-β-actin antibody. The blot is representative of three independent experiments with consistent results.

Figure 2

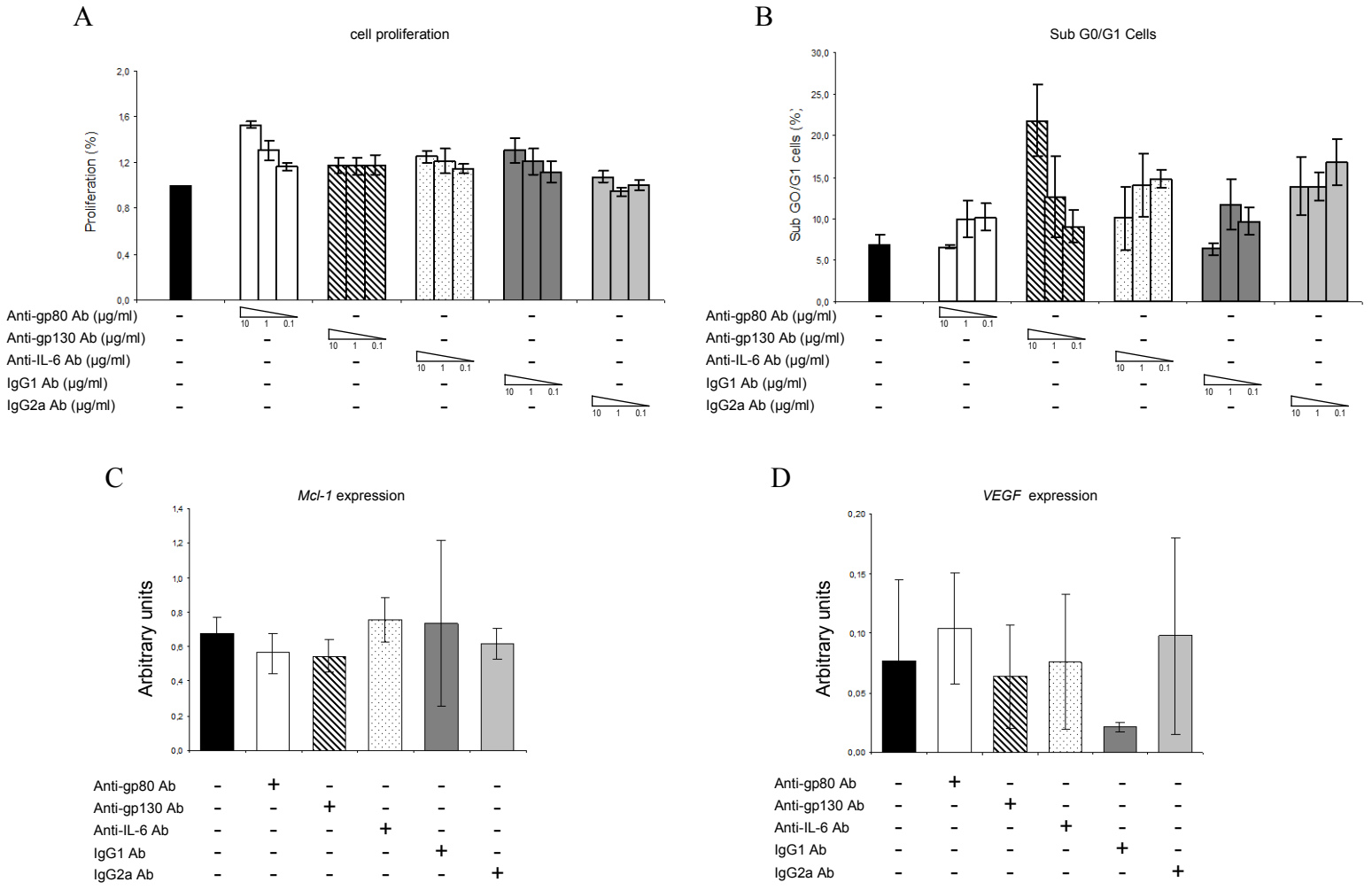


Figure 2 : Impact of MAbs anti- IL-6/IL6R on SF763 cells proliferation, apoptosis and gene expression.

After 96h of treatment with or without MAbs anti- IL-6/IL6R (10, 1 or 0.1µg/ml) or isotype related control antibodies ***(A)*** proliferation was evaluated after BrdU incorporation, ***(B)*** Sub G0/G1 cells were determined by flow cytometry. ***C and D :*** Total cellular RNA was isolated and real-time reverse transcription PCR was performed after antibody treatment (24h, 10µg/ml) as described in Material and Methods. The results were expressed as *Mcl-1* or *VEGF* / *Abl* ratio (arbitrary units). Data are shown as mean of triplicate experiments.

Figure 3

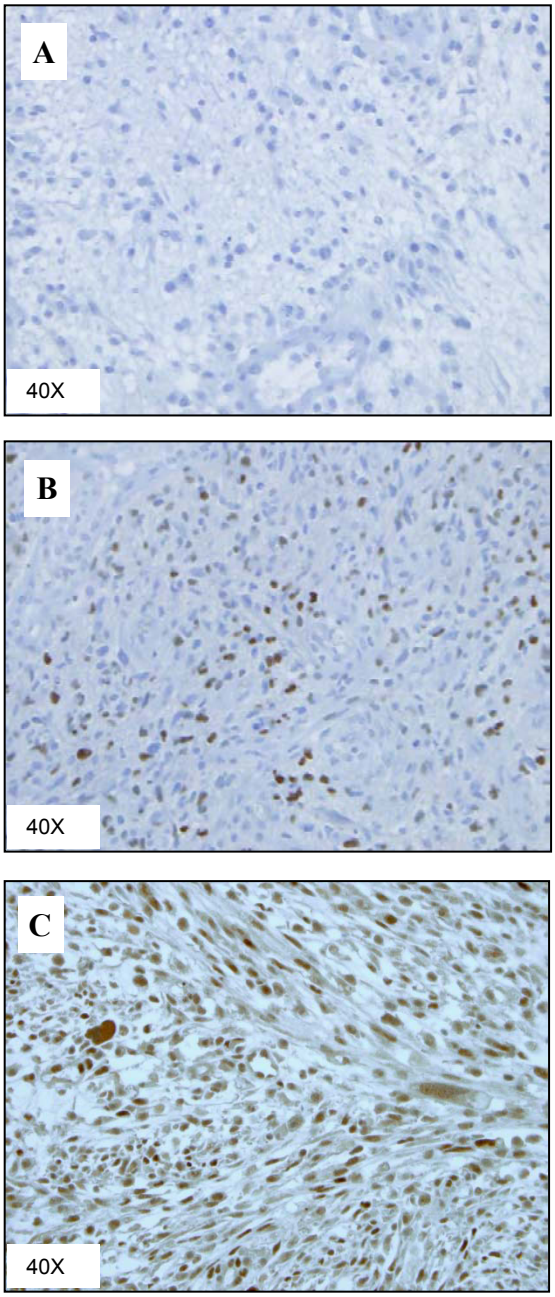


Figure 3: STAT3 pathway activation in glioma sections.
Immunostaining of pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 was performed on paraffin sections as described in Materials and Methods. Photomicrograph (40X) of : *(A)* pSTAT3-Y705 negative staining, *(B)* pSTAT3-Y705 positive staining and *(C)* pSTAT3-S727 positive staining.

Supplementary Figure S1

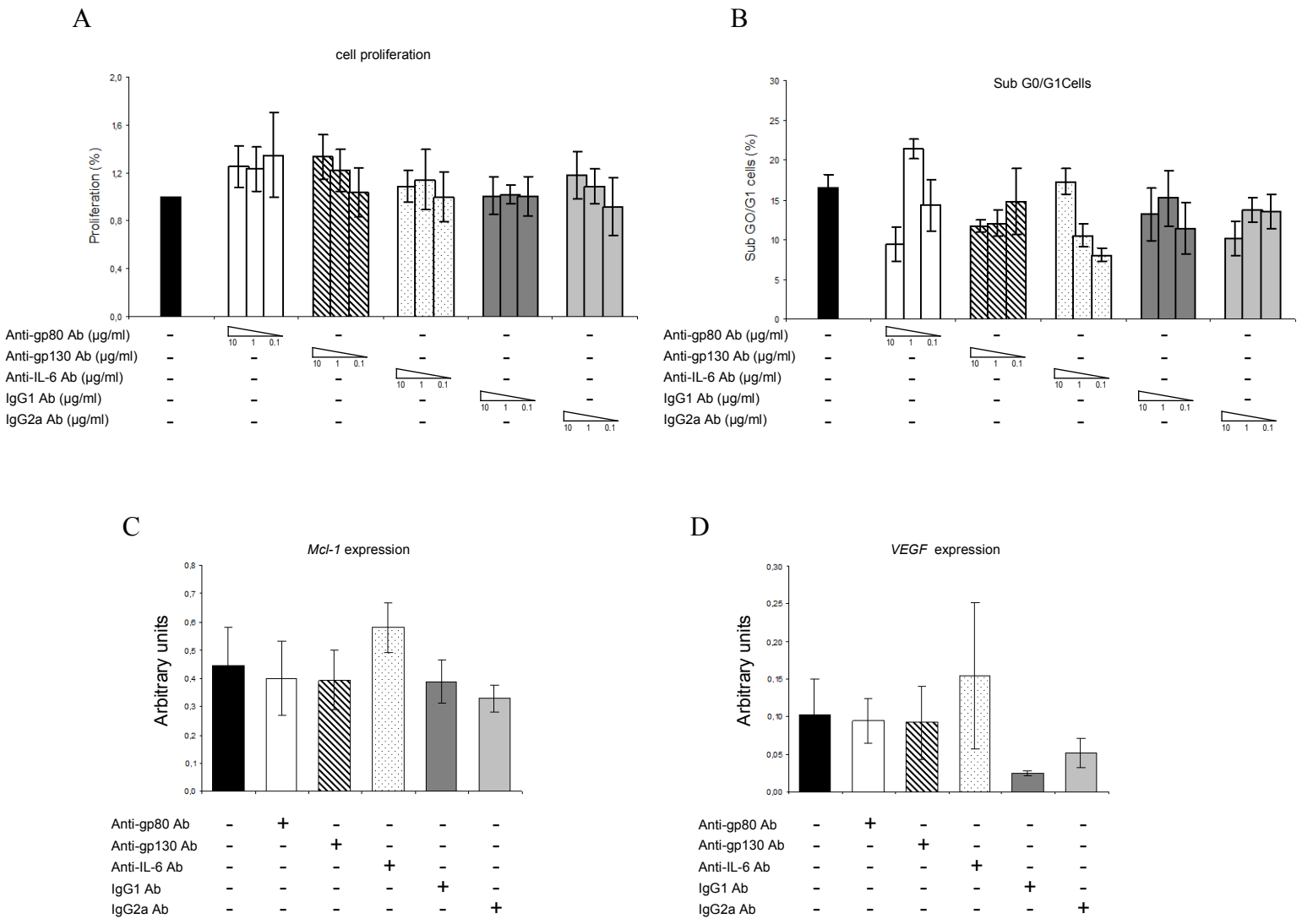


Figure S1 : Impact of MAbs anti- IL-6/IL6R on SNB19 cells proliferation, apoptosis and gene expression.

After 96h of treatment with or without MAbs anti- IL-6/IL6R (10, 1 or 0.1µg/ml) or isotype related control antibodies ***(A)*** proliferation was evaluated after BrdU incorporation, ***(B)*** Sub G0/G1 cells were determined by flow cytometry. ***C and D :*** Total cellular RNA was isolated and real-time reverse transcription PCR was performed after antibody treatment (24h, 10µg/ml)as described in Material and Methods. The results were expressed as *Mcl-1L* or *VEGF* / *Abl* ratio (arbitrary units). Data are shown as mean of triplicate experiments.

Neuro-Oncology 12(5):434–443, 2010.
doi:10.1093/neuonc/nop059
Advance Access publication February 4, 2010

Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma

Emmanuel Chautard, Gaëlle Loubeau, Andreï Tchirkov, Jacques Chassagne, Claudine Vermot-Desroches, Laurent Morel, and Pierre Verrelle

Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale, EA 3846: Thérapie Ciblée Combinatoire en Onco-Hématologie—Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France (E.C., G.L., A.T., J.C., P.V.); Laboratoire d'Hématologie Biologique, CHU et Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France (J.C.); OPi EUSA Pharma, Dardilly, France (C.V.-D.); GReD, Génétique Reproduction et Développement, UMR-CNRS 6247—Clermont Université, Aubière, France (L.M.)

Radiation therapy plays a central role in the treatment of glioblastoma, but it is not curative due to the high tumor radioresistance. Phosphatidyl-inositol 3-kinase/protein kinase B (Akt) and Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathways serve to block the apoptosis process, keeping cells alive in very toxic environments such as chemotherapy or ionizing radiation. In the present study, from a panel of 8 human malignant glioma cell lines, investigations on the relationship between intrinsic radioresistance and Akt or STAT3 basal activation were done. Secondly, the impact of down-modulation of Akt or STAT3 signaling on in vitro intrinsic radiosensitivity was evaluated. Using a clonogenic cell survival assay, our results revealed a significant correlation between the basal Akt activation and the surviving fraction at 2 Gy (SF2). In contrast, no correlation was found between STAT3 activation and SF2. According to this, down-modulation of Akt with a specific chemical inhibitor (Akt inhibitor IV) demonstrated a significant enhancement of radiation sensitivity on glioma cells in a clonogenic survival assay. On the contrary, down-modulation of STAT3 signaling with a specific chemical inhibitor (JSI-124) or a neutralizing gp130 antibody failed to radiosensitize glioma cells. These data indicate that the Akt intercept node could be a more relevant therapeutic target than STAT3 for radiosensitizing human malignant glioma.

Received March 19, 2009; accepted August 27, 2009.

Corresponding Author: Emmanuel Chautard, PhD, Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale, EA 3846: Thérapie Ciblée Combinatoire en Onco-Hématologie—Université d'Auvergne, 58 rue Montalembert, Clermont-Ferrand 63001, France (emmanuel.chautard@cjp.fr).

Keywords: Akt signaling pathway, human malignant glioma, intrinsic radioresistance, STAT3 signaling pathway

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system.[1–3] Among these tumors, the most frequent and malignant type is glioblastoma multiforme (GBM). Glioblastomas have been described as rapidly growing tumors associated with necrosis and endothelial proliferation. These neoplasms are extremely resistant to treatment, including radiotherapy and/or chemotherapy, and patient median survival does not exceed 1 year.[4,5]

Although radiotherapy increases patient survival, this treatment is not curative because of tumor regrowth inside the irradiated tumor volume.[6–8] This might be explained by the fact that interactions between tumor and microenvironment are involved in tumoral radioresistance through angiogenesis,[9] hypoxia,[10] and immunosuppression.[11,12] Another part of tumor radioresistance is due to the intrinsic radioresistance of tumor cells themselves. A molecular analysis in tumor samples of basal activation of different signaling pathways potentially involved in radioresistance could be of clinical interest. Phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways serve to block the apoptosis process, keeping cells alive in very toxic environments such as chemotherapy or ionizing radiation (IR).[13,14] In a bioclinical prospective study, Chakravarti et al.[15] showed a significant correlation between the level of basal Akt phosphorylation and a poor prognosis in human glioma in a subset of patients treated by radiotherapy only. Rahaman et al.[16] reported experimental data demonstrating that inhibition of the STAT3 signaling pathway was also associated with

© The Author(s) 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Neuro-Oncology. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org.

increased apoptosis and proliferation inhibition in malignant glioma.

The development of Akt and STAT3 inhibitors has been a goal of pharmaceutical companies since the discovery that these pathways are often activated in numerous human cancers such as melanoma, myeloma, brain cancer, breast cancers, and ovarian cancer.[17,18] Combining drugs with radiation is common in cancer treatment and aims at achieving better therapeutic effects than with single-modality therapy. Several chemical in vitro inhibitors have been developed against Akt[17] or STAT3.[19] Akt inhibitor IV (5-(2-benzothiazolyl)-3-ethyl-2-[2-(methylphenylamino)ethenyl]-1-phenyl-1*H*-benzimidazolium iodide) inhibits Akt phosphorylation by targeting the ATP-binding site of a kinase upstream of Akt, but downstream of PI3K.[20] Akt inhibitor IV sensitized human leukemic HL-60 cells to TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand).[21] JSI-124, cucurbitacin I, is a triterpenoid compound that acts as a highly selective inhibitor of the JAK/STAT3 signaling pathway.[22] JSI-124 was recently shown to sensitize malignant glioma and medulloblastoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, and cisplatin, with a synergy between JSI-124 and cisplatin.[23]

Here, we studied in human malignant glioma cell lines: (i) the relationship between intrinsic radioresistance and Akt or STAT3 basal activation; and (ii) the impact of down-modulation of Akt or STAT3 signaling on in vitro intrinsic radiosensitivity. Down-modulation of Akt with a chemical inhibitor (Akt inhibitor IV) demonstrated a significant enhancement of radiation sensitivity on glioma cells in a clonogenic survival assay. On the contrary, down-modulation of STAT3 signaling with a chemical inhibitor (JSI-124) or a neutralizing gp130 antibody failed to radiosensitize glioma cells. The radioresistance was evaluated using a clonogenic cell survival assay, and the basal level of activation of signaling pathways was evaluated using Western blot. These data indicate that the Akt intercept node could be a more relevant therapeutic target than STAT3 for radiosensitizing human malignant glioma.

Methods and Materials

Materials

Akt (no. 9272), phospho-Akt Ser473 (no. 9271), STAT3 (no. 4904), and phospho-STAT3 Tyr705 (no. 9145) rabbit antibodies were from Ozyme. β-actin (no. A2066) was from Sigma, and antirabbit-peroxidase was from P.A.R.I.S. All culture reagents were purchased from GIBCO (Invitrogen). gp130-blocking antibody (no. 852.060.000) and control (IgG2a, no. 857.080.000) mouse antibody were from Diaclone.

Cell Culture

Eight human malignant glioma cell lines were used in this study. SF763, SF767, and U251MG cell lines were kindly provided by Dr C. Delmas (Centre de Lutte Contre le Cancer Claudius Regaud). SW1783, SNB19, and U373MG were obtained from N. Auger (Institut Curie). T98G and CB193 cell lines were kindly provided by G. Pennarun (CEA). All cell lines were cultured in DMEM (with 4500 mg/L glucose and L-glutamine) supplemented with sodium pyruvate 1%, nonessential amino acids 1%, gentamicin 10 μg/mL, and 10% fetal calf serum in a humidified incubator containing 5% CO_2 at 37°C. All cell lines were mycoplasma-free after treatment with plasmocin (Invivogen).

Clonogenic Cell Survival Assay

Cells in the exponential phase of growth were trypsinized with a 0.25% trypsin–PBS solution and were seeded at 1000–4000 cells per T25 flask. One day after, 3 flasks were irradiated per dose, and irradiation was performed as single-exposure doses delivered by a linear accelerator at room temperature. After 9 days of incubation, the content of the flasks was fixed with methanol and stained with a Giemsa stain solution (5%). The plating efficiency (PE) represents the percentage of cells seeded that grew into colonies of a given cell line. Colonies with more than 50 cells were counted by microscopic inspection, and PE as well as the radiation-surviving fraction (PE of experimental group/PE of control group) were determined. Each experiment was repeated on 3 separate days, and each day triplicates of each dose were performed. The intrinsic radiosensitivity was evaluated by using two parameters: the surviving fraction at 2 Gy (SF2) and the area under the survival curve (AUC). Survival curves were obtained by combining data from 3 independent experiments (separate days) in accordance with a linear-quadratic model (KaleidaGraph software 4.0).

Western Blot

Cells in the exponential phase of growth were harvested using Buffer C supplemented with NP-40, phosphatase inhibitors (NaF, Na_2VO_3), and the protease inhibitor IP25X (Roche). Total proteins (30 μg) were boiled in Laemmli sample buffer and subjected to SDS–PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Biosciences) followed by blocking in 1× Tris-buffered saline, 10% powdered milk, and incubated with indicated antibodies in the same buffer overnight at 4°C. Membranes were washed 3 times with 1× Tris-buffered saline, 0.05% Tween 20, and then incubated 1 hour with antirabbit (P.A.R.I.S) peroxidase-conjugated IgG. Detection was performed using the ECL system (PerkinElmer Life Sciences). Three independent experiments were used for analysis with Quantity One (Bio-Rad).

Chemical Akt and STAT3 Inhibitors

Akt inhibitor IV (B2311) was from Sigma and STAT3 inhibitor (JSI-124) was from Calbiochem (VWR). Stock solutions of Akt inhibitor IV (81.3 μM) and of JSI-124 (19 μM) were constituted using DMSO and

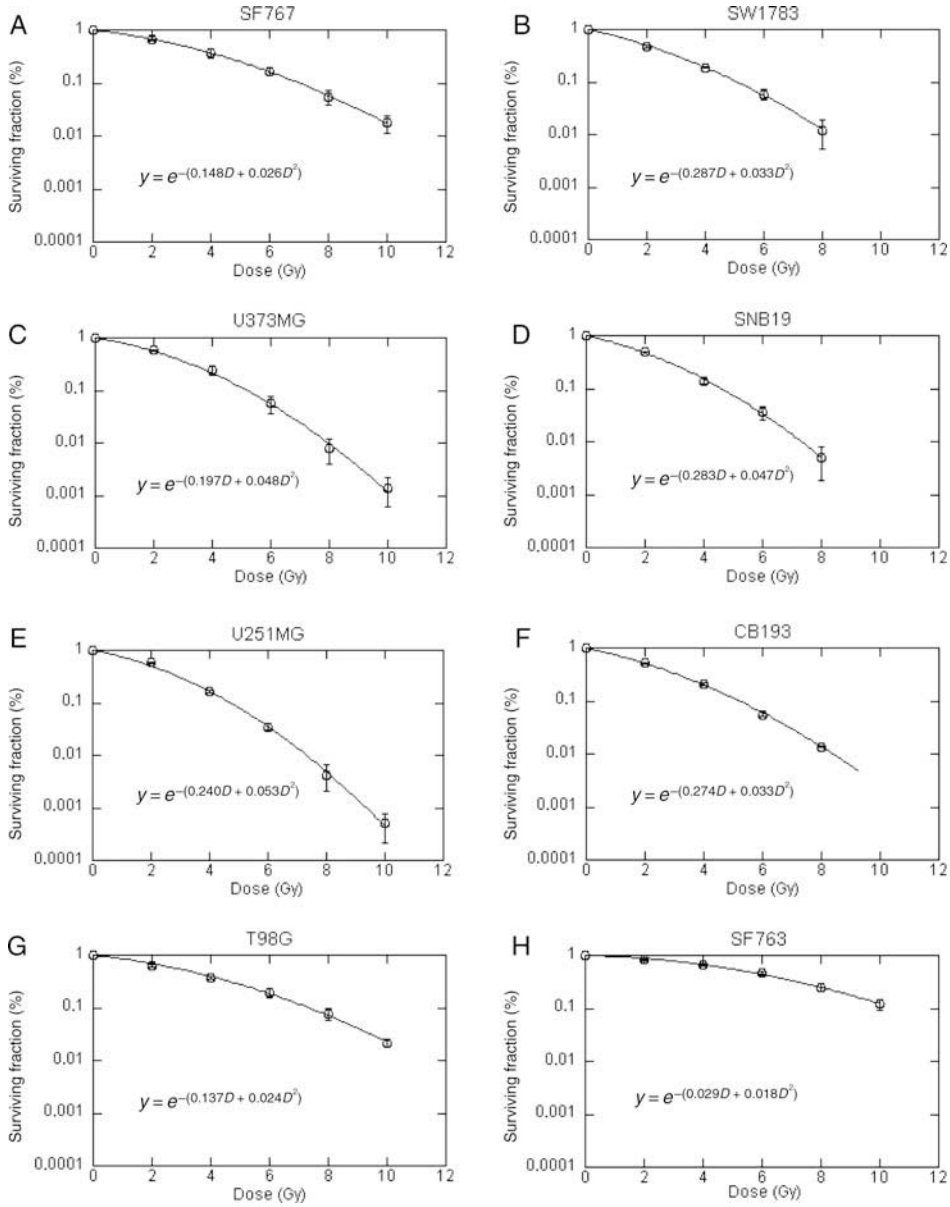


Fig. 1. (A–H) Clonogenic survival curves of human malignant glioma cell lines. Cells were irradiated during the exponential growth phase and survival data were obtained from standard clonogenic assays. Data are represented by their mean $\pm$ *SE* and are fitted to the linear-quadratic model. Linear quadratic relation: $y = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$.

stored at −20°C. These stock solutions were diluted to the desired concentration with culture medium. For Western blot analysis, cells were exposed 7 hours to inhibitor prior to protein extraction. For the clonogenic survival assay in the presence of a chemical inhibitor, 1000–4000 cells were seeded per T25 flask. One day after, cells were preincubated with the different inhibitors (Akt inhibitor IV, JSI-124, or DMSO) for 7 hours prior to irradiation and then cells were cultured with inhibitor for up to 24 hours. Data were normalized to control (treatment with inhibitor without irradiation) to exclude the effect of the inhibitor alone on the surviving fraction.

Results

Radiosensitivity Analysis of Human Glioma Cell Lines by Clonogenic Cell Survival

The intrinsic radiosensitivity of the glioma cell lines was investigated using the standard clonogenic assay. Cell lines were irradiated with increasing doses of radiation (0, 2, 4, 6, 8, and 10 Gy). SF2 and AUC were used to measure the intrinsic radiosensitivity. Survival data were fitted to the linear-quadratic model (Fig. 1). As shown in Table 1, PE values varied from 0.05 to 0.28. SF2 values ranged from 0.46 to 0.83, and AUC values

Table 1. Radiosensitivity of 8 tumor cell lines

Cell line	Origin	SF2	AUC (Gy)	PE
SF767	Glioblastoma	0.68 ± 0.05	3.6	0.20
SW1783	Astrocytoma grade III	0.46 ± 0.03	2.4	0.05
U373MG	Glioblastoma	0.58 ± 0.03	2.8	0.13
SNB19	Glioblastoma	0.50 ± 0.01	2.3	0.12
U251MG	Glioblastoma	0.58 ± 0.01	2.6	0.28
CB193	Glioma grade III	0.52 ± 0.02	2.6	0.07
T98G	Glioblastoma	0.64 ± 0.05	3.6	0.09
SF763	Glioblastoma	0.83 ± 0.04	5.5	0.17

Abbreviations: SF2, surviving fraction at 2 Gy; AUC, area under the survival curve; PE, plating efficiency.

ranged from 2.4 to 5.5. A significant correlation between SF2 and AUC ($r = 0.951$; $P = .00043$; linear regression) was observed. Our data obtained are in agreement with previous results evaluating the radiosensitivity of human glioma.[24–27] SF763 and SW1783 appeared to be, respectively, the most and the least radioresistant cell lines with 0.83 and 0.46 Gy for SF2, and 5.5 and 2.4 Gy for AUC values.

Correlation Between Activation Levels of Akt and STAT3 and Radiosensitivity

Among the human glioma cell line panel, STAT3 phosphorylated Tyr705 and Akt phosphorylated Ser473 residues, which are known to be the active phosphorylation sites,[28,29] and STAT3 and Akt expressions were analyzed by Western blot (Fig. 2). Levels of activation were estimated by the phospho-protein/total protein expression ratio. A significant correlation was found between the pAkt/Akt ratio and SF2 ($r = 0.764$; $P = .027$; linear regression), but not between the pSTAT3/STAT3 ratio and SF2. Note that the most radioresistant cell line, SF763, exhibited a high basal activation of both Akt and STAT3 signaling pathways. On the contrary, no activation of these pathways was observed in the SW1783 cell line, which is most sensitive to IR.

Impact of Akt or STAT3 Signaling Down-Modulation on Glioma Radioresistance

We used chemical Akt and STAT3 inhibitors at lower doses that slightly affect PE in the absence of radiation in order to underline a radiosensitizing effect. In our study, the SF763 cell line exhibited an activation of both Akt and STAT3 signaling. The SF767 and SNB19 cell lines presented, respectively, only Akt and STAT3 activation pathways in basal conditions.

First, SF763 cells were treated with a concentration range of Akt inhibitor IV for 7 hours, and Akt phosphorylation was investigated using Western blot analyses. As previously reported for other cell lines,[20] we observed a specific decrease in Akt activation with a dose of 10 μM in SF763 cells compared with cells treated with DMSO. We also observed a lower decrease in Akt activation with 0.2 and 5 μM (Fig. 3A). Akt inhibitor IV decreased

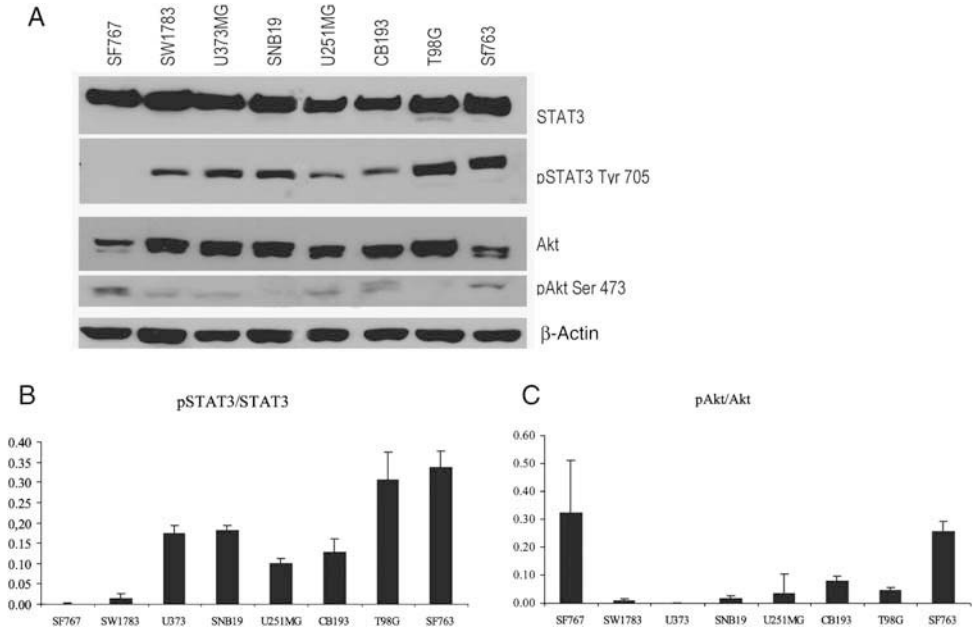


Fig. 2. Akt and STAT3 basal signaling pathways activation. (A) Cells were harvested during the exponential growth phase and 30 μg of total proteins were loaded per lane and electrophoresed by SDS–PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with anti-STAT3, anti-Akt, anti-pSTAT3-Tyr705, and anti-pAkt-Ser473. To ensure equal protein loading, the blots were stripped and reprobed with anti-β-actin antibody. The blot is representative of 3 independent experiments with consistent results. (B and C) Densitometric analyses of the blots are presented as relative ratios of phosphoprotein/total protein. Data were plotted as mean values ± *SE* of triplicate determinations (arbitrary units).

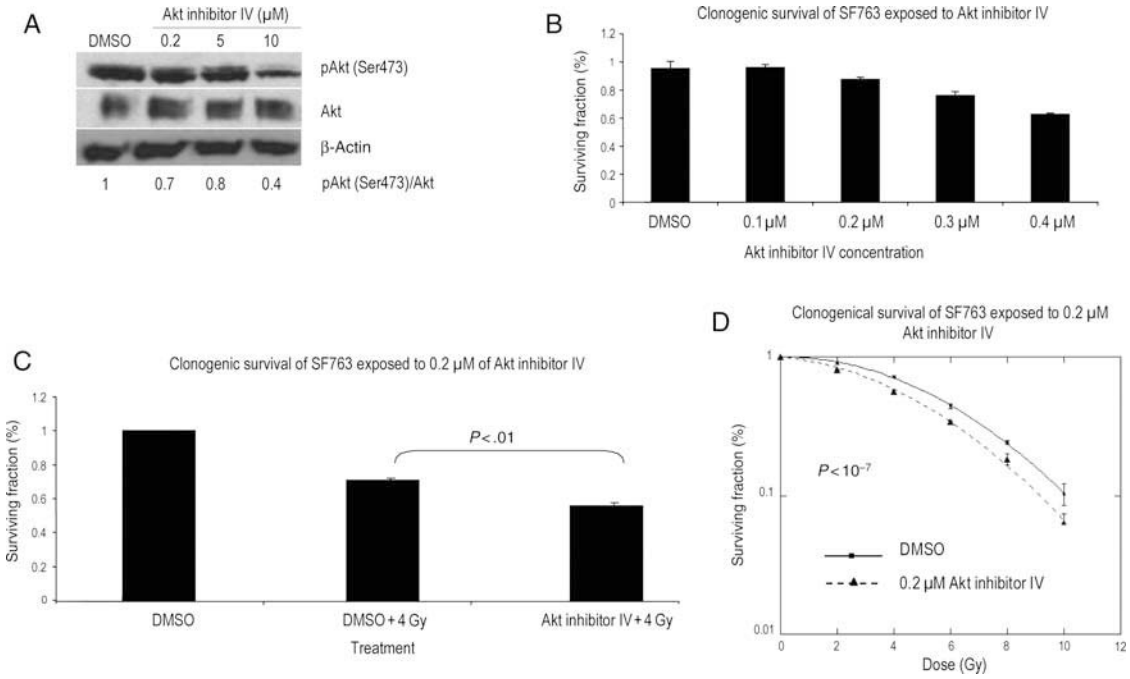


Fig. 3. Impact of Akt pathway down-modulation on SF763 cells. (A) Cells were treated with Akt inhibitor IV during 7 hours and then harvested. Total cell extracts were electrophoresed by SDS–PAGE, followed by immunoblotting with anti-Akt, anti-Akt-Ser 473, and anti-β-actin antibody. (B) Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to a concentration range of Akt inhibitor IV. One representative experiment performed in triplicate is shown. (C) Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to 0.2 μM of Akt inhibitor IV during 24 hours. After 7 hours of treatment, cells were irradiated to 4 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). (D) Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to 0.2 μM of Akt inhibitor IV during 24 hours. After 7 hours of treatment, cells were irradiated to 0–10 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). One representative of 3 independent experiments (performed in triplicate) is shown.

PE in SF763 cells after 24 hours of exposure, in a dose-dependent manner ranging from 0.86 for 0.2 μM to 0.63 for 0.04 μM (Fig. 3B). When SF763 cells were exposed 24 hours with 0.2 μM of Akt inhibitor IV and irradiated at 4 Gy after 7 hours of treatment, we observed a significant specific decrease in surviving fraction ($P < .01$, *t*-test) compared with the control (DMSO + 4 Gy, Fig. 3C). Clonogenic survival assays ranging from 0 to 10 Gy demonstrated a highly significant enhancement of radiation sensitivity ($P < 10^{-7}$, ANOVA) after treatment with 0.2 μM of Akt inhibitor IV (Fig. 3D).

To confirm Akt pathway involvement in glioma cell radioresistance, we carried out experiments to know if down-modulation of Akt could increase radiation sensitivity of the SF767 cell line. SF767 cells were treated with a concentration range of Akt inhibitor IV for 7 hours, and Akt phosphorylation was investigated using Western blot. As for the SF763 cell line, we observed a specific decrease in Akt activation with a dose of 10 μM in SF767 cells compared with cells treated with DMSO (control). We also observed a lower decrease in Akt activation with 0.1 μM (Fig. 4A). Akt inhibitor IV decreased PE in SF767 cells after 24 hours of exposure, in a dose-dependent manner ranging from 0.87 for 0.05 μM to 0.20 for 0.3 μM (Fig. 4B). When SF767 cells were exposed 24 hours with 0.1 μM of Akt inhibitor IV and irradiated at 2 Gy after 7 hours of treatment, we observed a significant specific decrease in the surviving fraction ($P < .05$, *t*-test) compared with the control (DMSO + 2 Gy, Fig. 4C). Clonogenic survival assays ranging from 0 to 10 Gy demonstrated a significant enhancement of radiation sensitivity ($P < 10^{-3}$, ANOVA) after treatment with 0.1 μM of Akt inhibitor IV (Fig. 4D).

Secondly, SF763 cells were treated with a concentration range of JSI-124 for 7 hours, and the pSTAT3/STAT3 ratio was evaluated using Western blot analyses. As shown in Fig. 5A, the exposure of cells to 0.2 μM of JSI-124 for 7 hours induced a decrease in STAT3 pathway activation whereas lower doses seemed to have no impact. Although there was no decrease in pSTAT3 with JSI-124 0.01 μM in these experimental conditions, clonogenic survival was altered. Thus, JSI-124 after 24 hours treatment proved to be an effective inhibitor of SF763 colony formation in vitro, in a dose-dependent manner ranging from 0.87 for 0.01 μM to 0.39 for 0.04 μM (Fig. 5B). To test a potential radiosensitizing effect of JSI-124, cells were treated with 0.01 μM JSI-124 for 24 hours including irradiation at 4 Gy after 7 hours of treatment. As shown in Fig. 5C, JSI-124 treatment failed to sensitize SF763 cells to IR.

STAT3 pathway activation involves gp130 recruitment upstream from JAK2 activation,[29] so another approach to inhibit STAT3 pathway was carried out using a gp130-blocking antibody. The exposure of SF763 cells to the anti-gp130-blocking antibody (10 μg/mL) did not affect PE (data not shown) but abrogated activation of

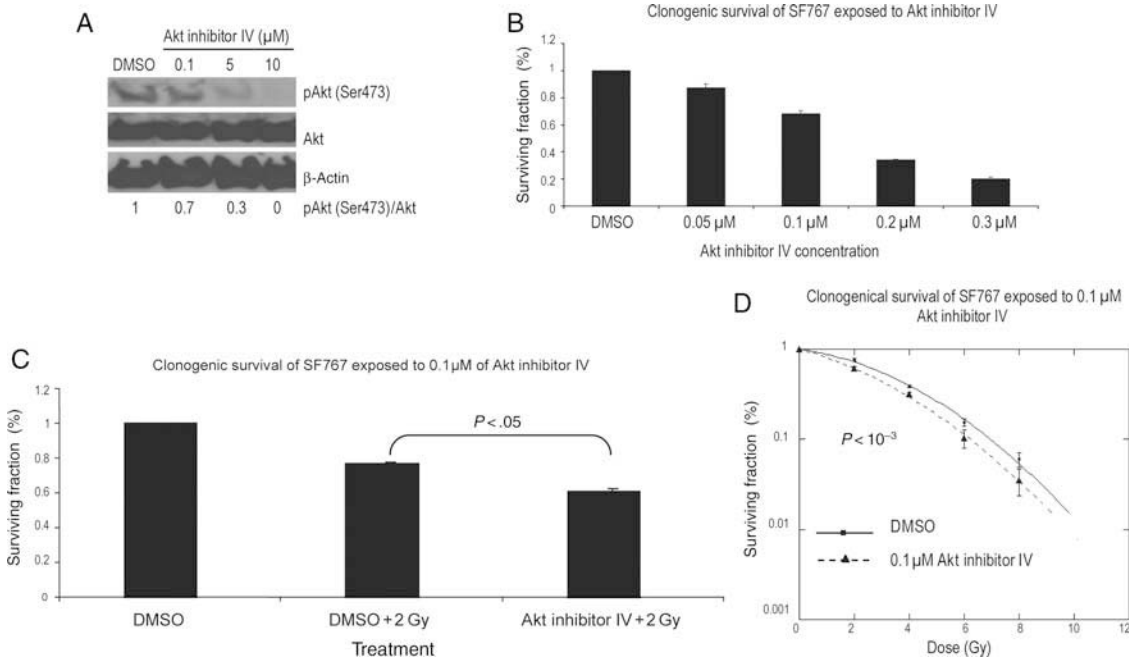


Fig. 4. Impact of Akt pathway down-modulation on SF767 cells. (A) Cells were treated with Akt inhibitor IV during 7 hours and then harvested. Total cell extracts were electrophoresed by SDS–PAGE, followed by immunoblotting with anti-Akt, anti-Akt-Ser 473, and anti-β-actin antibody. (B) Clonogenic survival of SF767 cell line exposed to a concentration range of Akt inhibitor IV. One representative experiment performed in triplicate is shown. (C) Clonogenic survival of SF767 cell line exposed to 0.1 μM of Akt inhibitor IV during 24 hours. After 7 hours of treatment, cells were irradiated to 2 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). (D) Clonogenic survival of SF767 cell line exposed to 0.1 μM of Akt inhibitor IV during 24 hours. After 7 hours of treatment, cells were irradiated to 0–10 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). One representative of 3 independent experiments (performed in triplicate) is shown.

the STAT3 pathway after 24 hours of treatment as shown in Fig. 5D. In the clonogenic survival assay, anti-gp130 or control antibody (IgG2a) was added when cells were attached in flasks (8 hours after seeding), before or after irradiation until the end of experiment. In all 3 conditions, a decrease in STAT3 pathway activation did not radiosensitize SF763 cells (representative results, Fig. 5E).

Because anti-gp130 antibody treatment does not affect colony forming with a striking inhibition of STAT3 in the SF763 cell line, we used this approach to test the potential radiosensitizing effect of STAT3 inhibition in the SNB19 cell line. The exposure of SNB19 cells to anti-gp130-blocking antibody (10 μg/mL) did not affect PE (data not shown) but abrogated the activation of STAT3 pathway after 24 hours of exposure as shown in Fig. 6A. In the clonogenic survival assay, anti-gp130 or control antibody (IgG2a) was added when cells were attached in flasks (8 hours after seeding). Despite the decrease in STAT3 pathway activation, the anti-gp130 antibody did not radiosensitize SNB19 cells (Fig. 6B).

Discussion

Radiotherapy is a part of the gold standard treatment of glioblastomas, but these tumors are radioresistant. Targeting signaling pathways involved in GBM radioresistance may improve clinical results of radiotherapy. PI3K/Akt and JAK/STAT3 pathways are major cell survival pathways blocking the apoptosis process and keeping cells alive in very toxic environments such as chemotherapy or IR. Here, we studied in human malignant glioma cell lines: (i) the relationship between intrinsic radioresistance and Akt or STAT3 basal activation; and (ii) the impact of down-modulation of Akt or STAT3 signaling on in vitro intrinsic radiosensitivity.

To date, little is known about the direct relationship between Akt or STAT3 activation and tumor radioresistance. Our results showed a significant correlation between basal Akt activation and SF2. Conversely, no such correlation was established between STAT3 activation and SF2, suggesting that Akt is a survival pathway associated with radioresistance. In our study, the most radioresistant glioma cell line was SF763, exhibiting an activation of both Akt and STAT3 signaling in basal conditions. SF763 was a good candidate to study the effects of Akt or STAT3 down-modulation on the radioresistance level. The SF767 cell line presents only a high level of Akt, and the SNB19 cell line shows only an activation of the STAT3 pathway, so they are good models to study specific roles of, respectively, Akt and STAT3 inhibition in glioma radiosensitization.

Akt Pathway Down-Modulation and Glioma Radiosensitivity

Our results showed that Akt pathway activation is closely related to human glioma radioresistance.

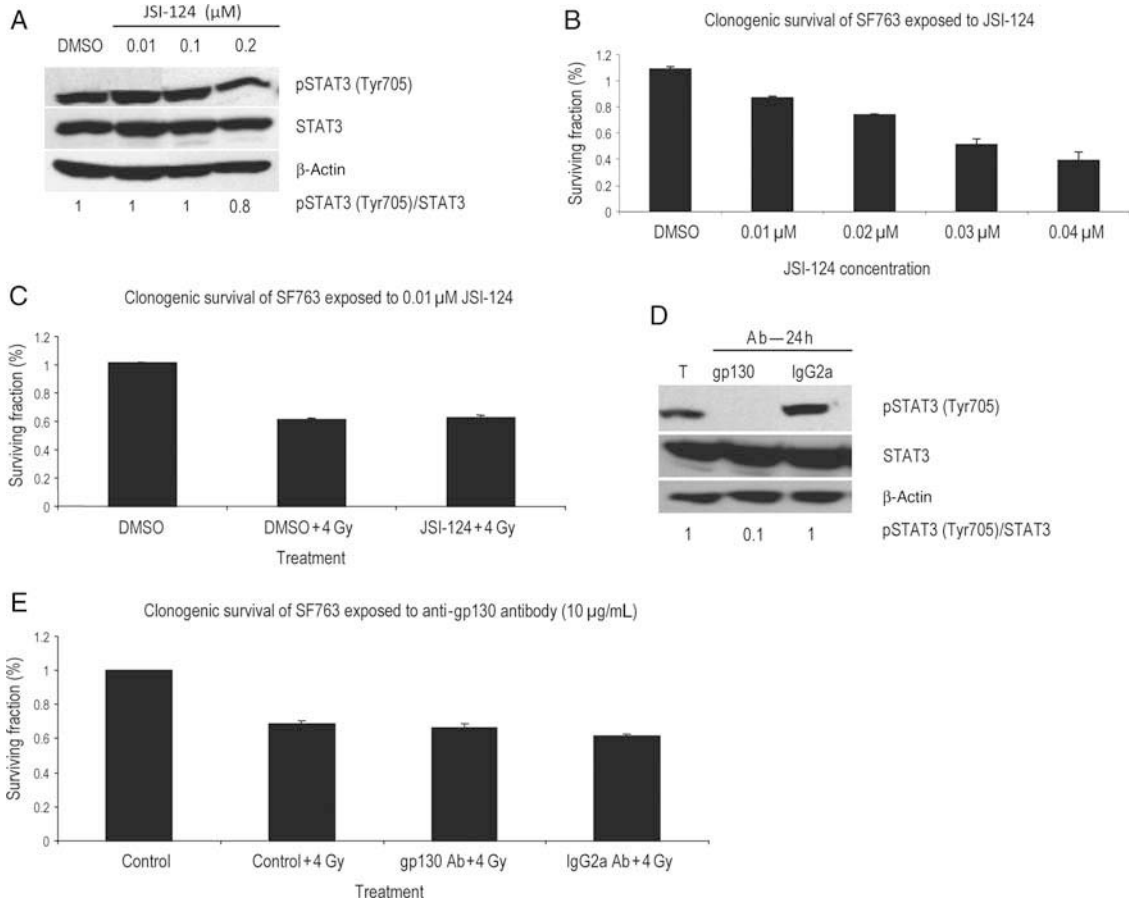


Fig. 5. Impact of STAT3 pathway down-modulation on SF763 cells. (A and D) Cells were treated with JSI-124 (7 hours) or with anti-gp130-blocking antibody (24 hours). Total proteins were electrophoresed by SDS–PAGE, followed by immunoblotting with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Tyr705, and anti-β-actin antibody. (B) Clonogenic survival of SF763 cell line exposed 24 hours to a concentration range of JSI-124. One representative experiment performed in triplicate is shown. (C) Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to 0.01 μM of JSI-124 during 24 hours. After 7 hours of treatment, cells were irradiated to 4 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). One representative of 3 independent experiments (performed in triplicate) is shown. (E) Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to blocking anti-gp130 or to control (IgG2a) antibody when cells were attached in flasks (8 hours after seeding), before or after irradiation. Cells were irradiated to 4 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (IgG2a). Representative experiment performed in triplicate is shown.

Although IR damages tumor cells through several mechanisms, IR is thought to kill cells primarily by causing DNA damage and, specifically, double-strand breaks (DSBs). Prior to undergoing division, this leads to a DNA damage response to allow repair of the DNA damage.[30] The ability to repair is essential to cell survival because maintained DNA breaks induce apoptosis or senescence.[31] A recent study by Kao et al.[32] reported that PI3K/Akt signaling pathway down-modulation led to persistence of unrepaired DSBs induced by radiation in a human glioblastoma cell line (U251), demonstrating that this pathway can modulate DNA damage repair in response to radiation and may be involved in radiation therapy efficiency. To explain this, one hypothesis could imply that the DNA-dependent protein kinase is one of the downstream targets of Akt signaling.[33]

The greatest improvement in tumor control will also be through the understanding of stem cells radioresistance mechanisms. Down-modulation of Akt signaling induced apoptosis, neurosphere formation suppression, and reduced motility and invasiveness in brain tumor stem cells.[34] Interestingly, Akt down-modulation sensitizes medulloblastoma stem cells located in the perivascular region to radiation-induced apoptosis, suggesting that Akt inhibitors may be an effective anticancer stem cell therapy.[35]

Here, we showed that Akt inhibitor IV was able to inhibit in a dose-dependent manner in vitro colony formation of malignant glioma cell line SF763. Clonogenic survival assays using the Akt inhibitor demonstrated enhancement of radiation sensitivity when SF763 cells were exposed for 24 hours to 0.2 μM of Akt inhibitor IV. Akt pathway activation involvement in glioma cell radioresistance was confirmed by significant enhancement of radiation sensitivity of SF767 cells after treatment with 0.1 μM of Akt inhibitor IV.

Many PI3K inhibitors have been developed in the last few decades to study PI3K signaling involvement in

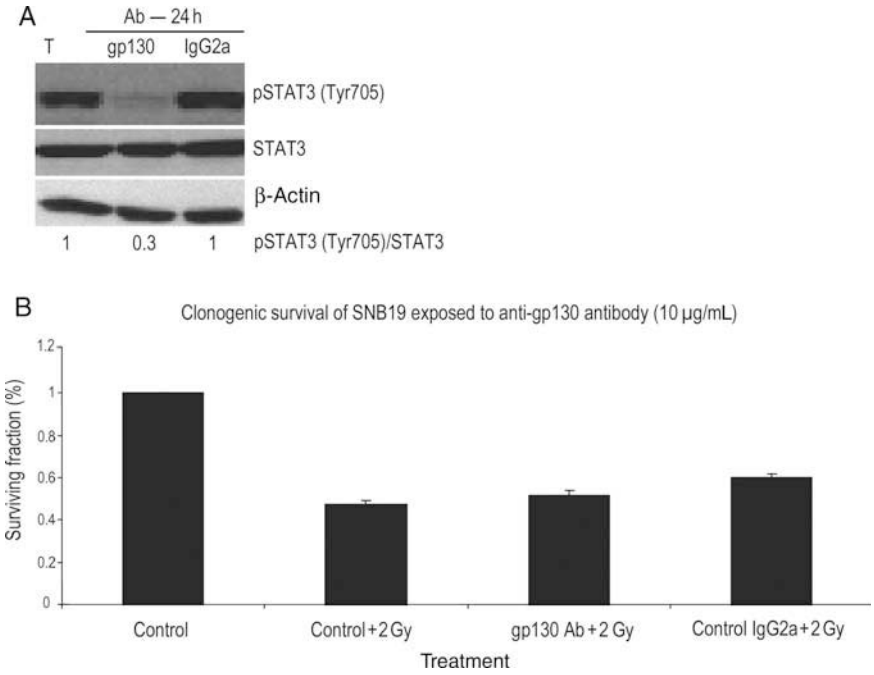


Fig. 6. Impact of STAT3 pathway down-modulation on SNB19 cells. (A) Cells were treated with anti-gp130-blocking antibody (24 hours). Total proteins were electrophoresed by SDS–PAGE, followed by immunoblotting with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Tyr705, and anti-β-actin antibody. (B) Clonogenic survival of SNB19 cell line exposed to blocking anti-gp130 or to control (IgG2a) antibody when cells were attached in flasks (8 hours after seeding). Cells were irradiated to 2 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (IgG2a). Representative experiment performed in triplicate is shown.

various biological process. A part of them were used to radiosensitize cancer cells, such as wortmannin[36] and LY294002[37] but they have limited clinical utility due to their severe toxicities. This could be explained in part by the fact that such drugs target all of the PI3K protein family. More recently, Chen et al.[38] have shown that PI-103, a novel PI3K inhibitor, with less toxic properties, could radiosensitize PTEN-mutated cell lines, whereas it could not radiosensitize glioma cell lines with PTEN wild-type. Re-establishment of PTEN was also a promising approach to radiosensitize glioma because PTEN is often mutated in these tumors.[32,39] In contrast to PI-103[38] or nelfinavir,[39] we reported in this work that Akt inhibitor IV radiosensitizes wild-type PTEN glioma cells (SF763 and SF767[38]), but these two cell lines were selected for the experiments because of their high level of radioresistance regardless of their PTEN status.

STAT3 Pathway Down-Modulation and Glioma Radiosensitivity

JSI-124 acts as a highly selective inhibitor of the JAK/STAT3 signaling pathway.[22] Su et al.[40] have demonstrated that JSI-124 induced in glioma cells $G_{(2)}$/M accumulates via down-regulation of cyclin B1 and cdc2 expressions. Down-modulation of STAT3 signaling using JSI-124 was also associated with a decrease in local immunosuppression in a murine intracranial model of glioma.[41] JSI-124 was recently shown to sensitize malignant glioma and medulloblastoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, and cisplatin with a synergy between JSI-124 and cisplatin,[23] but to our knowledge, there is no study evaluating the ability of JSI-124 to alter cancer cell resistance to IR. Here, we showed that JSI-124 alone was able to inhibit SF763 cells' colony formation in a dose-dependent manner, and that STAT3 down-modulation, using either JSI-124 or anti-gp130-blocking antibody, did not modify SF763 cells sensitivity to IR.

Despite the decrease in STAT3 pathway activation after anti-gp130 antibody exposure, no radiosensitizing effect was observed in SNB19 cells. This is consistent with the absence of correlation between STAT3 activation and the radioresistance level in the tested cell lines. Moreover, a recent study reported that STAT3 can have a tumor-suppressive function that is regulated by the tumor suppressor PTEN. The nuclear constitutively activated form of epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) acts as a switch to convert this STAT3 from a tumor-suppressive to a pro-oncogenic protein.[42] Altogether, our results with these last data support that STAT3 involvement in glioma radioresistance remains unclear and would depend on PTEN and EGFRvIII status in glioma cells.

In summary, the results of the present study and other reports[32,38,39] strongly suggest that Akt is a valid target for glioma cell radiosensitization. Our conclusions are different from those of de la Pena et al.,[43] who obtained no radiosensitization effect on glioma cells by treatment with perifosine, a drug that down-regulates Akt phosphorylation. Further experiments are needed to understand the link between PTEN, EGFRvIII, and STAT3

status in regard to glioma radioresistance. These data indicate that the Akt intercept node could be a more relevant therapeutic target than STAT3 for radiosensitizing human malignant glioma.

The PI3K/Akt pathway could be activated by numerous cytokines or growth factors. We reported that among these activators, interleukin-6 (IL-6) gene amplification and overexpression were associated with poor survival in patients with malignant gliomas.[44] We have previously reported that the IL-6 gene is amplified in the SF763 but not in the SF767 cell line.[45] PI3K/Akt could also be activated by EGFR, which is often amplified in glioblastoma,[46,47] but EGFR status in these cell lines is unknown. Furthermore, receptor tyrosine kinase-independent activation of the PI3K/Akt pathway is commonly observed in many cancers and can occur through multiple mechanisms, such as mutation or amplification of the PI3K gene, amplification of the Akt gene, activation of an upstream oncogene (eg, RAS), or mutation or decreased expression of the tumor suppressor PTEN.[48] Because of these multiple possibilities, instead of inhibiting a single-cell surface receptor, down-modulation of signal transduction through such an intercept node will be a more effective approach to block radioresistance.[49] The PI3K/Akt node could be a relevant therapeutic target to radiosensitize tumor cells by inhibiting both antiapoptotic mechanisms and DNA damage repair after radiation.

Acknowledgments

We are grateful to Nicolas Foray for assistance using the Kaleidagraph software; Claude Beaudoin for critical reading of the manuscript; Michele Manin for helpful advice on cell cultures; and Angélique DeHaze, Julie Dufour, Antoine Nigon, and Jean-Paul Saru for technical assistance.

Conflict of interest statement. None declared.

Funding

E.C. was the recipient of a fellowship from the MENESR (Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy De Dôme) and by the Region Auvergne.

References

1. Legler JM, Ries LA, Smith MA, et al. Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1382–1390.
2. Gurney JG, Kadan-Lottick N. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol.* 2001;13:160–166.
3. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005;109:93–108.
4. DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol.* 1998;44:691–695.
5. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987–996.
6. Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med.* 1980;303:1323–1329.
7. Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose–effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1979;5:1725–1731.
8. Bleehen NM, Stenning SP. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer.* 1991;64:769–774.
9. Shannon AM, Williams KJ. Antiangiogenics and radiotherapy. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60:1029–1036.
10. Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol.* 2003;67:3–15.
11. De Ridder M, Verovski VN, Darville MI, et al. Macrophages enhance the radiosensitizing activity of lipid A: a novel role for immune cells in tumor cell radioresponse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60:598–606.
12. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13:1050–1059.
13. Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 2006;66:3963–3966.
14. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41:2502–2512.
15. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol.* 2004;22:1926–1933.
16. Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA, Haque SJ. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene.* 2002;21:8404–8413.
17. LoPiccolo J, Granville CA, Gills JJ, Dennis PA. Targeting Akt in cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 2007;18:861–874.
18. Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:97–105.
19. Costantino L, Barlocco D. STAT 3 as a target for cancer drug discovery. *Curr Med Chem.* 2008;15:834–843.
20. Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, et al. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell.* 2003;4:463–476.
21. Han H, Shin SW, Seo CY, et al. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ 2) sensitizes human leukemic HL-60 cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through Akt downregulation. *Apoptosis.* 2007;12:2101–2114.

22. Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebti SM. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.* 2003;63:1270–1279.
23. Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F. Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6042–6054.
24. Delmas C, Heliez C, Cohen-Jonathan E, et al. Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer.* 2002;100:43–48.
25. Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res.* 2005;65:4368–4375.
26. Russell JS, Lang FF, Huet T, et al. Radiosensitization of human tumor cell lines induced by the adenovirus-mediated expression of an anti-Ras single-chain antibody fragment. *Cancer Res.* 1999;59:5239–5244.
27. Casper D, Lekhraj R, Yaparpalvi US, et al. Acetaminophen selectively reduces glioma cell growth and increases radiosensitivity in culture. *J Neurooncol.* 2000;46:215–229.
28. Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 1997;7:261–269.
29. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:651–662.
30. Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. Repair of radiation damage to DNA. *Br J Cancer.* 2004;90:1297–1301.
31. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408:433–439.
32. Kao GD, Jiang Z, Fernandes AM, Gupta AK, Maity A. Inhibition of phosphatidylinositol-2-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following Ionizing radiation. *J Biol Chem.* 2007;282:21206–21212.
33. Toulany M, Dittmann K, Fehrenbacher B, Schaller M, Baumann M, Rodemann HP. PI3K-Akt signaling regulates basal, but MAP-kinase signaling regulates radiation-induced XRCC1 expression in human tumor cells in vitro. *DNA Repair (Amst).* 2008;7:1746–1756.
34. Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells.* 2008;26:3027–3036.
35. Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, Pandolfi PP, Manova-Todorova K, Holland EC. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* 2008;22:436–448.
36. Norman BH, Shih C, Toth JE, et al. Studies on the mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by wortmannin and related analogs. *J Med Chem.* 1996;39:1106–1111.
37. Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, et al. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56:846–853.
38. Chen JS, Zhou LJ, Entin-Meer M, et al. Characterization of structurally distinct, isoform-selective phosphoinositide 3′-kinase inhibitors in combination with radiation in the treatment of glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:841–850.
39. Jiang Z, Pore N, Cerniglia GJ, et al. Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir. *Cancer Res.* 2007;67:4467–4473.
40. Su Y, Li G, Zhang X, et al. JSI-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis augment. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:1243–1249.
41. Fujita M, Zhu X, Sasaki K, et al. Inhibition of STAT3 promotes the efficacy of adoptive transfer therapy using type-1 CTLs by modulation of the immunological microenvironment in a murine intracranial glioma. *J Immunol.* 2008;180:2089–2098.
42. de la Iglesia N, Konopka G, Puram SV, et al. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes Dev.* 2008;22:449–462.
43. de la Pena L, Burgan WE, Carter DJ, et al. Inhibition of Akt by the alkylphospholipid perifosine does not enhance the radiosensitivity of human glioma cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1504–1510.
44. Tchirkov A, Khalil T, Chautard E, et al. Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br J Cancer.* 2007;96:474–476.
45. Tchirkov A, Rolhion C, Bertrand S, Dore JF, Dubost JJ, Verrelle P. IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br J Cancer.* 2001;85:518–522.
46. Chakravarti A, Seiferheld W, Tu X, et al. Immunohistochemically determined total epidermal growth factor receptor levels not of prognostic value in newly diagnosed glioblastoma multiforme: report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62:318–327.
47. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001;15:1311–1333.
48. Schuurbiers OC, Kaanders JH, van der Heijden HF, Dekhuijzen RP, Oyen WJ, Bussink J. The PI3-K/AKT-pathway, radiation resistance mechanisms in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4:761–767.
49. Castellino RC, Durden DL. Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node—an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3:682–693.

Références bibliographiques

Abate-Shen C and Shen MM. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* **14**: 2410-34.

Abbott BD, Lin TM, Rasmussen NT, Albrecht RM, Schmid JE and Peterson RE. (2003). Lack of expression of EGF and TGF-alpha in the fetal mouse alters formation of prostatic epithelial buds and influences the response to TCDD. *Toxicol Sci* **76**: 427-36.

Abujarour R, Efe J and Ding S. (2010). Genome-wide gain-of-function screen identifies novel regulators of pluripotency. *Stem Cells* **28**: 1487-97.

Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT and Thompson TC. (1999). Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J Urol* **161**: 182-7.

Algarte-Genin M, Cussenot O and Costa P. (2004). Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur Urol* **46**: 285-94; discussion 294-5.

Alla V, Engelmann D, Niemetz A, Pahnke J, Schmidt A, Kunz M, Emmrich S, Steder M, Koczan D and Putzer BM. (2009). E2F1 in melanoma progression and metastasis. *J Natl Cancer Inst* **102**: 127-33.

Anand M, Van Meter TE and Fillmore HL. (2011). Epidermal growth factor induces matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression and invasion in glioma cell lines via the MAPK pathway. *J Neurooncol* **104**: 679-87.

Ayrault O, Andrique L, Larsen CJ and Seite P. (2006). [The negative regulation of ribosome biogenesis: a new Arf-dependent pathway controlling cell proliferation?]. *Med Sci (Paris)* **22**: 519-24.

Baird A, Esch F, Bohlen P, Ling N and Gospodarowicz D. (1985). Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from the bovine kidney: homology with basic fibroblast growth factor. *Regul Pept* **12**: 201-13.

Barber GN. (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* **8**: 113-26.

Bardin CW, Bullock LP, Sherins RJ, Mowszowicz I and Blackburn WR. (1973). Androgen metabolism and mechanism of action in male pseudohermaphroditism: a study of testicular feminization. *Recent Prog Horm Res* **29**: 65-109.

Bartlett JM, Brawley D, Grigor K, Munro AF, Dunne B and Edwards J. (2005). Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer. *J Pathol* **205**: 522-9.

Baylot V, Katsogiannou M, Andrieu C, Taieb D, Acunzo J, Giusiano S, Fazli L, Gleave M, Garrido C and Rocchi P. (2012). Targeting TCTP as a New Therapeutic Strategy in Castration-resistant Prostate Cancer. *Mol Ther* **20**: 2244-56.

Bennet JM. (2002). *The myelodysplastic Syndromes, Pathobiology and Clinical Management*.

Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW and Gobe GC. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 813-27.

Berger R, Busson M, Baranger L, Helias C, Lessard M, Dastugue N and Speleman F. (2006). Loss of the NPM1 gene in myeloid disorders with chromosome 5 rearrangements. *Leukemia* **20**: 319-21.

Berges RR, Vukanovic J, Epstein JI, CarMichel M, Cisek L, Johnson DE, Veltri RW, Walsh PC and Isaacs JT. (1995). Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* **1**: 473-80.

Bergstralh DT, Conti BJ, Moore CB, Brickey WJ, Taxman DJ and Ting JP. (2007). Global functional analysis of nucleophosmin in Taxol response, cancer, chromatin regulation, and ribosomal DNA transcription. *Exp Cell Res* **313**: 65-76.

Bernard D, Pourtier-Manzanedo A, Gil J and Beach DH. (2003a). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest* **112**: 1724-31.

Bernard K, Litman E, Fitzpatrick JL, Shellman YG, Argast G, Polvinen K, Everett AD, Fukasawa K, Norris DA, Ahn NG and Resing KA. (2003b). Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res* **63**: 6716-25.

Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wohr G, Latil A, Millasseau P, Mellah I, Cohen N, Blanche H, Bellane-Chantelot C, Demenais F, Teillac P, Le Duc A, de Petriconi R, Hautmann R, Chumakov I, Bachner L, Maitland NJ, Lidereau R, Vogel W, Fournier G, Mangin P, Cussenot O and et al. (1998). Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet* **62**: 1416-24.

Bhat UG, Jagadeeswaran R, Halasi M and Gartel AL. (2011). Nucleophosmin interacts with FOXM1 and modulates the level and localization of FOXM1 in human cancer cells. *J Biol Chem* **286**: 41425-33.

Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C and Shen MM. (1999). Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* **13**: 966-77.

Bonaccorsi L, Carloni V, Muratori M, Formigli L, Zecchi S, Forti G and Baldi E. (2004a). EGF receptor (EGFR) signaling promoting invasion is disrupted in androgen-sensitive prostate cancer cells by an interaction between EGFR and androgen receptor (AR). *Int J Cancer* **112**: 78-86.

Bonaccorsi L, Muratori M, Carloni V, Marchiani S, Formigli L, Forti G and Baldi E. (2004b). The androgen receptor associates with the epidermal growth factor receptor in androgen-sensitive prostate cancer cells. *Steroids* **69**: 549-52.

Bookstein R, MacGrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F and Allred DC. (1993). p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res* **53**: 3369-73.

Boon K, Caron HN, van Asperen R, Valentijn L, Hermus MC, van Sluis P, Roobeek I, Weis I, Voute PA, Schwab M and Versteeg R. (2001). N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo J* **20**: 1383-93.

Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, Marsh W and Schultz DS. (1993). Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* **24**: 298-310.

Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ and Timms B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **101**: 2371-490.

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

Bowman LH, Rabin B and Schlessinger D. (1981). Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **9**: 4951-66.

Brady SN, Yu Y, Maggi LB, Jr. and Weber JD. (2004). ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol* **24**: 9327-38.

Brooks JD, Bova GS, Ewing CM, Piantadosi S, Carter BS, Robinson JC, Epstein JI and Isaacs WB. (1996). An uncertain role for p53 gene alterations in human prostate cancers. *Cancer Res* **56**: 3814-22.

Brooks JD, Bova GS and Isaacs WB. (1995). Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate* **26**: 35-9.

Brown TR. (1995). Human androgen insensitivity syndrome. *J Androl* **16**: 299-303.

Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Jordan P, Blochlinger A, Gasser TC and Mihatsch MJ. (1996). Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol* **148**: 1557-65.

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

Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ and Matzuk MM. (2003). Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* **300**: 633-6.

Cabrespine A, Bay JO, Verrelle P and Morel L. (2007). [Interleukin-6 implication in prostate cancer]. *Bull Cancer* **94**: F29-34.

Cancel-Tassin G, Latil A, Valeri A, Mangin P, Fournier G, Berthon P and Cussenot O. (2001). PCAP is the major known prostate cancer predisposing locus in families from south and west Europe. *Eur J Hum Genet* **9**: 135-42.

Carpenter G and Cohen S. (1990). Epidermal growth factor. *J Biol Chem* **265**: 7709-12.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* **253**: 269-85.

Chamberlain CG and McAvoy JW. (1987). Evidence that fibroblast growth factor promotes lens fibre differentiation. *Curr Eye Res* **6**: 1165-9.

Chang JH, Dumbar TS and Olson MO. (1988). cDNA and deduced primary structure of rat protein B23, a nucleolar protein containing highly conserved sequences. *J Biol Chem* **263**: 12824-7.

Chang JH and Olson MO. (1990). Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem* **265**: 18227-33.

Chang M, Tsuchiya K, Batchelor RH, Rabinovitch PS, Kulander BG, Haggitt RC and Burmer GC. (1994). Deletion mapping of chromosome 8p in colorectal carcinoma and dysplasia arising in ulcerative colitis, prostatic carcinoma, and malignant fibrous histiocytomas. *Am J Pathol* **144**: 1-6.

Chen H, Jia R, Zhou M, Xu A, Hu Y, Cheng W and Shao C. (2010). The role of nucleophosmin/B23 in radiation-induced chromosomal instability in human lymphoblastoid cells of different p53 genotypes. *Int J Radiat Biol* **86**: 1031-43.

Chen T, Wang LH and Farrar WL. (2000). Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* **60**: 2132-5.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C and Pandolfi PP. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**: 725-30.

Cher ML, MacGrogan D, Bookstein R, Brown JA, Jenkins RB and Jensen RH. (1994). Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **11**: 153-62.

Cho HS and Leahy DJ. (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* **297**: 1330-3.

Chung TD, Yu JJ, Kong TA, Spiotto MT and Lin JM. (2000). Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate* **42**: 1-7.

Citri A and Yarden Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 505-16.

Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML, Berns A and te Riele H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* **359**: 328-30.

Cohen DW, Simak R, Fair WR, Melamed J, Scher HI and Cordon-Cardo C. (1994). Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues. *J Urol* **152**: 2120-4.

Cohen P, Peehl DM, Lamson G and Rosenfeld RG. (1991). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **73**: 401-7.

Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S and Buttyan R. (1993). Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* **143**: 390-400.

Colombo E, Bonetti P, Lazzerini Denchi E, Martinelli P, Zamponi R, Marine JC, Helin K, Falini B and Pelicci PG. (2005). Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol* **25**: 8874-86.

Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B and Pelicci PG. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* **4**: 529-33.

Colonna M, Danzon A, Delafosse P, Mitton N, Bara S, Bouvier AM, Ganry O, Guizard AV, Launoy G, Molinie F, Sauleau EA, Schvartz C, Velten M, Grosclaude P and Tretarre B. (2008). Cancer prevalence in France: time trend, situation in 2002 and extrapolation to 2012. *Eur J Cancer* **44**: 115-22.

Coman DR. (1953). Mechanisms responsible for the origin and distribution of blood-borne tumor metastases: a review. *Cancer Res* **13**: 397-404.

Cooke PS, Young P and Cunha GR. (1991). Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* **128**: 2867-73.

Cooney KA, Wetzel JC, Merajver SD, Macoska JA, Singleton TP and Wojno KJ. (1996). Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. *Cancer Res* **56**: 1142-5.

Cordell JL, Pulford KA, Bigerna B, Roncador G, Banham A, Colombo E, Pelicci PG, Mason DY and Falini B. (1999). Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood* **93**: 632-42.

Crawford ED. (1992). Challenges in the management of prostate cancer. *Br J Urol* **70 Suppl 1**: 33-8.

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

Culig Z and Bartsch G. (2006). Androgen axis in prostate cancer. *J Cell Biochem* **99**: 373-81.

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C, Eberle J, Bartsch G and Klocker H. (1993). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* **7**: 1541-50.

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Hittmair A, Zhang J, Thurnher M, Bartsch G and Klocker H. (1996). Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* **28**: 392-405.

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

Cunha GR. (1973). The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat Rec* **175**: 87-96.

Cunha GR. (1996). Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate Suppl* **6**: 22-5.

Cunha GR, Battle E, Young P, Brody J, Donjacour A, Hayashi N and Kinbara H. (1992). Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. *Epithelial Cell Biol* **1**: 76-83.

Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ and Sugimura Y. (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* **8**: 338-62.

Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA and Kurita T. (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**: 221-36.

Cussenot O. (1997). [Growth factors and prostatic tumors]. *Ann Endocrinol (Paris)* **58**: 370-80.

Cussenot O and Cancel-Tassin G. (2004). [Genetic susceptibility to prostate cancer]. *Med Sci (Paris)* **20**: 562-8.

Cussenot O and Fournier G. (2000). [Genetics and urology]. *Prog Urol* **10**: 681-1097.

Czech MP. (1989). Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* **59**: 235-8.

Dai WS, Kuller LH, LaPorte RE, Gutai JP, Falvo-Gerard L and Caggiula A. (1981). The epidemiology of plasma testosterone levels in middle-aged men. *Am J Epidemiol* **114**: 804-16.

Damber JE and Aus G. (2008). Prostate cancer. *Lancet* **371**: 1710-21.

Davies P and Eaton CL. (1989). Binding of epidermal growth factor by human normal, hypertrophic, and carcinomatous prostate. *Prostate* **14**: 123-32.

De Bellis A, Ghiandi P, Comerci A, Fiorelli G, Grappone C, Milani S, Salerno R, Marra F and Serio M. (1996). Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor-alpha in human hyperplastic prostate tissue: expression and cellular localization. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 4148-54.

De Miguel P, Royuela, Bethencourt R, Ruiz A, Fraile B and Paniagua R. (1999). Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine* **11**: 722-7.

Deeble PD, Murphy DJ, Parsons SJ and Cox ME. (2001). Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Mol Cell Biol* **21**: 8471-82.

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

Delongchamps NB, Peyromaure M and Dinh-Xuan AT. (2006). Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Urology* **68**: 244-8.

den Besten W, Kuo ML, Williams RT and Sherr CJ. (2005). Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle* **4**: 1593-8.

Dergunova NN, Bulycheva TI, Artemenko EG, Shpakova AP, Pegova AN, Gemjian EG, Dudnik OA, Zatsepina OV and Malashenko OS. (2002). A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. *Immunol Lett* **83**: 67-72.

Dhar SK, Lynn BC, Daosukho C and St Clair DK. (2004). Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J Biol Chem* **279**: 28209-19.

Di Cristofano A and Pandolfi PP. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* **100**: 387-90.

Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C and Pandolfi PP. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* **19**: 348-55.

Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, De Rosa G, Staibano S, Autorino R, D'Armiento M, De Laurentiis M, De Placido S, Catalano G, Bianco AR and Ciardiello F. (2002). Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* **8**: 3438-44.

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

Donjacour AA and Cunha GR. (1993). Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology* **132**: 2342-50.

Drachenberg DE, Elgamal AA, Rowbotham R, Peterson M and Murphy GP. (1999). Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate* **41**: 127-33.

Dreyer C, Raymond E and Faivre S. (2009). La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR = PI3K / AKT / mTOR signalling pathway. *Cancero dig* **1**: 187-89.

Dunn MW and Kazer MW. (2011). Prostate cancer overview. *Semin Oncol Nurs* **27**: 241-50.

Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB and Korach KS. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* **137**: 4796-805.

Egeblad M and Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 161-74.

Eirin-Lopez JM, Frehlick LJ and Ausio J. (2006). Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Genetics* **173**: 1835-50.

Endo A, Kitamura N and Komada M. (2009). Nucleophosmin/B23 regulates ubiquitin dynamics in nucleoli by recruiting deubiquitylating enzyme USP36. *J Biol Chem* **284**: 27918-23.

English HF, Drago JR and Santen RJ. (1985). Cellular response to androgen depletion and repletion in the rat ventral prostate: autoradiography and morphometric analysis. *Prostate* **7**: 41-51.

Eriksen JG, Steiniche T, Sogaard H and Overgaard J. (2004). Expression of integrins and E-cadherin in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Apmis* **112**: 560-8.

Eto M, Bennouna J, Hunter OC, Hershberger PA, Kanto T, Johnson CS, Lotze MT and Amoscato AA. (2003). C16 ceramide accumulates following androgen ablation in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate* **57**: 66-79.

Evans BA, Harper ME, Daniells CE, Watts CE, Matenhelia S, Green J and Griffiths K. (1996). Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. *Prostate* **28**: 162-71.

Fabiani R, Johansson L, Lundkvist O and Ronquist G. (1994). Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostasome inclusion in swim-up medium. *Hum Reprod* **9**: 1485-9.

Falini B and Mason DY. (2002). Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* **99**: 409-26.

Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, Brown P, Pane F, Mancini M, Martelli MP, Pileri S, Haferlach T, Haferlach C and Schnittger S. (2008). NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* **93**: 439-42.

Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C and Martelli MF. (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* **92**: 519-32.

Faupel-Badger JM, Kidd LC, Albanes D, Virtamo J, Woodson K and Tangrea JA. (2008). Association of IL-10 polymorphisms with prostate cancer risk and grade of disease. *Cancer Causes Control* **19**: 119-24.

Feldman BJ and Feldman D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 34-45.

Fiorentino L, Pertica C, Fiorini M, Talora C, Crescenzi M, Castellani L, Alema S, Benedetti P and Segatto O. (2000). Inhibition of ErbB-2 mitogenic and transforming activity by RALT, a mitogen-induced signal transducer which binds to the ErbB-2 kinase domain. *Mol Cell Biol* **20**: 7735-50.

Fiorini M, Ballaro C, Sala G, Falcone G, Alema S and Segatto O. (2002). Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors, is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control. *Oncogene* **21**: 6530-9.

Firtel RA and Chung CY. (2000). The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. *Bioessays* **22**: 603-15.

Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kahari AK, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Komorowska M, Koscielny G, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Muffato M, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Riat HS, Ritchie GR, Ruffier M, Schuster M, Sobral D, Tang YA, Taylor K, Trevanion S, Vandrovcova J, White S, Wilson M, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJ, Parker A, Proctor G, Spudich G, Vogel J, Yates A, Zadissa A and Searle SM. (2012). Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res* **40**: D84-90.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**: 66-70.

Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA and Bunn PA, Jr. (2002). Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol* **29**: 3-14.

Freeman MR, Paul S, Kaefer M, Ishikawa M, Adam RM, Renshaw AA, Elenius K and Klagsbrun M. (1998). Heparin-binding EGF-like growth factor in the human prostate: synthesis predominantly by interstitial and vascular smooth muscle cells and action as a carcinoma cell mitogen. *J Cell Biochem* **68**: 328-38.

Frehlick LJ, Eirin-Lopez JM and Ausio J. (2007). New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* **29**: 49-59.

Fujiwara Y, Ohata H, Emi M, Okui K, Koyama K, Tsuchiya E, Nakajima T, Monden M, Mori T, Kurimasa A and et al. (1994). A 3-Mb physical map of the chromosome region 8p21.3-p22, including a 600-kb region commonly deleted in human hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and non-small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **10**: 7-14.

Gadad SS, Shandilya J, Kishore AH and Kundu TK. (2010). NPM3, a member of the nucleophosmin/nucleoplasmin family, enhances activator-dependent transcription. *Biochemistry* **49**: 1355-7.

Gao X, Chen YQ, Wu N, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT and Honn KV. (1995). Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. *Oncogene* **11**: 1395-8.

George DJ, Regan MM, Oh WK, Tay MH, Manola J, Decalo N, Duggan S, Dewolf WC, Kantoff PW and Bubley GJ. (2004). Radical prostatectomy lowers plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with prostate cancer. *Urology* **63**: 327-32.

Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF, Jr. and Weber MJ. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* **59**: 279-84.

Gjerset RA. (2006). DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *J Mol Histol* **37**: 239-51.

Gleason DF and Mellinger GT. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* **111**: 58-64.

Glynne-Jones E, Goddard L and Harper ME. (1996). Comparative analysis of mRNA and protein expression for epidermal growth factor receptor and ligands relative to the proliferative index in human prostate tissue. *Hum Pathol* **27**: 688-94.

Golub MS, Germann SL and Lloyd KC. (2004). Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav Brain Res* **153**: 159-70.

Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L and Neufeld G. (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* **8**: 95-114.

Gottlieb B, Lehvaslaiho H, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L and Trifiro M. (1998). The Androgen Receptor Gene Mutations Database. *Nucleic Acids Res* **26**: 234-8.

Grandis JR and Sok JC. (2004). Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther* **102**: 37-46.

Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN and White RJ. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* **7**: 311-8.

Gregory CW, Fei X, Ponguta LA, He B, Bill HM, French FS and Wilson EM. (2004). Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J Biol Chem* **279**: 7119-30.

Gregory H, Willshire IR, Kavanagh JP, Blacklock NJ, Chowdury S and Richards RC. (1986). Urogastrone-epidermal growth factor concentrations in prostatic fluid of normal individuals and patients with benign prostatic hypertrophy. *Clin Sci (Lond)* **70**: 359-63.

Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K and Pandolfi PP. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* **437**: 147-53.

Grisendi S, Mecucci C, Falini B and Pandolfi PP. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 493-505.

Gumbiner LM, Gumerlock PH, Mack PC, Chi SG, deVere White RW, Mohler JL, Pretlow TG and Tricoli JV. (1999). Overexpression of cyclin D1 is rare in human prostate carcinoma. *Prostate* **38**: 40-5.

Gur G, Rubin C, Katz M, Amit I, Citri A, Nilsson J, Amariglio N, Henriksson R, Rechavi G, Hedman H, Wides R and Yarden Y. (2004). LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *Embo J* **23**: 3270-81.

Gurumurthy M, Tan CH, Ng R, Zeiger L, Lau J, Lee J, Dey A, Philp R, Li Q, Lim TM, Price DH, Lane DP and Chao SH. (2008). Nucleophosmin interacts with HEXIM1 and regulates RNA polymerase II transcription. *J Mol Biol* **378**: 302-17.

Guturi KK, Mandal T, Chatterjee A, Sarkar M, Bhattacharya S, Chatterjee U and Ghosh MK. (2012). Mechanism of beta-Catenin-mediated Transcriptional Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Glycogen Synthase Kinase 3 beta-inactivated Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem* **287**: 18287-96.

Hakimi JM, Rondinelli RH, Schoenberg MP and Barrack ER. (1996). Androgen-receptor gene structure and function in prostate cancer. *World J Urol* **14**: 329-37.

Hammarsten P, Rudolfsson SH, Henriksson R, Wikstrom P and Bergh A. (2007). Inhibition of the epidermal growth factor receptor enhances castration-induced prostate involution and reduces testosterone-stimulated prostate growth in adult rats. *Prostate* **67**: 573-81.

Hanada M, Feng J and Hemmings BA. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **1697**: 3-16.

Hanahan D and Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-74.

Hayward SW, Rosen MA and Cunha GR. (1997). Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79 Suppl 2**: 18-26.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G and Schaper F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**: 1-20.

Hernandez-Verdun D and Louvet E. (2004). *Medecine/Sciences* **20**: 37-44.

Hingorani K, Szebeni A and Olson MO. (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* **275**: 24451-7.

Hiramatsu M, Kashimata M, Minami N, Sato A, Murayama M and Minami N. (1988). Androgenic regulation of epidermal growth factor in the mouse ventral prostate. *Biochem Int* **17**: 311-7.

Hirano T and Kishimoto T. (1992). Molecular biology and immunology of interleukin-6. *Res Immunol* **143**: 723-4.

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

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M and Korsmeyer SJ. (1991). BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6961-5.

Holbro T, Civenni G and Hynes NE. (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* **284**: 99-110.

Huang C, Jacobson K and Schaller MD. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**: 4619-28.

Huang N, Negi S, Szebeni A and Olson MO. (2005). Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *J Biol Chem* **280**: 5496-502.

Hubert P. (2006). Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs = Growth factors of the EGF family and their receptors. *Bull Cancer* **Hors serie**: 17-24.

Huggins C and Hodges CV. (1941). Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate *Cancer Res* **1**: 293-97.

Husmann DA, McPhaul MJ and Wilson JD. (1991). Androgen receptor expression in the developing rat prostate is not altered by castration, flutamide, or suppression of the adrenal axis. *Endocrinology* **128**: 1902-6.

Inder KL, Hill MM and Hancock JF. (2010). Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras signaling. *Commun Integr Biol* **3**: 188-90.

Inder KL, Lau C, Loo D, Chaudhary N, Goodall A, Martin S, Jones A, van der Hoeven D, Parton RG, Hill MM and Hancock JF. (2009). Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. *J Biol Chem* **284**: 28410-9.

Inouye CJ and Seto E. (1994). Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem* **269**: 6506-10.

Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R and Zhang Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* **12**: 1151-64.

Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ and Lee SH. (2007). Absence of nucleophosmin 1 (NPM1) gene mutations in common solid cancers. *Apmis* **115**: 341-6.

Jones FE and Stern DF. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* **18**: 3481-90.

Joniau S, Goeman L, Pennings J and Van Poppel H. (2005). Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. *Eur Urol* **48**: 379-85.

Junttila MR, Li SP and Westermarck J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *Faseb J* **22**: 954-65.

Kakehi Y, Oka H, Mitsumori K, Itoh N, Ogawa O and Yoshida O. (1996). Elevation of serum transforming growth factor-beta1 Level in patients with metastatic prostate cancer. *Urol Oncol* **2**: 131-5.

Kamimura D, Ishihara K and Hirano T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **149**: 1-38.

Kanety H, Madjar Y, Dagan Y, Levi J, Papa MZ, Pariente C, Goldwasser B and Karasik A. (1993). Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* **77**: 229-33.

Kario E, Marmor MD, Adamsky K, Citri A, Amit I, Amariglio N, Rechavi G and Yarden Y. (2005). Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* **280**: 7038-48.

Kasper S. (2008). Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev* **4**: 193-201.

Keilhack H, Tenev T, Nyakatura E, Godovac-Zimmermann J, Nielsen L, Seedorf K and Bohmer FD. (1998). Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J Biol Chem* **273**: 24839-46.

Kelly RW. (1999). Immunomodulators in human seminal plasma: a vital protection for spermatozoa in the presence of infection? *Int J Androl* **22**: 2-12.

Kemppainen JA and Wilson EM. (1996). Agonist and antagonist activities of hydroxyflutamide and Casodex relate to androgen receptor stabilization. *Urology* **48**: 157-63.

Kerr LE, Birse-Archbold JL, Short DM, McGregor AL, Heron I, Macdonald DC, Thompson J, Carlson GJ, Kelly JS, McCulloch J and Sharkey J. (2007). Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene* **26**: 2554-62.

Kikuta K, Tochigi N, Shimoda T, Yabe H, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S and Kondo T. (2009). Nucleophosmin as a candidate prognostic biomarker of Ewing's sarcoma revealed by proteomics. *Clin Cancer Res* **15**: 2885-94.

Kim CK, Nguyen TL, Lee SB, Park SB, Lee KH, Cho SW and Ahn JY. (2011). Akt2 and nucleophosmin/B23 function as an oncogenic unit in human lung cancer cells. *Exp Cell Res* **317**: 966-75.

Kimura G, Kasuya J, Giannini S, Honda Y, Mohan S, Kawachi M, Akimoto M and Fujita-Yamaguchi Y. (1996). Insulin-like growth factor (IGF) system components in human prostatic cancer cell-lines: LNCaP, DU145, and PC-3 cells. *Int J Urol* **3**: 39-46.

Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J and Ohgaki H. (1997). Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* **150**: 1-13.

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG and Halmos B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **352**: 786-92.

Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR and Ohta T. (2010). Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer Res* **70**: 6746-56.

Kondo T, Minamino N, Nagamura-Inoue T, Matsumoto M, Taniguchi T and Tanaka N. (1997). Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* **15**: 1275-81.

Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW and Quelle DE. (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* **25**: 1258-71.

Kuan CT, Wikstrand CJ and Bigner DD. (2001). EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* **8**: 83-96.

Kuo ML, den Besten W, Bertwistle D, Roussel MF and Sherr CJ. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev* **18**: 1862-74.

Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D and Laiho M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* **5**: 465-75.

Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson SH and Yasui A. (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13738-43.

Landstrom M, Eklov S, Colosetti P, Nilsson S, Damber JE, Bergh A and Funa K. (1996). Estrogen induces apoptosis in a rat prostatic adenocarcinoma: association with an increased expression of TGF-beta 1 and its type-I and type-II receptors. *Int J Cancer* **67**: 573-9.

Leav I, McNeal JE, Ziar J and Alroy J. (1998). The localization of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in stromal and epithelial compartments of developing human prostate and hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions. *Hum Pathol* **29**: 668-75.

Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC and Hauser C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* **378**: 394-8.

Lee SB, Xuan Nguyen TL, Choi JW, Lee KH, Cho SW, Liu Z, Ye K, Bae SS and Ahn JY. (2008). Nuclear Akt interacts with B23/NPM and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16584-9.

Lee SO, Lou W, Hou M, Onate SA and Gao AC. (2003). Interleukin-4 enhances prostate-specific antigen expression by activation of the androgen receptor and Akt pathway. *Oncogene* **22**: 7981-8.

Leotoing L, Meunier L, Manin M, Mauduit C, Decaussin M, Verrijdt G, Claessens F, Benahmed M, Veyssiere G, Morel L and Beaudoin C. (2008). Influence of nucleophosmin/B23 on DNA

binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. *Oncogene* **27**: 2858-67.

Lessard F, Morin F, Ivanchuk S, Langlois F, Stefanovsky V, Rutka J and Moss T. (2010). The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. *Mol Cell* **38**: 539-50.

Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S and Yarden Y. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* **4**: 1029-40.

Li C, Larsson C, Futreal A, Lancaster J, Phelan C, Aspenblad U, Sundelin B, Liu Y, Ekman P, Auer G and Bergerheim US. (1998). Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. *Oncogene* **16**: 481-7.

Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC and Pang Q. (2004a). Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem* **279**: 41275-9.

Li L, Yang G, Ebara S, Satoh T, Nasu Y, Timme TL, Ren C, Wang J, Tahir SA and Thompson TC. (2001). Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* **61**: 4386-92.

Li R, Younes M, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, Frolov A and Ayala G. (2004b). Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate* **58**: 193-9.

Li Z, Boone D and Hann SR. (2008). Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18794-9.

Liao S and Fang S. (1969). Receptor-proteims for androgens and the mode of action of androgens on gene transcription in ventral prostate. *Vitam Horm* **27**: 17-90.

Libra M, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F, Spandidos DA and Mazzarino C. (2009). Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). *Int J Oncol* **34**: 897-903.

Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, Sun H and Wu H. (2000). Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol* **10**: 401-4.

Lima GA, Correa LL, Gabrich R, Miranda LC and Gadelha MR. (2009). IGF-I, insulin and prostate cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **53**: 969-75.

Lin CC, Wu HC, Tsai FJ, Chen HY and Chen WC. (2003). Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. *Urology* **62**: 374-7.

Lindstrom MS. (2011). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem Res Int* **2011**: 195209.

Lipschutz JH, Foster BA and Cunha GR. (1997). Differentiation of rat neonatal ventral prostates grown in a serum-free organ culture system. *Prostate* **32**: 35-42.

Liu H, Tan BC, Tseng KH, Chuang CP, Yeh CW, Chen KD, Lee SC and Yung BY. (2007a). Nucleophosmin acts as a novel AP2alpha-binding transcriptional corepressor during cell differentiation. *EMBO Rep* **8**: 394-400.

Liu X, Liu Z, Jang SW, Ma Z, Shinmura K, Kang S, Dong S, Chen J, Fukasawa K and Ye K. (2007b). Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9679-84.

Liu XH, Wiley HS and Meikle AW. (1993). Androgens regulate proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor (EGF)/TGF-alpha receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **77**: 1472-8.

Liu Y, Zhang F, Zhang XF, Qi LS, Yang L, Guo H and Zhang N. (2012). Expression of Nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. *J Biomed Sci* **19**: 53.

Lo HW and Hung MC. (2006). Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* **94**: 184-8.

Loblaw DA, Virgo KS, Nam R, Somerfield MR, Ben-Josef E, Mendelson DS, Middleton R, Sharp SA, Smith TJ, Talcott J, Taplin M, Vogelzang NJ, Wade JL, 3rd, Bennett CL and Scher HI. (2007). Initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer: 2006 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* **25**: 1596-605.

Louvet E, Junera HR, Berthuy I and Hernandez-Verdun D. (2006). Compartmentation of the nucleolar processing proteins in the granular component is a CK2-driven process. *Mol Biol Cell* **17**: 2537-46.

Lukas J, Lukas C and Bartek J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**: 997-1007.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J and Haber DA. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**: 2129-39.

Macri E and Loda M. (1998-1999). Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **17**: 337-44.

Madshus IH and Stang E. (2009). Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci* **122**: 3433-9.

Maggi LB, Jr., Kuchenruether M, Dadey DY, Schwope RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP and Weber JD. (2008). Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol Cell Biol* **28**: 7050-65.

Maheshwari G, Wiley HS and Lauffenburger DA. (2001). Autocrine epidermal growth factor signaling stimulates directionally persistent mammary epithelial cell migration. *J Cell Biol* **155**: 1123-8.

Maitland NJ, Frame FM, Polson ES, Lewis JL and Collins AT. (2011). Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype? *Horm Cancer* **2**: 47-61.

Marcelli M, Haidacher SJ, Plymate SR and Birnbaum RS. (1995). Altered growth and insulin-like growth factor-binding protein-3 production in PC3 prostate carcinoma cells stably transfected with a constitutively active androgen receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* **136**: 1040-8.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R and Cunha GR. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* **253**: 165-74.

Martino A, Holmes JHt, Lord JD, Moon JJ and Nelson BH. (2001). Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol* **166**: 1723-9.

Mattoon DR, Lamothe B, Lax I and Schlessinger J. (2004). The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol* **2**: 24.

McKeehan WL, Adams PS and Rosser MP. (1984). Direct mitogenic effects of insulin, epidermal growth factor, glucocorticoid, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free, primary cell culture. *Cancer Res* **44**: 1998-2010.

McLay DW and Clarke HJ. (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* **125**: 625-33.

Melamed J, Einhorn JM and Ittmann MM. (1997). Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* **3**: 1867-72.

Mendes-da-Silva P, Moreira A, Duro-da-Costa J, Matias D and Monteiro C. (2000). Frequent loss of heterozygosity on chromosome 5 in non-small cell lung carcinoma. *Mol Pathol* **53**: 184-7.

Merz VW, Arnold AM and Studer UE. (1994). Differential expression of transforming growth factor-beta 1 and beta 3 as well as c-fos mRNA in normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *World J Urol* **12**: 96-8.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P and Waxman J. (2004). Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* **90**: 2312-6.

Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z and Derynck R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* **376**: 337-41.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, Nanayakkara M, Lombardi M, de Falco A, Bilancio A, Varricchio L, Ciociola A and Auricchio F. (2005). Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer Res* **65**: 10585-93.

Mills AD, Laskey RA, Black P and De Robertis EM. (1980). An acidic protein which assembles nucleosomes in vitro is the most abundant protein in Xenopus oocyte nuclei. *J Mol Biol* **139**: 561-8.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL and Look AT. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **263**: 1281-4.

Motoi N, Suzuki K, Hirota R, Johnson P, Oofusa K, Kikuchi Y and Yoshizato K. (2008). Identification and characterization of nucleoplasmin 3 as a histone-binding protein in embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* **50**: 307-20.

Mouraviev V and Polascik TJ. (2006). Update on cryotherapy for prostate cancer in 2006. *Curr Opin Urol* **16**: 152-6.

Mui AL. (1999). The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **55**: 1547-58.

Murano K, Okuwaki M, Hisaoka M and Nagata K. (2008). Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol Cell Biol* **28**: 3114-26.

Nagatsuka H, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Nakano K and Nagai N. (2001). Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol* **37**: 599-604.

Nakamoto T, Chang CS, Li AK and Chodak GW. (1992). Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **52**: 571-7.

Naylor MJ and Ormandy CJ. (2002). Mouse strain-specific patterns of mammary epithelial ductal side branching are elicited by stromal factors. *Dev Dyn* **225**: 100-5.

Nicholson KM and Anderson NG. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**: 381-95.

Nicholson SE, Metcalf D, Sprigg NS, Columbus R, Walker F, Silva A, Cary D, Willson TA, Zhang JG, Hilton DJ, Alexander WS and Nicola NA. (2005). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2328-33.

Nishi N, Oya H, Matsumoto K, Nakamura T, Miyanaka H and Wada F. (1996). Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostates. *Prostate* **28**: 139-52.

Nishimura K, Nonomura N, Satoh E, Harada Y, Nakayama M, Tokizane T, Fukui T, Ono Y, Inoue H, Shin M, Tsujimoto Y, Takayama H, Aozasa K and Okuyama A. (2001). Potential mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen-independent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**: 1739-46.

Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y and Umekawa H. (2002). Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 2239-42.

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R and Yu H. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* **21**: 2000-8.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F and Salomon DS. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**: 2-16.

Nousiainen M, Sillje HH, Sauer G, Nigg EA and Korner R. (2006). Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5391-6.

Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, Dinjens WN and Bosman FT. (1996). Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol* **178**: 48-52.

Okamoto M, Lee C and Oyasu R. (1997). Autocrine effect of androgen on proliferation of an androgen responsive prostatic carcinoma cell line, LNCAP: role of interleukin-6. *Endocrinology* **138**: 5071-4.

Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE and Fukasawa K. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**: 127-40.

Okuwaki M. (2008). The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* **143**: 441-8.

Okuwaki M, Iwamatsu A, Tsujimoto M and Nagata K. (2001a). Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J Mol Biol* **311**: 41-55.

Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M and Nagata K. (2001b). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* **506**: 272-6.

Okuwaki M, Tsujimoto M and Nagata K. (2002). The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol Biol Cell* **13**: 2016-30.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* **19**: 3159-67.

Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW and Kaye FJ. (1994). Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene* **9**: 3375-8.

Pang Q, Christianson TA, Koretsky T, Carlson H, David L, Keeble W, Faulkner GR, Speckhart A and Bagby GC. (2003). Nucleophosmin interacts with and inhibits the catalytic function of eukaryotic initiation factor 2 kinase PKR. *J Biol Chem* **278**: 41709-17.

Park S, Jung HH, Park YH, Ahn JS and Im YH. (2011). ERK/MAPK pathways play critical roles in EGFR ligands-induced MMP1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **407**: 680-6.

Park SK, Miller R, Krane I and Vartanian T. (2001). The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol* **154**: 1245-58.

Peehl DM, Wong ST, Bazinet M and Stamey TA. (1989). In vitro studies of human prostatic epithelial cells: attempts to identify distinguishing features of malignant cells. *Growth Factors* **1**: 237-50.

Perrimon N and McMahon AP. (1999). Negative feedback mechanisms and their roles during pattern formation. *Cell* **97**: 13-6.

Philpott A and Leno GH. (1992). Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in Xenopus egg extracts. *Cell* **69**: 759-67.

Pianta A, Puppin C, Passon N, Franzoni A, Romanello M, Tell G, Di Loreto C, Bulotta S, Russo D and Damante G. (2011). Nucleophosmin delocalization in thyroid tumour cells. *Endocr Pathol* **22**: 18-23.

Pienta KJ, Isaacs WB, Vindivich D and Coffey DS. (1991). The effects of basic fibroblast growth factor and suramin on cell motility and growth of rat prostate cancer cells. *J Urol* **145**: 199-202.

Pisters LL, Troncoso P, Zhau HE, Li W, von Eschenbach AC and Chung LW. (1995). c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J Urol* **154**: 293-8.

Prehn RT. (1999). On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Res* **59**: 4161-4.

Prins GS, Birch L, Tang WY and Ho SM. (2007). Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol* **23**: 374-82.

Prins GS, Huang L, Birch L and Pu Y. (2006). The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. *Ann N Y Acad Sci* **1089**: 1-13.

Prins GS and Korach KS. (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* **73**: 233-44.

Prins GS and Putz O. (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* **76**: 641-59.

Raber J, O'Shea RD, Bloom FE and Campbell IL. (1997). Modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function by transgenic expression of interleukin-6 in the CNS of mice. *J Neurosci* **17**: 9473-80.

Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS and Buttyan R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* **55**: 4438-45.

Raynaud JP. (2006). Prostate cancer risk in testosterone-treated men. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**: 261-6.

Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA and Corey SJ. (1996). The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* **87**: 882-6.

Roberts AB, Heine UI, Flanders KC and Sporn MB. (1990). Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci* **580**: 225-32.

Roberts AB and Sporn MB. (1985). Transforming growth factors. *Cancer Surv* **4**: 683-705.

Romeo G, Fiorucci G, Chiantore MV, Percario ZA, Vannucchi S and Affabris E. (2002). IRF-1 as a negative regulator of cell proliferation. *J Interferon Cytokine Res* **22**: 39-47.

Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Oh Y, Conover C, De Leon DD, Donovan SM, Ocrant I and Giudice L. (1990). Insulinlike growth factor-binding proteins. *Recent Prog Horm Res* **46**: 99-159; discussion 159-63.

Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL and Tweardy DJ. (1996a). Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **78**: 1284-92.

Rubin Grandis J, Zeng D and Tweardy DJ. (1996b). Retinoic acid normalizes the increased gene transcription rate of TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer cell lines. *Nat Med* **2**: 234-40.

Russell PJ, Bennett S and Stricker P. (1998). Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* **44**: 705-23.

Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE and Crissman JD. (1993). The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* **150**: 379-85.

Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K and Joensuu H. (1998). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* **153**: 103-8.

Samad MA, Okuwaki M, Haruki H and Nagata K. (2007). Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. *FEBS Lett* **581**: 3283-8.

Sari A, Calli A, Altinboga AA, Pehlivan FS, Gorgel SN, Balci U, Ermete M, Dincel C and Cakalagaoglu F. (2011). Nucleophosmin expression in renal cell carcinoma and oncocytoma. *Apmis* **120**: 187-94.

Sato K, Hayami R, Wu W, Nishikawa T, Nishikawa H, Okuda Y, Ogata H, Fukuda M and Ohta T. (2004). Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**: 30919-22.

Savkur RS and Olson MO. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA byprotein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* **26**: 4508-15.

Scher HI, Sarkis A, Reuter V, Cohen D, Netto G, Petrylak D, Lianes P, Fuks Z, Mendelsohn J and Cordon-Cardo C. (1995). Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* **1**: 545-50.

Schlessinger J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 25-30.

Schubert D, Ling N and Baird A. (1987). Multiple influences of a heparin-binding growth factor on neuronal development. *J Cell Biol* **104**: 635-43.

Schultz C, Meier M and Schmid HP. (2011). Nutrition, dietary supplements and adenocarcinoma of the prostate. *Maturitas* **70**: 339-42.

Schulz WA, Burchardt M and Cronauer MV. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* **9**: 437-48.

Schuurmans AL, Bolt J and Mulder E. (1988). Androgens and transforming growth factor beta modulate the growth response to epidermal growth factor in human prostatic tumor cells (LNCaP). *Mol Cell Endocrinol* **60**: 101-4.

Segatto O, Anastasi S and Alema S. (2011). Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors. *J Cell Sci* **124**: 1785-93.

Sehgal I, Baley PA and Thompson TC. (1996). Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. *Cancer Res* **56**: 3359-65.

Sen A, De Castro I, Defranco DB, Deng FM, Melamed J, Kapur P, Raj GV, Rossi R and Hammes SR. (2012). Paxillin mediates extranuclear and intranuclear signaling in prostate cancer proliferation. *J Clin Invest* **122**: 2469-81.

Seslar SP, Nakamura T and Byers SW. (1993). Regulation of fibroblast hepatocyte growth factor/scatter factor expression by human breast carcinoma cell lines and peptide growth factors. *Cancer Res* **53**: 1233-8.

Shah RB, Ghosh D and Elder JT. (2006). Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *Prostate* **66**: 1437-44.

Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS and Kundu TK. (2009). Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Mol Cell Biol* **29**: 5115-27.

Shannon JM and Cunha GR. (1983). Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *Prostate* **4**: 367-73.

Sherwood ER, Fong CJ, Lee C and Kozlowski JM. (1992). Basic fibroblast growth factor: a potential mediator of stromal growth in the human prostate. *Endocrinology* **130**: 2955-63.

Shields LB, Gercel-Taylor C, Yashar CM, Wan TC, Katsanis WA, Spinnato JA and Taylor DD. (1997). Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. *J Soc Gynecol Investig* **4**: 298-304.

Shinmura K, Tarapore P, Tokuyama Y, George KR and Fukasawa K. (2005). Characterization of centrosomal association of nucleophosmin/B23 linked to Crm1 activity. *FEBS Lett* **579**: 6621-34.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y and Ushio Y. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **63**: 6962-70.

Siegsmund MJ, Yamazaki H and Pastan I. (1994). Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia. *J Urol* **151**: 1396-9.

Siiteri PK and Wilson JD. (1974). Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab* **38**: 113-25.

Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ and Jove R. (2000). Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* **19**: 5419-27.

Sitaram N and Nagaraj R. (1995). Seminal plasmin. *Bioessays* **17**: 415-22.

Slack JM, Darlington BG, Heath JK and Godsave SF. (1987). Mesoderm induction in early Xenopus embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* **326**: 197-200.

Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z and Keller ET. (2001). Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 33-40.

Soltoff SP, Carraway KL, 3rd, Prigent SA, Gullick WG and Cantley LC. (1994). ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **14**: 3550-8.

Sorkin A and Goh LK. (2009). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* **315**: 683-96.

Srinivasan M and Jewell SD. (2001). Evaluation of TGF-alpha and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. *Oncology* **61**: 284-92.

Stearns ME, Rhim J and Wang M. (1999). Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin Cancer Res* **5**: 189-96.

Stefanou D, Batistatou A, Kamina S, Arkoumani E, Papachristou DJ and Agnantis NJ. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *In Vivo* **18**: 155-60.

Steiner MS, Anthony CT, Metts J and Moses HL. (1995). Prostate cancer cells lose their sensitivity to TGFbetaI growth inhibition with tumor progression. *Urol Oncol* **1**: 252-62.

Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E and Folkman J. (2001). Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J Urol* **165**: 688-93.

Story MT. (1995). Regulation of prostate growth by fibroblast growth factors. *World J Urol* **13**: 297-305.

Story MT, Hopp KA and Meier DA. (1996). Regulation of basic fibroblast growth factor expression by transforming growth factor beta in cultured human prostate stromal cells. *Prostate* **28**: 219-26.

Story MT, Livingston B, Baeten L, Swartz SJ, Jacobs SC, Begun FP and Lawson RK. (1989). Cultured human prostate-derived fibroblasts produce a factor that stimulates their growth with properties indistinguishable from basic fibroblast growth factor. *Prostate* **15**: 355-65.

Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, Briggman JV, Chan PK and Partin AW. (1999). Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate* **39**: 298-304.

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X and Wu H. (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6199-204.

Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T and Ito H. (2003). Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* **10**: 209-16.

Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK and Kundu TK. (2005). Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* **25**: 7534-45.

Szebeni A, Herrera JE and Olson MO. (1995). Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* **34**: 8037-42.

Tago K, Chiocca S and Sherr CJ. (2005). Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7689-94.

Takeda H and Chang C. (1991). Immunohistochemical and in-situ hybridization analysis of androgen receptor expression during the development of the mouse prostate gland. *J Endocrinol* **129**: 83-9.

Takemura M, Sato K, Nishio M, Akiyama T, Umekawa H and Yoshida S. (1999). Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. *J Biochem* **125**: 904-9.

Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T and Terada M. (1992). Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res* **52**: 3372-7.

Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA and Van Dam FS. (2004). Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: report of a workshop. *J Clin Oncol* **22**: 2233-9.

Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN and Balk SP. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* **332**: 1393-8.

Thomas DJ, Robinson M, King P, Hasan T, Charlton R, Martin J, Carr TW and Neal DE. (1993). p53 expression and clinical outcome in prostate cancer. *Br J Urol* **72**: 778-81.

Thompson J, Finlayson K, Salvo-Chirnside E, MacDonald D, McCulloch J, Kerr L and Sharkey J. (2008). Characterisation of the Bax-nucleophosmin interaction: the importance of the Bax C-terminus. *Apoptosis* **13**: 394-403.

Timms BG. (2008). Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* **76**: 565-77.

Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P and Fukasawa K. (2001). Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* **276**: 21529-37.

Torring N, Dagnaes-Hansen F, Sorensen BS, Nexo E and Hynes NE. (2003). ErbB1 and prostate cancer: ErbB1 activity is essential for androgen-induced proliferation and protection from the apoptotic effects of LY294002. *Prostate* **56**: 142-9.

Traish AM and Wotiz HH. (1987). Prostatic epidermal growth factor receptors and their regulation by androgens. *Endocrinology* **121**: 1461-7.

Tran CP, Lin C, Yamashiro J and Reiter RE. (2002). Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. *Mol Cancer Res* **1**: 113-21.

Troyer KL, Luetteke NC, Saxon ML, Qiu TH, Xian CJ and Lee DC. (2001). Growth retardation, duodenal lesions, and aberrant ileum architecture in triple null mice lacking EGF, amphiregulin, and TGF-alpha. *Gastroenterology* **121**: 68-78.

Truong LD, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, Scardino PT and Thompson TC. (1993). Association of transforming growth factor-beta 1 with prostate cancer: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* **24**: 4-9.

Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH and Slingerland JM. (1998). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* **58**: 542-8.

Tu SM, McConnell K, Marin MC, Campbell ML, Fernandez A, von Eschenbach AC and McDonnell TJ. (1995). Combination adriamycin and suramin induces apoptosis in bcl-2 expressing prostate carcinoma cells. *Cancer Lett* **93**: 147-55.

Twillie DA, Eisenberger MA, Carducci MA, Hseih WS, Kim WY and Simons JW. (1995). Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology* **45**: 542-9.

Ueda T, Bruchovsky N and Sadar MD. (2002). Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem* **277**: 7076-85.

Ugolkov AV, Eisengart LJ, Luan C and Yang XJ. (2011). Expression analysis of putative stem cell markers in human benign and malignant prostate. *Prostate* **71**: 18-25.

Umekawa H, Chang JH, Correia JJ, Wang D, Wingfield PT and Olson MO. (1993). Nucleolar protein B23: bacterial expression, purification, oligomerization and secondary structures of two isoforms. *Cell Mol Biol Res* **39**: 635-45.

Vendenbos F and Chevallier D. (2004). Cancers de la prostate : classification histopathologique. *Oncology* **6**: 285-93.

Vicentini C, Festuccia C, Gravina GL, Angelucci A, Marronaro A and Bologna M. (2003). Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in vitro on human cell lines and primary cultures. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**: 165-74.

Voeller HJ, Augustus M, Madike V, Bova GS, Carter KC and Gelmann EP. (1997). Coding region of NKX3.1, a prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers. *Cancer Res* **57**: 4455-9.

Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S and Ushigome S. (1992). Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* **168**: 257-62.

Wang BB, Lu R, Wang WC and Jin Y. (2006a). Inducible and reversible suppression of Npm1 gene expression using stably integrated small interfering RNA vector in mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **347**: 1129-37.

Wang D, Umekawa H and Olson MO. (1993). Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res* **39**: 33-42.

Wang G, Pan Y, Ahmad KA and Ahmed K. (2010). Protein B23/nucleophosmin/numatrin nuclear dynamics in relation to protein kinase CK2 and apoptotic activity in prostate cells. *Biochemistry* **49**: 3842-52.

Wang M, Hu Y, Shima I and Stearns ME. (2002). IL-10/IL-10 receptor signaling regulates TIMP-1 expression in primary human prostate tumor lines. *Cancer Biol Ther* **1**: 556-63.

Wang W, Budhu A, Forgues M and Wang XW. (2005). Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* **7**: 823-30.

Wang Y, Hayward SW, Donjacour AA, Young P, Jacks T, Sage J, Dahiya R, Cardiff RD, Day ML and Cunha GR. (2000). Sex hormone-induced carcinogenesis in Rb-deficient prostate tissue. *Cancer Res* **60**: 6008-17.

Wang Y, Wu J and Wang Z. (2006b). Akt binds to and phosphorylates phospholipase C-gamma1 in response to epidermal growth factor. *Mol Biol Cell* **17**: 2267-77.

Warner JR. (1990). The nucleolus and ribosome formation. *Curr Opin Cell Biol* **2**: 521-7.

Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ and Bar-Sagi D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* **1**: 20-6.

Weber MJ and Gioeli D. (2004). Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* **91**: 13-25.

Wells A, Kassis J, Solava J, Turner T and Lauffenburger DA. (2002). Growth factor-induced cell motility in tumor invasion. *Acta Oncol* **41**: 124-30.

Willmarth NE, Baillo A, Dziubinski ML, Wilson K, Riese DJ, 2nd and Ethier SP. (2009). Altered EGFR localization and degradation in human breast cancer cells with an amphiregulin/EGFR autocrine loop. *Cell Signal* **21**: 212-9.

Wilson JD and Gloyna RE. (1970). The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. *Recent Prog Horm Res* **26**: 309-36.

Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA and Riese DJ, 2nd. (2009). Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther* **122**: 1-8.

Winteringham LN, Kobelke S, Williams JH, Ingley E and Klinken SP. (2004). Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene* **23**: 5105-9.

Wissmann C and Detmar M. (2006). Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* **12**: 6865-8.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS and Vogelstein B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2965-9.

Wu MH, Chang JH and Yung BY. (2002). Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis* **23**: 93-100.

Xian CJ and Zhou XF. (2004). EGF family of growth factors: essential roles and functional redundancy in the nerve system. *Front Biosci* **9**: 85-92.

Xu J. (2000). Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. *Am J Hum Genet* **66**: 945-57.

Xu Y, Tan LJ, Grachtchouk V, Voorhees JJ and Fisher GJ. (2005). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function. *J Biol Chem* **280**: 42694-700.

Yao J, Fu C, Ding X, Guo Z, Zenreski A, Chen Y, Ahmed K, Liao J, Dou Z and Yao X. (2004). Nek2A kinase regulates the localization of numatrin to centrosome in mitosis. *FEBS Lett* **575**: 112-8.

Ye K. (2005). Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* **4**: 918-23.

Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, Valentine MB, Raimondi SC, Cohen KJ, Carroll AJ and Morris SW. (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* **12**: 265-75.

Yoshimoto M, Ding K, Sweet JM, Ludkovski O, Trottier G, Song KS, Joshua AM, N EF, Squire JA and Evans AJ. (2012). PTEN losses exhibit heterogeneity in multifocal prostatic adenocarcinoma and are associated with higher Gleason grade. *Mod Pathol*.

You BJ, Huang IJ, Liu WH, Hung YB, Chang JH and Yung BY. (1999). Decrease in nucleophosmin/B23 mRNA and telomerase activity during indomethacin-induced apoptosis of gastric KATO-III cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **360**: 683-90.

Zeller KI, Haggerty TJ, Barrett JF, Guo Q, Wonsey DR and Dang CV. (2001). Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. *J Biol Chem* **276**: 48285-91.

Zenzmaier C, Untergasser G and Berger P. (2008). Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. *Exp Gerontol* **43**: 981-5.

Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W and Pelech S. (2004). B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J Biol Chem* **279**: 35726-34.

Zhao X, Gschwend JE, Powell CT, Foster RG, Day KC and Day ML. (1997). Retinoblastoma protein-dependent growth signal conflict and caspase activity are required for protein kinase C-signaled apoptosis of prostate epithelial cells. *J Biol Chem* **272**: 22751-7.

Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Corney DC, Wang W, Goodrich DW, Roy-Burman P and Nikitin AY. (2006). Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* **66**: 7889-98.

Zirwes RF, Kouzmenko AP, Peters JM, Franke WW and Schmidt-Zachmann MS. (1997). Topogenesis of a nucleolar protein: determination of molecular segments directing nucleolar association. *Mol Biol Cell* **8**: 231-48.

Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, Wan XX, He QY, Li JH, Qu JQ, Chen Y and Xiao ZQ. (2011). Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem* **112**: 2508-17.