



**HAL**  
open science

# La voie ERK1/2 : point d'intégration et de convergence des connexions entre voies de signalisation dans les cellules épithéliales de prostate normale

Nadège Poncet

► **To cite this version:**

Nadège Poncet. La voie ERK1/2 : point d'intégration et de convergence des connexions entre voies de signalisation dans les cellules épithéliales de prostate normale. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10292 . tel-00824334

**HAL Id: tel-00824334**

**<https://theses.hal.science/tel-00824334>**

Submitted on 21 May 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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

L'ECOLE DOCTORALE BMIC « BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE »

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 Août 2006)

Soutenance le Mardi 14 Décembre 2010

par

**Mlle Nadège PONCET**

---

---

**LA VOIE ERK1/2 : POINT D'INTEGRATION ET DE CONVERGENCE  
DES CONNEXIONS ENTRE VOIES DE SIGNALISATION DANS LES  
CELLULES EPITHELIALES DE PROSTATE NORMALE**

---

---

DIRECTEUR DE THESE : Dr. Guy MOUCHIROUD

JURY : Pr. Fabien VAN COPPENOLLE  
Pr. Claude BEAUDOIN  
Pr. Morad ROUDBARAKI  
Pr. Marc COLOMBEL  
Pr. Laurent MOREL

---

# **1 AVANT-PROPOS**

---

## 1.1 Composantes de l'Université

### UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

#### Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

#### M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

### COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

### COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard



## 1.2 Remerciements

Je souhaite avant tout remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail dans des délais aussi brefs. Merci à Monsieur Fabien Van Coppenolle de présider ce jury. Je remercie Messieurs Claude Beaudoin et Morad Roudbaraki d'avoir accepté d'endosser le rôle de rapporteur. Merci à Monsieur Marc Colombel d'avoir accepté de faire partie de ce jury, et à Monsieur Laurent Morel, qui m'a par ailleurs prodigué de judicieux conseils lors des comités de thèse.

J'ai aussi à cœur de remercier mon directeur de thèse, Guy Mouchiroud, qui a su me guider et m'encourager pendant ces 4 ans. Malgré son emploi du temps surchargé, il a toujours su se rendre disponible pour partager mon enthousiasme lorsque les résultats le permettaient, et tempérer ma déception avec bon sens, quand nos théories s'effondraient. Il a aussi été très présent pendant la délicate période de rédaction, et m'a donné tout son soutien.

Un grand merci à ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Pour les discussions et les réflexions, je remercie Muriel Le Romancier, deuxième membre de mon comité de thèse. Pour des questions plus matérielles, je remercie Nathalie Aillioli (cellules RWPE-1), Virginie Vlaeminck et Dogus Altintas (Cellules RWPE-1-AR-2-2), Andreas Ludwig (GI254023X et GW280264X), Amandine Hurbin (Test ELISA et Amphiréguline), Claude Baudoin (Constructions GST-AR), Alain Eychène (Vecteur pcDNA3-Raf-1), Walter Kolch (Constructions GST-Raf-1 murines).

Merci à l'équipe *Signalisation et renouvellement cellulaire* de m'avoir supportée avec ma prostate... Un merci tout particulier à Johann Guillaume qui a initié le travail sur l'IL-6 pendant son M2, mais qui n'a malheureusement pas pu le poursuivre. Je ne remercie pas Roland Bourette d'être parti « *faire de la prostate* » à Seattle, mais je le remercie pour toutes les discussions que l'on a eues avant son départ. Merci aussi à Marie-France Grasset (même si elle n'aime pas les cellules adhérentes), à Stéphanie Gobert-G (même si elle ne sait pas ce qu'est le BPE), à Maïté Dearden. Bien sûr, je remercie aussi Guillaume Habif et Fanny De Luca, grâce à qui l'ambiance du labo était idéale, et qui me manquent beaucoup ! Un grand merci à l'équipe élargie, en particulier à Mich(-mich)èle Weiss, et Boris(Pat') Guyot (pour les pauses avec Christian) ! Pour finir, je remercie l'ensemble du CGMC pour l'environnement de travail et de réflexion qu'il m'a offert pendant 4 ans, et surtout pour tous les amis que j'y ai trouvés !

Je voudrais aussi remercier mes amis et ma famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de ce travail, même s'ils n'y comprenaient pas toujours grand-chose (il n'y a que Maille kinase !). Mes amis les plus présents pendant cette période : Anne B. Sandra D. Vanessa H. Céline M. Mathieu N. Camila P. Fabien R. Yongoua S. et tous les autres que je n'ai pas la place de citer ici ! Merci à ma famille : Bérengère P. et Jean-Do P. qui auraient fondé l'association « *La Flèche* » pour financer leur tête chercheuse :) Isabelle D. agence de voyage par procuration ;) Merci aussi à mes familles élargies : les Poncet, les Dalonneau et les Humann de croire en ce que je fais.

Le dernier, mais pas le moindre : je remercie de tout mon cœur Nicolas H. de me soutenir depuis le début, d'être le support sans qui je n'aurais jamais envisagé d'arriver jusqu'ici. Merci de me rendre ambitieuse et volontaire, et d'être la meilleure moitié de ce binôme qui ira encore plus loin !

## **LA VOIE ERK1/2 : POINT D'INTEGRATION ET DE CONVERGENCE DES CONNEXIONS ENTRE VOIES DE SIGNALISATION DANS LES CELLULES EPITHELIALES DE PROSTATE NORMALE**

### **1.3 Résumé**

Le développement et l'homéostasie cellulaire de la prostate impliquent le contrôle strict des voies de signalisation induites par les androgènes et les facteurs de croissance. Ces diverses voies sont profondément altérées dans le cancer de la prostate, notamment lors des stades les plus avancés. Dans ce travail, une lignée immortalisée à partir de l'épithélium de prostate humaine, la lignée RWPE-1, a été utilisée pour étudier certains signaux régulant la prolifération cellulaire, ainsi que les connexions entre les voies de signalisation correspondantes. La prolifération des cellules RWPE-1 est sous la dépendance de l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui intervient physiologiquement dans le développement épithélial. Les récepteurs apparentés à l'EGF-R sont également impliqués dans la prolifération au cours de la progression tumorale.

La prolifération des cellules RWPE-1 en réponse à l'EGF est strictement dépendante de la voie ERK1/2, qui est donc considérée comme un point d'intégration des signaux. L'utilisation d'inhibiteurs du récepteur aux androgènes a permis de montrer le rôle essentiel qu'il joue dans l'activation d'ERK1/2 en réponse à l'EGF. Le récepteur aux androgènes s'associe avec plusieurs molécules de signalisation dans les cellules RWPE-1. Je démontre ici pour la première fois une association entre le récepteur aux androgènes et la kinase Raf-1, activatrice de la voie ERK1/2. Ainsi, le récepteur aux androgènes contrôlerait directement un processus essentiel à la prolifération épithéliale selon un mode d'action non-génomique.

Par ailleurs, j'ai montré que la réponse proliférative des cellules RWPE-1 à l'IL-6 requiert l'activation de la voie ERK1/2, et l'activité kinase de l'EGF-R, suggérant la transactivation de ce récepteur par l'IL-6. L'utilisation de divers inhibiteurs chimiques a permis de démontrer que les métalloprotéases de la famille ADAM (a disintegrin and metalloprotease), notamment ADAM17, sont impliquées dans ce processus. Ainsi, l'activation de protéines ADAM par l'IL-6 conduirait au clivage d'un ligand membranaire de l'EGF-R, aboutissant à l'activation de la voie ERK1/2. Ce nouveau mécanisme pourrait être impliqué dans les situations inflammatoires conduisant à une prolifération excessive de l'épithélium prostatique, prélude à la transformation tumorale.

En conclusion, les voies de signalisation étudiées sont fortement connectées dans les cellules épithéliales normales. Les deux nouveaux mécanismes décrits ici aboutissent à l'activation des kinases ERK1/2, point d'intégration et de convergence des voies de signalisation dans les cellules épithéliales de prostate normale.

### **1.4 Mots-Clés**

Prostate ; Cellules épithéliales normales ; prolifération ; voie ERK1/2 ; Récepteur aux androgènes ; signalisation non-génomique ; IL-6 ; Récepteur à l'EGF ; transactivation.

## **ERK1/2 PATHWAY : AN INTEGRATING NODE OF CONVERGING SIGNALING PATHWAYS IN NORMAL PROSTATE EPITHELIAL CELLS.**

### **1.5 Summary**

Prostate development and cell homeostasis involve strict control of androgen and growth factors induced signaling pathways. These signaling pathways are deeply altered in prostate cancer, especially during late stages. In this work, the RWPE-1 immortalized cell line derived from human prostate epithelium has been used to study the signaling pathways regulating cell proliferation and their crosstalk. Optimal RWPE-1 proliferation is dependent on EGF (Epidermal Growth Factor), that also controls normal epithelial development. EGF-R family is also involved in cancer cell proliferation.

EGF-dependent RWPE-1 cell proliferation rely strictly on the ERK1/2 pathway which is then seen as a signal integrating node. Specific inhibitors showed essential role of androgen receptor in EGF mediated ERK1/2 activation. Androgen receptor is associated with several signaling molecules in RWPE-1 cells. I show here for the first time the physical interaction between the androgen receptor and the ERK1/2 activating kinase Raf1. Then, the androgen receptor could directly regulate an essential pathway for epithelial cells proliferation through a non-genomic mechanism.

In addition, I showed that IL-6 dependent RWPE-1 cells proliferation requires both ERK1/2 and EGF-R kinase activities, suggesting an IL-6 mediated transactivation of EGF-R. By using several inhibitors, I showed that ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family metalloproteases, especially ADAM17, are involved in this process. IL-6-mediated ADAM proteins activation could lead to the cleavage of a membrane bound EGF-R ligand, leading to ERK1/2 pathway activation. This new mechanism could be involved in the inflammatory situations inducing hyperproliferation of the prostate epithelium, the first step of the transformation process.

To conclude, the signaling pathways I studied are strongly connected in normal epithelial cells. The two new mechanisms described in this study lead to ERK1/2 kinases activation, an integrating node of signaling pathways in normal prostate epithelial cells.

### **1.6 Key words**

Prostate ; normal epithelial cells ; proliferation ; ERK1/2 pathway ; androgen receptor ; non-genomic signaling ; IL-6 ; EGF receptor ; transactivation.

## 1.7 Abréviations

ADAM	: A Disintegrin And Metalloprotease	MMP	: Matrix Metalloprotease
AF	: Activation Function	MR	: Mineralocorticoid Receptor
ARA70	: Androgen Receptor-Associated Protein-70	mTORC2	: mammalian Target of Rapamycin Complex 2
BAG1	: Bcl-2-associated athanogene 1	NE	: Cellules neuroendocrines
BTC	: Betacellulin	NES	: Nuclear Export sequence
CBM	: Cytokine Binding Module	NFκB	: Nuclear Factor κB
CDK	: Cyclin Dependant Kinase	NLS	: Nuclear Localization sequence
c-IAP	: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein	NTD	: N-Terminal Domain
CLC	: Cardiotrophin-Like Cytokine	NRG	: Neuregulin
CNTP	: Ciliar Neurotrophic Factor	OSM	: Oncostatine M
Csk	: C-terminal Src Kinase	OSMR	: Oncostatin M Receptor
CT-1	: Cardiotrophin-1	PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
DBD	: DNA-Binding Domain	PDKP1	: Phosphoinositide Dependent Kinase 1
DHT	: 5α-Dihydrotestosterone	PIAS	: Protein Inhibitor of Activated STAT
EGF	: Epidermal Growth Factor	PIP2	: Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
EGF-R	: Epidermal Growth Factor Receptor	PIP3	: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
EPR	: Epiregulin	PI3K	: Phospho-Inositide 3 Kinase
ERK	: Extracellular signal-Regulating Kinase	PKA	: Protein Kinase A
FAK	: Focal Adhesion Kinase	PKC	: Protein Kinase C
FERM	: Four-point-one Ezrin Radixin Moesin	PLCy	: Phospholipase Cy
FGF	: Fibroblast growth factor	PR	: Progesteron Receptor
FGFR	: Fibroblast growth factor Receptor	PSA	: Prostate Specific Antigen
Gab-1	: Grb2-associated binder-1	PSCA	: Prostate Stem Cell Antigen
GAG	: Glycosaminoglycans	PSMA	: Prostate Specific Membrane Antigen
GH	: Growth Hormone	PTB	: PhosphoTyrosine Binding Domain
GPCR	: G-Protein Coupled Receptor	PTH	: Parathyroid hormone
GR	: Glucocorticoid Receptor	RA	: Androgen Receptor
Grb2	: Growth factor Receptor Bound protein 2	RE	: Estrogen Receptor
GST	: Glutathione S-Transferase	ROS	: Reactive Oxydative Species
GTF	: General Transcription Factor	RTK	: Receptor Tyrosine Kinase
HAT	: Histone acetyltransferase	SFK	: Src Family Kinase
HB-EGF	: Heparin-Binding EGF-like Growth Factor	SH	: Src Homology
HGF	: Hepatocyte Growth Factor	SHP2	: SH2 domain containing Tyrosine Phosphatase
HIF-1α	: Hypoxia-Inductible Factor-1α	SOCS	: Suppressor of Cytokine Signalling
HRE	: Hormone Response Element	Sos	: Son of Sevenless
HSP	: Heat-Shock Protein	STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
IEG	: Immediate Early Gene	T/A	: Transit/Amplifying
IGF-1	: Insulin like Growth Factor-1	Tau	: Transcription activation unit
IGF-R	: Insulin like Growth Factor Receptor	TBP	: TATA box Binding Protien
IL-6	: Interleukin-6	TGF-α	: Transforming Growth Factor-α
IL-6Rα	: IL-6 Receptor α	TGF-β	: Transforming Growth Factor-β
JAK	: Janus Kinase	TIMP	: Tissue Inhibitor of Metalloprotease
KIR	: Kinase Inhibitory Region	TR4	: Testicular Receptor 4
LBD	: Ligand-Binding Domain	UGM	: Urogenital Mesenchyme
LIF	: Leukaemia Inhibitory Factor	UGS	: Urogenital Sinus
LIFR	: Leukaemia Inhibitory Factor Receptor	uPA	: Urokinase-type Plasminogen Activator
MAPK	: Mitogen-Activated Portein Kinase	uPAR	: Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
MEF	: Murine Embryonic Fibroblast	VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
MEK	: MAPK/ERK Kinase		

## 1.8 Table des matières

1	Avant-Propos	1
1.1	Composantes de l'Université	2
1.2	Remerciements	3
1.3	Résumé	4
1.4	Mots-Clés	4
1.5	Summary	5
1.6	Key words	5
1.7	Abréviations	6
1.8	Table des matières	7
1.9	Table des illustrations	12
2	Introduction	13
2.1	La prostate	14
2.1.1	La structure de l'épithélium prostatique	16
2.1.1.1	Anatomie	16
2.1.1.2	Structure	16
2.1.1.2.1	Compartiment stromal	16
2.1.1.2.2	Compartiment prolifératif	18
2.1.1.2.2.1	Cellules souches	18
2.1.1.2.2.2	Cellules T/A	20
2.1.1.2.3	Compartiment différencié	20
2.1.1.2.3.1	Cellules neuroendocrines (NE)	20
2.1.1.2.3.2	Cellules différenciées	21
2.1.2	Le développement de la prostate	23
2.1.2.1	Chez l'homme	23
2.1.2.1.1	Détermination de l'UGS	23
2.1.2.1.2	Initiation du bourgeonnement	23
2.1.2.1.3	Morphogenèse des ramifications	24
2.1.2.1.4	Différenciation de l'épithélium	24
2.1.2.1.5	Maturation de la prostate	24
2.1.2.2	Chez les rongeurs	24
2.1.3	La signalisation dans le développement et l'homéostasie de la prostate	26
2.1.3.1	Androgènes	26

2.1.3.2	EGF (Epidermal Growth Factor) -----	27
2.1.3.3	IL-6 (Interleukine-6) -----	28
2.1.3.4	Autres cytokines -----	28
2.1.3.4.1	FGF (Fibroblast Growth Factor) -----	28
2.1.3.4.2	TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) -----	30
2.1.3.4.3	IGF (Insulin-like Growth Factor) -----	31
2.1.3.4.4	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) -----	32
2.2	Aspects moléculaires de la signalisation -----	33
2.2.1	Les Androgènes -----	33
2.2.1.1	Récepteur aux androgènes -----	33
2.2.1.1.1	Profil d'expression -----	33
2.2.1.1.2	Structure du gène et de la protéine -----	35
2.2.1.1.2.1	Le domaine NTD -----	35
2.2.1.1.2.2	Le domaine DBD -----	35
2.2.1.1.2.3	La région Hinge -----	35
2.2.1.1.2.4	Le domaine LBD -----	37
2.2.1.2	Signalisation du récepteur aux androgènes -----	39
2.2.1.2.1	Activation canonique du récepteur aux androgènes -----	39
2.2.1.2.2	Transactivation du récepteur aux androgènes -----	39
2.2.1.2.3	Signalisation génomique -----	41
2.2.1.2.4	Signalisation non-génomique -----	41
2.2.2	EGF -----	44
2.2.2.1	Récepteur à l'EGF -----	44
2.2.2.1.1	Structure du gène et de la protéine -----	46
2.2.2.1.1.1	Domaine de liaison au ligand -----	46
2.2.2.1.1.2	Domaine transmembranaire -----	46
2.2.2.1.1.3	Domaine tyrosine kinase -----	47
2.2.2.1.1.4	Domaine C-terminal -----	47
2.2.2.2	Signalisation de l'EGF-R -----	49
2.2.2.2.1	Fixation du ligand -----	49
2.2.2.2.2	Dimérisation -----	49
2.2.2.2.3	Activation du domaine kinase de l'EGF-R -----	51
2.2.2.2.4	Activation des voies de signalisation en aval -----	51
2.2.2.2.4.1	Voie Ras/MAPK -----	53

2.2.2.2.4.2	Kinases Src	55
2.2.2.2.4.3	Voie STAT	55
2.2.2.2.4.4	Voie PI3-K/Akt	55
2.2.2.2.5	Recyclage ou dégradation des récepteurs	57
2.2.3	IL-6	59
2.2.3.1	Récepteur à l'IL6	59
2.2.3.1.1	IL-6R $\alpha$	59
2.2.3.1.2	Gp130	60
2.2.3.2	Signalisation de l'IL-6	60
2.2.3.2.1	Interaction IL-6 / IL-6R $\alpha$	60
2.2.3.2.2	Recrutement de gp130	60
2.2.3.2.3	Activation des voies de signalisation	62
2.2.3.2.3.1	Voie STAT	62
2.2.3.2.3.2	Rôle de la Tyrosine phosphatase SHP2	63
2.2.3.2.4	Terminaison du signal	63
2.3	Le contexte pathologique	65
2.3.1	Le cancer de la prostate	65
2.3.1.1	Incidence et mortalité	65
2.3.1.2	Facteurs de risque	65
2.3.1.3	Dépistage	65
2.3.1.4	Traitements	66
2.3.2	Développement tumoral	67
2.3.2.1	Initiation	67
2.3.2.2	Progression tumorale	68
2.3.2.2.1	Stade androgéno-dépendant	69
2.3.2.2.2	Stade androgéno-indépendant	70
2.3.2.3	Stade métastatique	70
2.3.3	Aspects moléculaires de la signalisation tumorale	72
2.3.3.1	Hormones stéroïdiennes	72
2.3.3.1.1	Androgènes	72
2.3.3.1.2	Œstrogènes	72
2.3.3.2	EGF	73
2.3.3.3	IL-6	74
2.3.3.4	Autres cytokines	75

2.3.3.4.1	TGF- $\beta$ -----	75
2.3.3.4.2	FGF -----	76
2.3.3.4.3	HGF-----	77
2.3.3.4.4	IGF-1 -----	77
2.3.3.4.5	VEGF -----	78
2.4	Emergence de connexions entre les voies de signalisation -----	79
2.4.1	Relation entre le récepteur aux androgènes et les récepteurs ERBB -----	79
2.4.1.1	Connexion verticale -----	79
2.4.1.2	Connexion horizontale -----	81
2.4.2	Relations entre le récepteur aux androgènes et les autres voies -----	82
2.4.2.1	Connexion verticale -----	82
2.4.2.1.1	IL-6-----	82
2.4.2.1.2	IGF-1 -----	82
2.4.2.1.3	TGF- $\beta$ -----	82
2.4.2.1.4	FGF -----	83
2.4.2.1.5	VEGF -----	83
2.4.2.2	Connexion horizontale -----	83
2.4.2.2.1	IL-6-----	83
2.4.2.2.2	IGF-1 -----	84
2.4.2.2.3	TGF- $\beta$ -----	84
2.4.2.2.4	FGF -----	85
2.4.2.2.5	VEGF -----	85
2.4.3	Relations entre le récepteur à l'EGF et les autres voies -----	85
2.4.3.1	Connexion verticale -----	85
2.4.3.2	Connexion horizontale -----	85
2.4.3.2.1	Transphosphorylation de l'EGF-R-----	86
2.4.3.2.1.1	IFN $\gamma$ -----	86
2.4.3.2.1.2	OSM -----	86
2.4.3.2.1.3	IGF-II-----	87
2.4.3.2.1.4	GH-----	87
2.4.3.2.1.5	uPAR-----	88
2.4.3.2.2	Clivage d'un pro-ligand de l'EGF-R-----	88
2.5	Les objectifs de la thèse-----	91
3	Résultats-----	93



3.1	Article 1 -----	94
3.1.1	Résumé -----	94
3.1.2	Manuscrit -----	95
3.1.3	Résultats supplémentaires-----	102
3.2	Article 2 -----	109
3.2.1	Résumé -----	109
3.2.2	Manuscrit -----	110
3.2.3	Résultats supplémentaires-----	131
4	Discussion -----	138
4.1	Bilan et discussion des résultats -----	139
4.1.1	L'IL-6 active la voie ERK en induisant le clivage d'un pro-ligand de l'EGF-R -----	139
4.1.1.1	Ligand -----	140
4.1.1.2	Métallo-protéinases-----	140
4.1.1.3	Activation des protéines ADAM par l'IL-6-----	143
4.1.2	L'interaction RA-Raf-1 et ses conséquences sur la voie ERK-----	144
4.1.2.1	Caractérisation de l'interaction -----	144
4.1.2.2	Rôle de l'interaction RA/Raf-1 -----	145
4.1.2.3	Plateforme de signalisation et localisation membranaire -----	146
4.1.3	Contexte cellulaire/tissulaire-----	148
4.1.3.1	IL-6, inflammation et carcinogénèse -----	148
1.1.1.1	Androgènes, signalisation non-génomique et échappement hormonal -----	148
4.2	Conclusion-----	150
5	Bibliographie -----	151

## 1.9 Table des illustrations

Figure 1 : Schéma anatomique de la prostate humaine.-----	14
Figure 2 : Coupes frontales et sagittales du complexe urogénital mâle chez l'homme et chez le rat -	15
Figure 3 : Organisation de l'épithélium prostatique.-----	17
Figure 4 : Rôle des androgènes et des facteurs de croissance dans l'interaction entre stroma et épithélium. -----	17
Figure 5 : Modèle hiérarchique de la différenciation de l'épithélium prostatique et profil d'expression de marqueurs protéiques spécifiques -----	19
Figure 6 : Schéma récapitulatif des étapes du développement de la prostate humaine.-----	22
Figure 7 : Rôle du FGF10 dans la morphogenèse des ramifications. -----	29
Figure 8 : Structure du gène et de la protéine du récepteur aux androgènes. -----	34
Figure 9 : Structure tridimensionnelle du domaine LBD du récepteur aux androgènes.-----	36
Figure 10 : Signalisation du récepteur aux androgènes. -----	38
Figure 11 : Les co-régulateurs du récepteur aux androgènes : rôle dans la transcription et interaction avec le récepteur.-----	40
Figure 12 : Spécificité des récepteurs de la famille ERBB. -----	43
Figure 13 : Structure du gène et de la protéine du récepteur à l'EGF.-----	45
Figure 14 : Structure de l'EGF-R, et mode d'activation. -----	48
Figure 15 : Sites de phosphorylation des domaines cytoplasmiques d'EGF-R, ERBB2 et ERBB3. -----	50
Figure 16 : Voie d'activation des MAP kinases ERK1/2. -----	52
Figure 17 : Mode d'activation de la kinase Src et phosphorylation de l'EGF-R. -----	54
Figure 18 : Voie d'activation de STAT5b.-----	54
Figure 19 : Deux modes d'activation de la voie PI3K/Akt par deux récepteurs de la famille ERBB. ----	56
Figure 20 : Structure tridimensionnelle de l'IL-6. -----	58
Figure 21 : Structures de l'IL-6R $\alpha$ et de gp130.-----	58
Figure 22 : Voies de signalisation induites par l'IL-6.-----	61
Figure 23 : Mécanisme général de la transactivation de l'EGF-R par le clivage d'un ligand. -----	89
Figure 24 : Schéma récapitulatif du mécanisme de transactivation de l'EGF-R par l'IL-6. -----	142

---

## **2 INTRODUCTION**

---

## 2.1 La prostate

La prostate est une petite glande de l'appareil génital masculin jouant un rôle dans la production du sperme. Elle a la forme d'une châtaigne d'environ 3 cm de hauteur pour 4 cm de large, est située sous la vessie, en avant du rectum (voir Figure 1). Elle entoure le début de l'urètre, canal qui permet d'éliminer l'urine de la vessie. Ainsi, la prostate a une fonction fibro-musculaire agissant pour bloquer le flux urinaire. Mais son principal rôle consiste à produire une partie du liquide séminal (le reste étant produit par les vésicules séminales). Ce liquide se mélange aux spermatozoïdes – qui viennent des testicules par les canaux déférents – dans l'urètre prostatique au moment de l'éjaculation. Les divers composés sécrétés par la prostate, sont essentiels à la survie des spermatozoïdes dans l'appareil génital féminin. En effet, la phosphatase acide, l'acide citrique ou les polyamines participent à réguler le pH, préservant un environnement alcalin pour les spermatozoïdes dans le milieu acide du col de l'utérus (Devens et al., 2000).

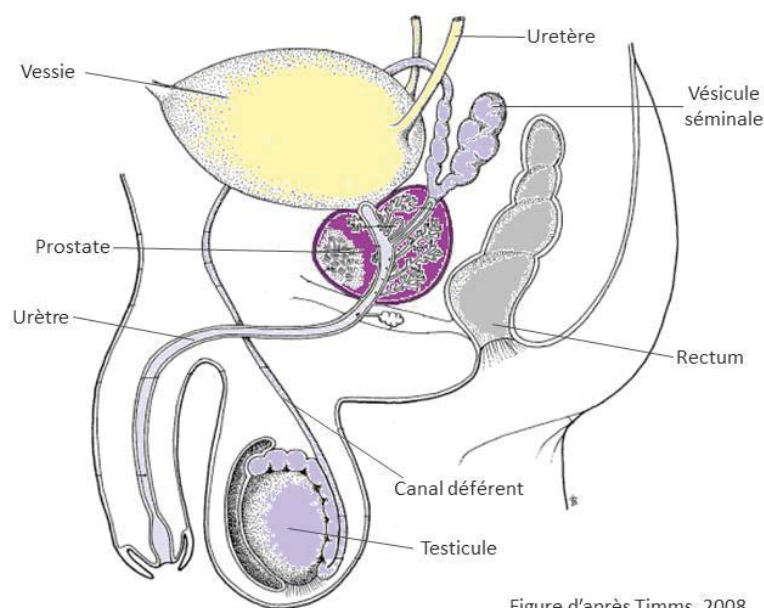
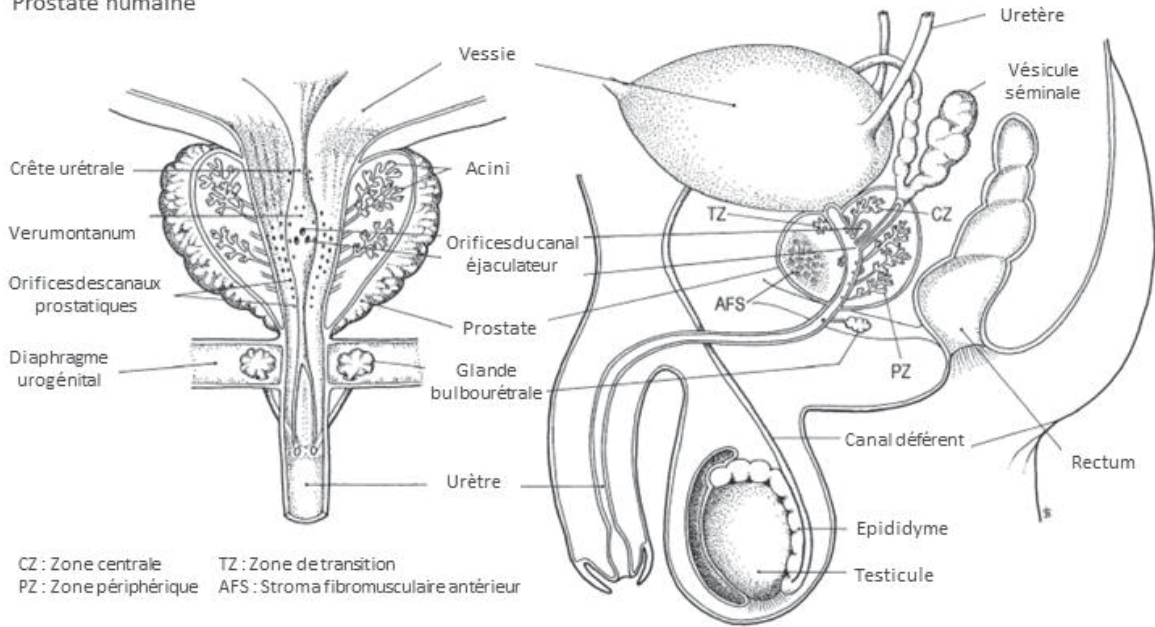


Figure 1 : Schéma anatomique de la prostate humaine.

Prostate humaine



Prostate murine

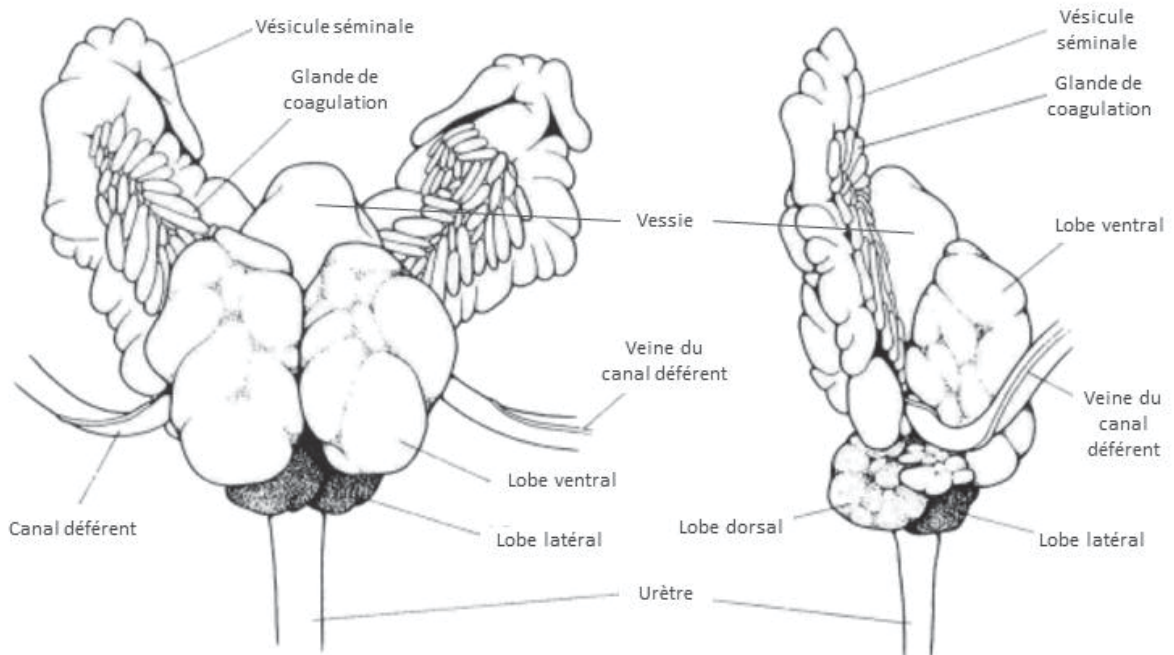


Figure d'après Timms, 2008

Figure 2 : Coupes frontales et sagittales du complexe urogénital mâle chez l'homme et chez le rat

## 2.1.1 La structure de l'épithélium prostatique

### 2.1.1.1 Anatomie

Au cours de l'embryogenèse des mammifères, la prostate se forme par bourgeonnement épithélial à partir du sinus urogénital d'origine endodermique. Cependant, l'anatomie de la prostate adulte diffère énormément entre les rongeurs et les humains (**voir Figure 2**). Chez les rongeurs, la prostate est composée de quatre lobes (antérieur, latéral, dorsal et ventral) organisés autour de la vessie. Chaque lobe, doté d'une fonction sécrétrice, a son propre patron de ramification et ses caractéristiques histologiques (Hayashi et al., 1991; Sugimura et al., 1986). Au contraire, la prostate humaine n'a pas d'organisation lobulaire, mais est scindée en cinq zones déterminées au cours du développement. Ces zones sont composées d'une quarantaine de structures tubulo-alvéolaires, formées à partir de canaux qui rayonnent autour de l'urètre, à la base de la vessie (Price, 1963). La partie ventrale de la prostate humaine est presque entièrement fibromusculaire, alors que la partie dorsale est de type glandulaire et entoure les canaux éjaculateurs au niveau de leur connexion à l'urètre (Timms, 2008).

### 2.1.1.2 Structure

La fonction sécrétrice de la prostate est assurée par des structures tubulo-alvéolaires, composées d'un épithélium bistratifié et de hauteur variable (**voir Figure 3**). La couche basale contient des cellules souches et des cellules progénitrices, et a une fonction proliférative. L'épithélium basal est continu chez l'homme et discontinu chez les rongeurs. La couche luminale est, quant à elle, composée de cellules différenciées et exerce une fonction sécrétrice. L'épithélium prostatique est entouré d'une lame basale qui le sépare du compartiment stromal. Le développement de l'épithélium prostatique est strictement dépendant des hormones mâles : les androgènes, mais aussi d'autres facteurs de croissance agissant de manière paracrine (**voir paragraphe 2.1.3. La signalisation dans le développement et l'homéostasie de la prostate, page 26**).

#### 2.1.1.2.1 Compartiment stromal

Le stroma est principalement composé de trois types cellulaires : les cellules musculaires lisses, les myofibroblastes et les fibroblastes, qui expriment des protéines de la matrice extracellulaire (desmine,  $\alpha$ -actine, calponine, caldesmone, myosine, smootheline et dystrophine pour les cellules musculaires lisses ; procollagène-1 pour les myofibroblastes ; vimentine et laminine pour les fibroblastes) (Berry et al., 2008). Mais il comporte aussi des nerfs, des cellules endothéliales, et des cellules immunitaires infiltrées (lymphocytes et macrophages). Les cellules stromales jouent un rôle

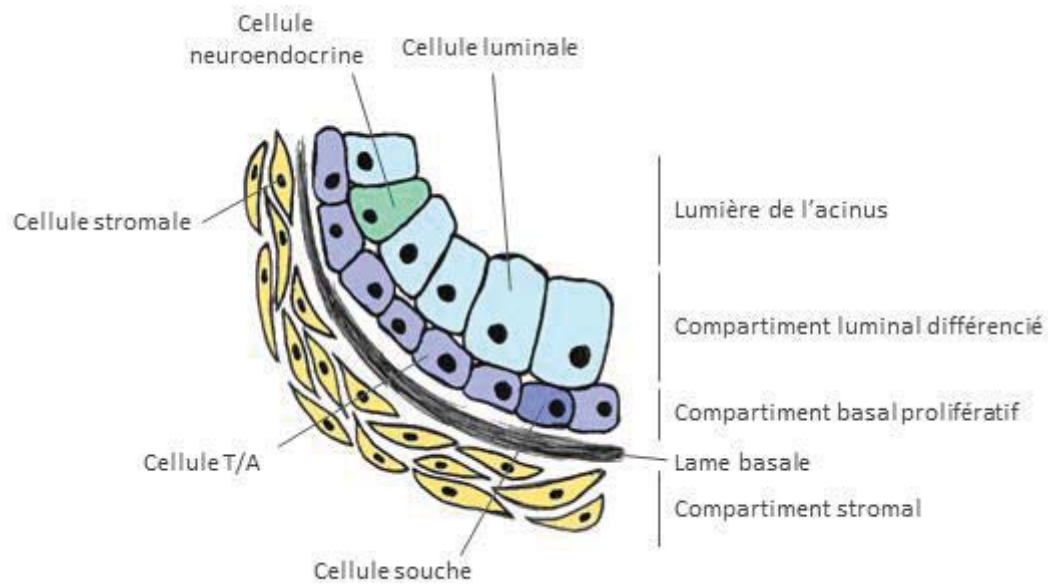


Figure 3 : Organisation de l'épithélium prostatique.

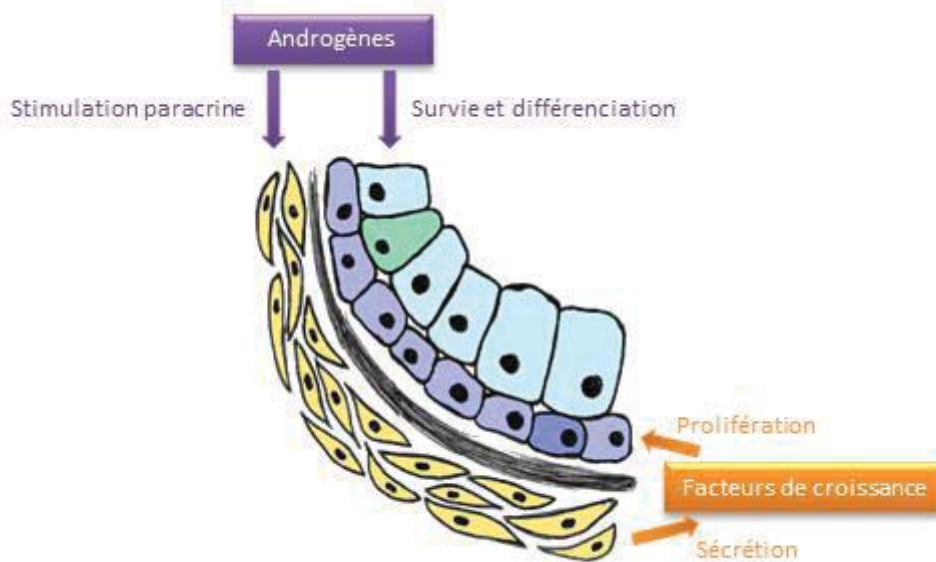


Figure 4 : Rôle des androgènes et des facteurs de croissance dans l'interaction entre stroma et épithélium.



important dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium de la prostate en sécrétant des facteurs de croissance, qui agissent de manière paracrine sur la prolifération des cellules basales ainsi que sur la survie et la différenciation des cellules luminales. En effet, les cellules stromales de type fibroblastique expriment les récepteurs stéroïdiens, notamment les formes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur aux œstrogènes (RE), et surtout le récepteur aux androgènes (RA). Elles expriment aussi l'enzyme 5 $\alpha$ -reductase, responsable de la conversion de la testostérone en un ligand plus efficace pour le récepteur aux androgènes : la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (DHT) (Berry et al., 2008). Ainsi, la testostérone circulante peut induire, dans les cellules stromales, la production de différents facteurs de croissance nécessaires au maintien de l'épithélium de la prostate (**voir Figure 4**), notamment le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), les FGF (Fibroblast growth factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), l'IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), et la cytokine IL-6 (Interleukine-6) (Berry et al., 2008; Cunha et al., 1987; Hayward et al., 1992; Kurita et al., 2001).

#### 2.1.1.2.2 Compartiment prolifératif

##### 2.1.1.2.2.1 Cellules souches

L'épithélium prostatique se développe à partir d'un petit contingent de cellules souches (Bonkhoff and Remberger, 1996; Bonkhoff et al., 1994a; Hudson et al., 2000; Isaacs and Coffey, 1989; Robinson et al., 1998; van Leenders et al., 2000). Chaque cellule souche a une capacité d'autorenouvellement infinie. Les cellules souches peuvent aussi se diviser pour fournir des cellules progénitrices capables de se différencier soit en cellules neuroendocrines (NE), soit en cellules intermédiaires : les cellules T/A (Transit-Amplifying cells) (Bonkhoff and Remberger, 1996; Bonkhoff et al., 1994a).

Les cellules souches sont caractérisées par l'expression de divers marqueurs, comme les intégrines  $\alpha_2\text{-}\beta_1$ , les kératines 5 et 14, le PSCA (Prostate Stem Cell Antigen), la protéine p63 de la famille de p53, le récepteur c-Met du HGF, et la protéine de survie Bcl-2, mais elles n'expriment pas le récepteur aux androgènes (**voir Figure 5**) (Collins et al., 2001; Gmyrek et al., 2001; Litvinov et al., 2003; McDonnell et al., 1992; Signoretti et al., 2000; Watabe et al., 2002). Chez la souris, les cellules souches ont pu être isolées *in vitro* grâce à des marqueurs de surface spécifiques, utilisables en cytométrie en flux : Sca-1 et CD49f (Lawson et al., 2007). Lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*, les cellules souches de prostate murine provenant du sinus urogénital, forment des colonies sphéroïdes en suspension (Shi et al., 2007; Xin et al., 2007). Ces structures, nommées prostate-sphères, subissent une spécification spontanée: les cellules de la couche périphérique ont une capacité d'auto-renouvellement importante (cellules souches), tandis que les cellules présentes dans la partie



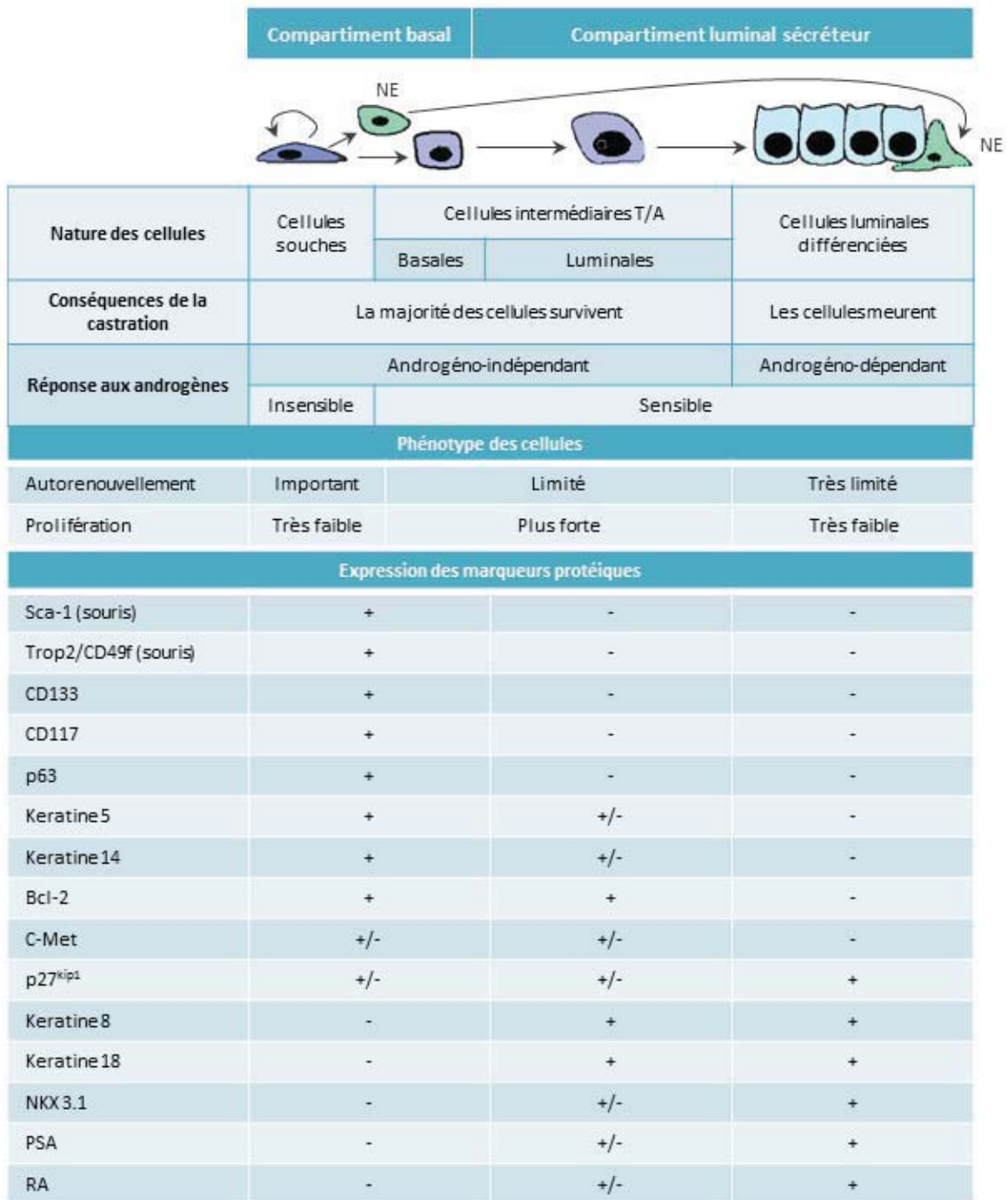


Figure d'après Litvinov et al., 2003

Figure 5 : Modèle hiérarchique de la différenciation de l'épithélium prostatique et profil d'expression de marqueurs protéiques spécifiques

centrale ont un phénotype plus différencié (cellules T/A) (Xin et al., 2007). Lorsqu'elles sont greffées sous les capsules rénales d'une souris adulte, les prostate-sphères régénèrent un organe entièrement différencié (Shi et al., 2007). De même, après transplantation sous la capsule rénale, chez la souris, une seule cellule souche, définie par le phénotype suivant : Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup>, et accompagnée de cellules stromales du mésenchyme urogénital, suffit à régénérer une prostate entière (Leong et al., 2008).

#### 2.1.1.2.2.2 Cellules T/A

Les cellules T/A (Transit-Amplifying) sont des progéniteurs monopotents ayant une capacité d'autorenouvellement réduite, mais une capacité proliférative importante. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de divers marqueurs, comme les kératines 5, 8 et 18, et la protéine de survie Bcl-2, mais elles n'expriment le récepteur aux androgènes qu'à de très faibles niveaux (**voir Figure 5**) (Bonkhoff et al., 1998; Bonkhoff et al., 1994b; Litvinov et al., 2003). Cependant, la DHT, ligand du récepteur aux androgènes, a été décrite comme induisant la différenciation des cellules T/A en cellules luminales, dotées d'une fonction sécrétrice (Heer et al., 2007; Xin et al., 2007). Il faut noter que la survie et la prolifération des cellules T/A dépend des facteurs de croissance produits par les cellules stromales, en réponse à la testostérone (Cunha et al., 1987; Hayward et al., 1992; Kurita et al., 2001). Même s'il est indirect, le rôle que jouent les androgènes dans le maintien de la couche basale de la prostate est très important.

#### 2.1.1.2.3 Compartiment différencié

##### 2.1.1.2.3.1 Cellules neuroendocrines (NE)

Pendant l'expansion de l'épithélium prostatique, une minorité de cellules souches ou progénitrices se différencient en cellules neuroendocrines, qui se trouvent clairsemées au sein de l'épithélium prostatique. Ces cellules sécrètent divers neuro-peptides, comme la bombésine, la calcitonine, les peptides liés aux hormones parathyroïdiennes (PTH), et sont caractérisées par l'expression de la chromogranine A, la sérotonine et l'énolase spécifique des neurones (Bonkhoff, 1998; Litvinov et al., 2003; Rumpold et al., 2002). Il faut noter que les cellules neuroendocrines n'expriment pas le récepteur aux androgènes (Abrahamsson, 1996). Le rôle des cellules neuroendocrines dans l'épithélium prostatique est encore mal défini, mais il semble que les neuropeptides qu'elles sécrètent agissent de manière paracrine sur les cellules épithéliales afin d'activer diverses voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (Kung and Evans, 2009). Par ailleurs, la cytokine inflammatoire IL-6 (Interleukine-6), ainsi que son co-récepteur gp130 induisent la différenciation des cellules neuroendocrines (Palmer et al., 2005; Qiu et al., 1998).

#### 2.1.1.2.3.2 Cellules luminales

Les cellules T/A prolifèrent, puis se différencient en cellules luminales sécrétrices. Ces dernières constituent la population majoritaire dans l'épithélium de prostate. Les cellules luminales ont atteint le niveau de différenciation terminal, elles ne sont donc plus capables de proliférer. Ces cellules sécrétrices expriment le récepteur aux androgènes et p27<sup>Kip1</sup>, inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Bonkhoff et al., 1998; Bonkhoff et al., 1994b; De Marzo et al., 1998). Elles sont aussi caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques de la différenciation prostatique, comme l'antigène spécifique de la prostate (PSA), NKX3.1, la kallikreine-2 glandulaire, l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA), et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (voir Figure 5) (Jain et al., 2002; Joseph et al., 1997; Liu et al., 1997; Ornstein et al., 2001; Schuur et al., 1996). Les gènes codant pour ces marqueurs de différenciation sont des cibles de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes (Jain et al., 2002; Mitchell et al., 2000; Schuur et al., 1996; Watt et al., 2001; Zelivianski et al., 2002). En effet, les cellules luminales se différencient en réponse aux androgènes, elles vont ensuite pouvoir sécréter les protéines nécessaires à la survie des spermatozoïdes dans le col de l'utérus.

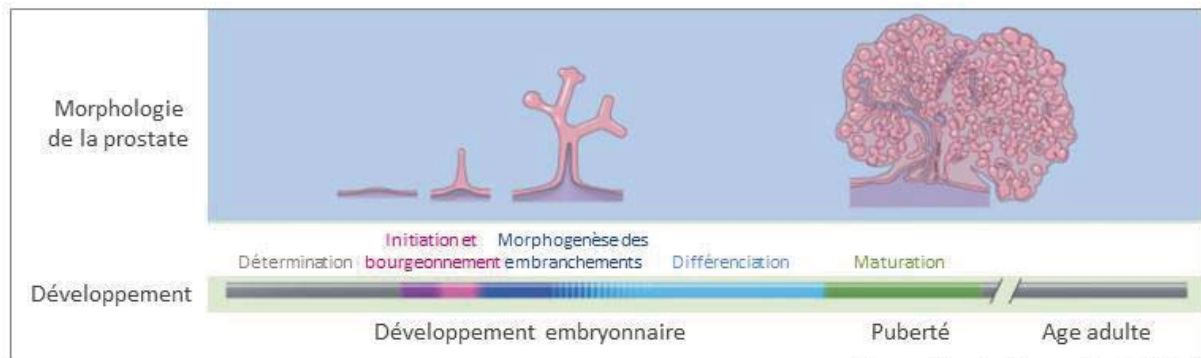


Figure d'après Prins and Putz 2008

Figure 6 : Schéma récapitulatif des étapes du développement de la prostate humaine.

## 2.1.2 Le développement de la prostate

Chez tous les mammifères, homme compris, la prostate se développe au niveau embryonnaire à partir du sinus urogénital (UGS), composé de tissu endodermique. Le sinus urogénital et le canal rectal dérivent respectivement des parties ventrale et dorsale du cloaque embryonnaire. Le sinus urogénital a un potentiel de développement mâle et femelle, il est notamment à l'origine de la vessie et de l'urètre, mais aussi de la partie basse du vagin chez la femme, et de la prostate et des glandes bulbo-urétrales chez l'homme. Les autres organes sexuels mâles se développent, quant à eux, à partir des canaux de Wolff, et ont une structure mésodermique (Prins and Putz, 2008). Le sinus urogénital endodermique est entouré d'un mésenchyme urogénital (UGM) qui joue un rôle dans sa différenciation sexuelle. Il exprime le récepteur aux androgènes dans les deux sexes et induit le développement des organes sexuels mâles uniquement en présence de testostérone (Cooke et al., 1991; Takeda et al., 1991).

### 2.1.2.1 Chez l'homme

Chez l'homme, le développement de la prostate a lieu au cours des second et troisième trimestres de gestation et se termine avant la naissance (Risbridger et al., 2005; Timms, 2008; Wang et al., 2001). Le développement de la prostate est un processus continu, mais peut être divisé en cinq étapes telles que la détermination, l'initiation, la mise en place des ramifications, la différenciation et la maturation (voir Figure 6) (Cunha et al., 2004; Prins and Putz, 2008).

#### 2.1.2.1.1 Détermination de l'UGS

La détermination de la prostate commence avec l'expression de molécules qui engagent une fraction des cellules du sinus urogénital vers un devenir de cellule prostatique. En effet, en réponse aux androgènes produits par les testicules embryonnaires dès la dixième semaine de gestation, des bourgeons épithéliaux émergent du sinus urogénital dans l'environnement mésenchymateux, en position caudale par rapport à la vessie (Kellokumpu-Lehtinen, 1989).

#### 2.1.2.1.2 Initiation du bourgeonnement

Initialement, 14 à 20 bourgeons épithéliaux se développent au sein de cinq groupes (un ventral et quatre dorsaux), puis croissent dans le mésoderme environnant. Ces cordons épithéliaux s'allongent, et lorsqu'ils atteignent les zones mésenchymateuses qui entourent le muscle lisse péri-urétral, des embranchements secondaires, puis tertiaires commencent à se mettre en place (Timms et al., 1994).

#### **2.1.2.1.3 Morphogenèse des ramifications**

Les ramifications se créent selon un modèle précis, au cours des stades plus avancés de la gestation. Leur morphogenèse est un processus conservé et hautement régulé par les conditions environnementales. Cela détermine la taille finale de la prostate, ainsi que l'organisation tridimensionnelle de ses canaux (Risbridger et al., 2005). La morphogenèse des ramifications s'accompagne de l'apparition de la lumière dans les canaux de la partie proximale (urètre) vers la partie distale (acinus) (Prins and Putz, 2008) (voir paragraphe 2.1.3.4.1.FGF (Fibroblast Growth Factor), page 28).

#### **2.1.2.1.4 Différenciation de l'épithélium**

Lorsque les ramifications sont établies, l'épithélium prostatique s'organise en deux couches fonctionnelles : la couche basale proliférative et la couche luminale différenciée. Puis, les cellules sécrétrices commencent à être fonctionnelles. Il faut noter que les régions les plus distales des canaux épithéliaux continuent de se ramifier et restent indifférenciées au stade embryonnaire.

#### **2.1.2.1.5 Maturation de la prostate**

Après la naissance, la prostate entre dans un stade quiescent. Au moment de la puberté, lorsque le niveau de testostérone augmente, la prostate quitte son état quiescent pour finir sa maturation. Les hormones mâles induisent une prolifération des cellules épithéliales, et la maturation terminale de la prostate. La taille de la glande augmente donc pendant la puberté, et atteint à l'âge adulte un phénotype sécréteur.

### **2.1.2.2 Chez les rongeurs**

Chez les rongeurs, la prostate est très rudimentaire à la naissance, elle va continuer à se développer au cours des 15 premiers jours de leur vie (Hayashi et al., 1991; Sugimura et al., 1986). Les bourgeons épithéliaux croissent dans le mésenchyme du sinus urogénital, afin d'établir les subdivisions antérieure, ventrale et dorso-latérale de la prostate en suivant leur propre profil de ramifications (Kinbara and Cunha, 1996; Marker et al., 2003; Price, 1963; Sugimura et al., 1986). Il faut noter que le lobe antérieur se développe en association avec les vésicules séminales à partir d'un mésenchyme commun (Cunha, 1972). Les modèles murin et humain diffèrent selon de nombreux aspects (organisation, anatomie, développement), mais ils ont le même type d'épithélium bistratifié (voir paragraphe 2.1.1.2. Structure, page 16).

Introduction

Il faut noter que les modèles d'étude disponibles en laboratoire sont d'origine humaine pour les lignées cellulaires utilisées *in vitro*, et murine pour les organismes servant aux recherches systémiques.

### 2.1.3 La signalisation dans le développement et l'homéostasie de la prostate

Le développement, le maintien et la fonction de l'épithélium de la prostate sont des mécanismes strictement régulés. Les hormones mâles (androgènes) jouent un rôle primordial dans ces processus, de même que d'autres molécules présentes dans le microenvironnement, comme les facteurs de croissance et les cytokines, sécrétés par les cellules du stroma, notamment les fibroblastes et les cellules immunitaires.

#### 2.1.3.1 Androgènes

Pendant la gestation, dès 8 semaines de développement, les cellules de Leydig apparaissent dans l'ébauche des testicules. A partir de ce moment-là, la sécrétion de testostérone commence (Chemes, 2001). Ce sont les hormones mâles qui, en agissant sur le mésenchyme urogénital, permettent l'engagement du sinus urogénital vers la différenciation en épithélium prostatique (voir paragraphe 2.1.2. Le développement de la prostate, page 23).

La testostérone joue aussi un rôle plus tardif dans le développement de l'épithélium prostatique, et dans son maintien, au cours de la vie adulte. Les hormones mâles arrivent au niveau de la prostate par les capillaires sanguins, puis diffusent à travers le stroma et la lame basale, pour pénétrer dans l'épithélium. Il faut noter que les cellules stromales et épithéliales expriment le récepteur aux androgènes (RA) (Berry et al., 2008; Litvinov et al., 2003). Lorsqu'elle pénètre dans ces cellules, la testostérone est convertie par la 5 $\alpha$ -reductase de type II en 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (DHT), ligand ayant une meilleure affinité pour le récepteur aux androgènes.

La survie des cellules épithéliales dépend de la présence de testostérone dans l'environnement. En effet, lorsque le niveau d'androgènes diminue de manière drastique, les cellules de l'épithélium de prostate entrent en apoptose (Colombel et al., 1992). De même, chez les rongeurs, la castration induit une importante involution de la prostate, due à l'apoptose des cellules épithéliales. Cependant, lorsque le niveau des androgènes circulants est rétabli par traitement, la prostate se régénère complètement à partir d'un petit contingent de cellules souches (Nishi et al., 1996; Tsujimura et al., 2002). Il faut noter que les cellules souches survivent en absence de testostérone, même si elles n'expriment pas le récepteur aux androgènes. Néanmoins, cela soulève la question de savoir comment elles sont informées de la présence d'androgènes dans l'environnement, afin d'initier la régénération de la prostate. C'est dans ce contexte, que les cellules stromales présentes de l'autre côté de la lame basale ont un rôle à jouer. En effet, la testostérone induit, dans les cellules stromales, la production de divers facteurs de croissance nécessaires au développement et au



maintien de l'épithélium prostatique (Berry et al., 2008) (voir Figure 4, page 17) (voir paragraphe 2.1.1.2.1. Compartiment stromal, page 16 et paragraphe 2.1.3.4. Autres cytokines, page 28).

### 2.1.3.2 EGF (Epidermal Growth Factor)

L'Epidermal Growth Factor (EGF) a été identifié en 1962 par Stanley Cohen comme une protéine extraite des glandes salivaires murines et capable d'accélérer l'apparition des incisives et l'ouverture des paupières à la naissance (Cohen, 1962). Cette substance active a ensuite été décrite comme stimulant la prolifération des cellules épithéliales de nature épidermique, c'est pourquoi elle a été nommée EGF (Cohen, 1965). En 1975, des sites de liaison de l'EGF ont été mis en évidence à la surface des fibroblastes (Carpenter et al., 1975). Finalement, le récepteur à l'EGF (EGF-R) a été identifié dans la lignée cellulaire A431 dérivée d'un carcinome épidermique, comme une protéine membranaire de 170 kDa, phosphorylée suite à un traitement par l'EGF (Carpenter et al., 1978).

L'expression de l'EGF influence le développement des bourgeons prostatiques à partir du sinus urogénital. En effet, l'étude du développement de la prostate chez des souris dans lesquelles le gène codant pour l'EGF a été inactivé (*EGF<sup>-/-</sup>*), montre une réduction de la formation des bourgeons antérieurs, dorsaux et latéraux, indiquant un rôle important de l'EGF dans le développement de la prostate (Abbott et al., 2003). Réciproquement, des injections quotidiennes d'EGF à des rats pendant les huit semaines suivant leur naissance induit une augmentation de 50% du poids des lobes ventraux de leur prostate, tandis que les lobes dorsaux, les vésicules séminales et les glandes de coagulation ne semblent pas être affectés par ce traitement (Torrington et al., 2001). Au contraire, une inhibition de l'activité kinase du récepteur à l'EGF par le PKI-166 réduit d'environ 35% le développement de la prostate et des vésicules séminales chez le rat. Ce retard de développement est réduit par l'administration d'androgènes (Mellinghoff et al., 2004).

Chez l'homme, l'EGF est exprimé par les cellules épithéliales de la couche basale lors du développement embryonnaire de la prostate (Leav et al., 1998). A l'âge adulte, l'EGF ainsi que son récepteur sont exprimés par ces mêmes cellules de la couche basale (De Miguel et al., 1999), suggérant l'existence d'une boucle autocrine d'activation de la voie de l'EGF. De plus, l'EGF fait partie de la cohorte de facteurs de croissance sécrétés par les cellules stromales en réponse à une stimulation par les androgènes (Berry et al., 2008).

L'ensemble de ces données indique que l'EGF joue un rôle essentiel, non seulement dans le développement de l'épithélium prostatique, mais aussi dans son maintien, notamment en favorisant la prolifération des cellules progénitrices de la couche basale.

### 2.1.3.3 IL-6 (Interleukine-6)

L'IL-6 est une cytokine inflammatoire qui a été identifiée pour sa capacité à stimuler la production d'anticorps par les lymphocytes B. Elle est libérée par les cellules immunitaires lorsqu'un organe est en souffrance. L'inflammation se définit en effet comme l'ensemble des mécanismes de défense d'un organisme contre une agression. Ce phénomène est commun dans la prostate humaine, car elle est la cible de nombreuses infections virales et bactériennes pouvant causer une inflammation. De même, certaines substances chimiques provenant de la viande grillée, comme la 2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine, sont soupçonnées d'initier l'inflammation dans la prostate (Elkhwaji et al., 2007; Krieger et al., 2000; Nakai et al., 2007).

Lors d'une inflammation, les cellules du système immunitaire infiltrées dans le stroma prostatique, produisent diverses substances cytotoxiques ou mutagènes, ainsi que des cytokines inflammatoires, parmi lesquelles l'IL-6 (De Marzo et al., 2007). L'IL-6 qui ne semble pas avoir de rôle déterminé dans le développement de la prostate, est essentielle au maintien de l'intégrité de son épithélium en cas d'inflammation. En effet, l'IL-6 qui agit via son récepteur initie des voies de signalisation nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules épithéliales (voir paragraphe 2.2. Aspects moléculaires de la signalisation, page 33).

### 2.1.3.4 Autres cytokines

Divers autres facteurs de croissance sont libérés par les cellules stromales suite à une stimulation par les androgènes provenant des testicules, via le système vasculaire. Ces molécules jouent un rôle dans le développement ou le maintien de l'épithélium prostatique (Berry et al., 2008).

#### 2.1.3.4.1 FGF (Fibroblast Growth Factor)

Les différents membres de la famille des FGF sont codés par 22 gènes différents, composés de trois exons et partageant une grande homologie de séquence. Les FGF jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation, la migration, la survie et l'apoptose (Lin and Wang, 2010; Ornitz and Itoh, 2001; Raman et al., 2003). Les cellules stromales expriment les protéines FGF-2, -8, -9, -10 et le KGF/FGF-7 (Keratinocyte Growth Factor) (Berry et al., 2008; Kwabi-Addo et al., 2004). Les FGF ont une forte affinité pour l'héparine et pour les glycosaminoglycanes (GAG) qui leur permettent d'interagir avec leurs récepteurs membranaires (FGFR) dotés d'une activité tyrosine kinase intrinsèque (Uematsu et al., 2000). Ces récepteurs sont codés par quatre gènes hautement conservés qui définissent quatre récepteurs au FGF (FGFR1 à 4), ainsi que de nombreux variants d'épissage, dont les spécificités varient en fonction des membres de la famille FGF. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules

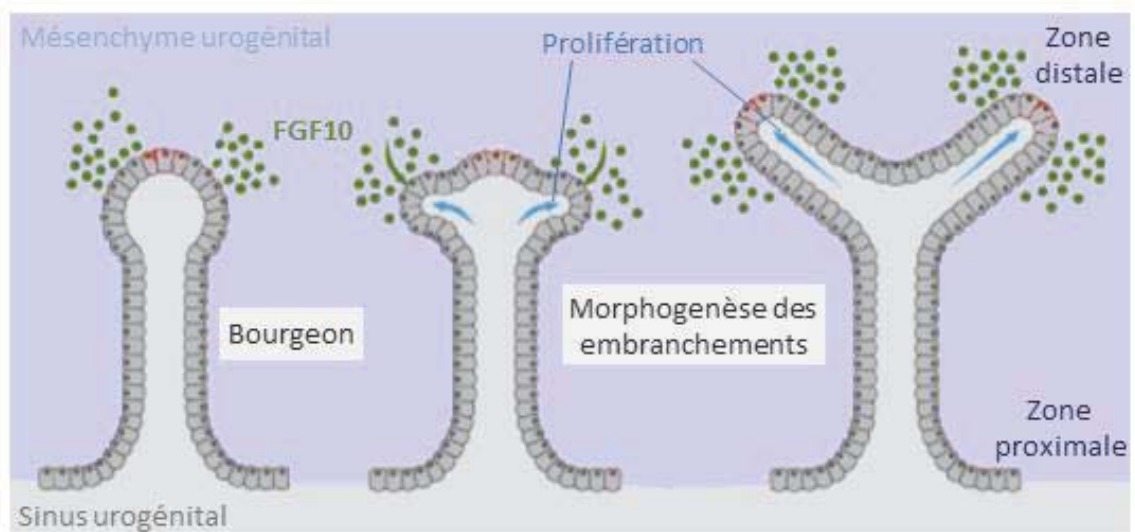


Figure d'après Prins and Putz 2008

**Figure 7 : Rôle du FGF10 dans la morphogénèse des ramifications.**

Au cours de la morphogénèse des ramifications (voir p.24), le FGF10 se concentre au niveau des régions distales des bourgeons dans le mésenchyme urogénital. Il favorise la prolifération des cellules épithéliales, permettant ainsi la ramification, puis l'élongation des canaux.

épithéliales : les cellules basales expriment FGFR-1 et -2, tandis que les cellules luminales expriment FGFR-4, le FGFR-3 étant présent à la surface de toutes les cellules épithéliales (Berry et al., 2008; Kwabi-Addo et al., 2004). Ce profil d'expression suggère l'existence d'une interaction entre le stroma et l'épithélium par l'intermédiaire de sécrétions paracrines.

L'étude du développement de la prostate a montré que le FGF-10 joue un rôle critique dans l'initiation et la croissance orientée des canaux lors de la morphogenèse des embranchements. En effet, l'expression du FGF-10 est restreinte aux régions distales des zones glandulaires, et agit comme un chimio-attractant pour l'élongation et la ramification des canaux en stimulant la prolifération des cellules épithéliales (Donjacour et al., 2003; Lu et al., 1999; Thomson and Cunha, 1999). Aux stades précoces du bourgeonnement et de l'élongation des canaux, le patron d'expression du FGF-10 dans le mésenchyme est plutôt indéfini, puis il se concentre aux extrémités des canaux pendant la morphogenèse des ramifications (voir Figure 7) (Huang et al., 2005; Prins and Putz, 2008). Il faut noter que le variant d'épissage du récepteur FGFR-2 : le FGFR-IIIb qui est spécifique de FGF-7 et FGF-10 a le même profil d'expression que le FGF-10 (Finch et al., 1995; Huang et al., 2005). Des études basées sur des modèles murins de mutants nuls pour *Fgf-10* ont montré que le ligand seul ne suffit pas à induire la morphogenèse des embranchements tandis qu'un ajout de testostérone au FGF-10 permet de la restaurer (Donjacour et al., 2003). Cela implique une interaction entre le FGF-10 et le produit d'un gène cible du récepteur aux androgènes. Par ailleurs, la voie des MAP kinases ERK1/2 est essentielle à l'induction des bourgeonnements et à l'élongation des canaux par le FGF-10. Par ailleurs, la testostérone favorise l'expression du FGF-10 et du récepteur FGFR-2IIIb, suggérant une action synergique des androgènes et de FGF-10 pour permettre le développement de la prostate (Kuslak and Marker, 2007; Pu et al., 2007).

#### 2.1.3.4.2 TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ )

Il existe trois isoformes de TGF- $\beta$  dont le signal est nécessaire à la morphogenèse de la prostate (Timme et al., 1995). Le TGF- $\beta$ 1 est présent dans les cellules du mésenchyme urogénital (Li et al., 2009). Les TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 sont exprimés par les cellules de l'épithélium (Chang et al., 1999; Timme et al., 1994). Leurs récepteurs TGF- $\beta$ RI et le TGF- $\beta$ RII sont exprimés à la surface des cellules stromales et épithéliales au cours du développement de la prostate (Chang et al., 1999). Le TGF- $\beta$  se lie à son récepteur TGF- $\beta$ RII qui s'hétérodimérise avec le TGF- $\beta$ RI, activant leur activité Sérine/Thréonine kinase, ce qui déclenche des cascades de signalisation qui stimulent des effecteurs cytoplasmiques comme les Smads, capables de réguler l'expression de gènes cibles.

Certaines études ont montré que l'ajout de TGF- $\beta$  exogène inhibe la croissance et la morphogénèse des ramifications induites par la testostérone (Itoh et al., 1998; Tanji et al., 1994; Tomlinson et al., 2004). Le TGF- $\beta$  peut en effet inhiber la prolifération cellulaire, en réprimant d'une part l'expression du gène c-myc, et d'autre part l'activité des kinases cycline-dépendantes (CDK) (Derynck et al., 2001; Massague et al., 2000; Massague and Wotton, 2000). De plus le TGF- $\beta$  peut induire l'expression de p21<sup>cip1/waf1</sup> qui engage les cellules épithéliales vers la différenciation terminale, et par conséquent, limite leur prolifération (Chang et al., 1999).

La nature de l'action du TGF- $\beta$  varie le long de l'axe proximal-distal. En effet, au niveau de la région la plus proche de l'urètre, le TGF- $\beta$  réduit la prolifération des cellules épithéliales et stromales. Au contraire, le TGF- $\beta$  stimule la croissance des cellules épithéliales présentes au niveau des extrémités distales, qui sont les plus récentes, donc les moins différenciées (Micke and Ostman, 2004; Tomlinson et al., 2004).

Le TGF- $\beta$  agit aussi sur la morphogénèse de la prostate en favorisant l'expression de protéines de la matrice extracellulaire (Collagène, Fibronectine, Protéoglycanes, Intégrines) impliquées dans la régulation de l'adhésion et de la mobilité des cellules (Festuccia et al., 1999; Kostenuik et al., 1997). Il induit aussi la différenciation des fibroblastes du stroma en myofibroblastes (Chung et al., 2003).

De plus, le TGF- $\beta$  est capable d'agir en corrélation avec d'autres molécules importantes pour le développement ou le maintien de l'épithélium prostatique. Il induit en effet la redistribution du récepteur aux androgènes du noyau vers le cytoplasme, afin de réduire son action dans les cellules musculaires lisses du stroma (Gerdes et al., 1998). De plus, il réprime l'expression du FGF-10, ce qui peut contribuer à son effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (Tomlinson et al., 2004).

#### **2.1.3.4.3 IGF (Insulin-like Growth Factor)**

L'IGF (Insulin-like Growth Factor) est un facteur de croissance dont la structure est proche de celle de l'insuline. L'IGF induit divers processus cellulaires, comme la prolifération et la différenciation.

Deux types d'IGF ont été identifiés : IGF-1 et IGF-2. Ils agissent sur les cellules par l'intermédiaire de leurs récepteurs (IGF-R1 et IGF-R2) et d'une famille de protéines de liaison (IGF-BP-1, 2, 3, 4, 5 et 6) (Baserga et al., 2003; Pollak et al., 2004).

Dans le contexte de la prostate, l'IGF est produit par les cellules stromales, et son récepteur IGF-R1 est présent à la surface des cellules épithéliales basales et luminales (Ohlson et al., 2007). Ce profil d'expression suggère un mode d'action paracrine de l'IGF. Ainsi, l'IGF régule à la fois la croissance et

la différenciation de l'épithélium prostatique (Boudon et al., 1996; Cohen et al., 1991; Fiorelli et al., 1991; Kimura et al., 1996; Pietrzkowski et al., 1993).

De plus, la fonction de l'IGF dans l'épithélium est très contrôlée : les androgènes régulent négativement l'expression de l'IGF-R2 dans les tissus prostatiques non tumoraux (Fiorelli et al., 1991). Réciproquement, l'IGF régule positivement l'expression des gènes cibles du récepteur aux androgènes dans les lignées cellulaires cancéreuses (Culig et al., 1994).

#### **2.1.3.4.4 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**

Le gène *vegfa* est organisé en huit exons séparés par sept introns, et son épissage permet la synthèse de diverses isoformes (VEGF<sub>121</sub>, EGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>). Ces différentes formes du VEGF, favorisent l'angiogenèse, donc l'irrigation des organes en contexte normal (Ferrara et al., 2003). Au cours du développement, la croissance de l'épithélium prostatique induite par les androgènes est précédée d'une hausse de la synthèse du VEGF associée à l'augmentation de la prolifération des cellules endothéliales, et à un renforcement du flux sanguin (Franck-Lissbrant et al., 1998; Joseph et al., 1997). La signalisation induite par le VEGF est impliquée dans la régulation de l'embryogenèse, la prolifération, la différenciation, ainsi que le remodelage tissulaire et la cicatrisation (Folkman, 1971). Le VEGF agit sur la cellule via son récepteur à activité tyrosine kinase divisé en trois sous-types : VEGFR-1 (ou Flt-1), VEGFR-2 (ou KDR) et VEGFR-3 (ou Flt-4). Ces récepteurs comportent un domaine immunoglobuline extracellulaire et un domaine tyrosine kinase cytoplasmique (Bergers and Benjamin, 2003; Ferrara et al., 2003; Risau, 1997). Ainsi au cours de son développement, la prostate ne manque pas d'oxygène ou de facteurs circulants.

## 2.2 Aspects moléculaires de la signalisation

### 2.2.1 Les Androgènes

Les androgènes sont les hormones sexuelles mâles dont le principal représentant est la testostérone, ils définissent aussi le produit de réduction de la testostérone : la dihydrotestostérone (DHT) (Gao et al., 2005). Les androgènes, comme toutes les hormones stéroïdiennes, dérivent du cholestérol. Ils sont produits au niveau des testicules, avant d'atteindre l'ensemble de l'organisme par l'intermédiaire de la circulation sanguine. Les androgènes sont responsables du développement des organes sexuels secondaires, comme la prostate.

#### 2.2.1.1 Récepteur aux androgènes

Le récepteur aux androgènes fait partie de la famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes qui comporte les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR), aux glucocorticoïdes (GR), aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR). Cette super-famille des récepteurs nucléaires comporte par ailleurs les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, à l'acide rétinoïque, ou à la vitamine D. Le récepteur aux androgènes a une activité de facteur de transcription, uniquement en présence de son ligand (Bennett et al., 2010).

##### 2.2.1.1.1 Profil d'expression

Le récepteur aux androgènes, comme son ligand, est essentiel au développement de l'épithélium de prostate. Il est exprimé dans le mésenchyme urogénital et permet la détermination du sinus urogénital (voir paragraphe 2.1.2. Le développement de la prostate, page 23).

Au sein de l'épithélium prostatique, le récepteur aux androgènes joue un rôle indirect dans la prolifération des cellules de la couche basale, et direct dans la différenciation des cellules T/A. Les cellules souches n'expriment pas le récepteur aux androgènes, cependant les cellules T/A expriment des doses croissantes de RA au cours de leur différenciation. Finalement, le récepteur aux androgènes est au niveau le plus haut dans les cellules luminales ayant une activité sécrétrice (**voir Figure 5, page 19**) (Heer et al., 2007; Litvinov et al., 2003). Les cellules stromales expriment elles aussi le récepteur aux androgènes et répondent à une stimulation hormonale par la sécrétion de facteurs de croissance à destination des couches basales de l'épithélium, permettant la survie et la prolifération de ces cellules, par ailleurs insensibles aux androgènes (**voir Figure 4, page 17**) (Litvinov et al., 2006).

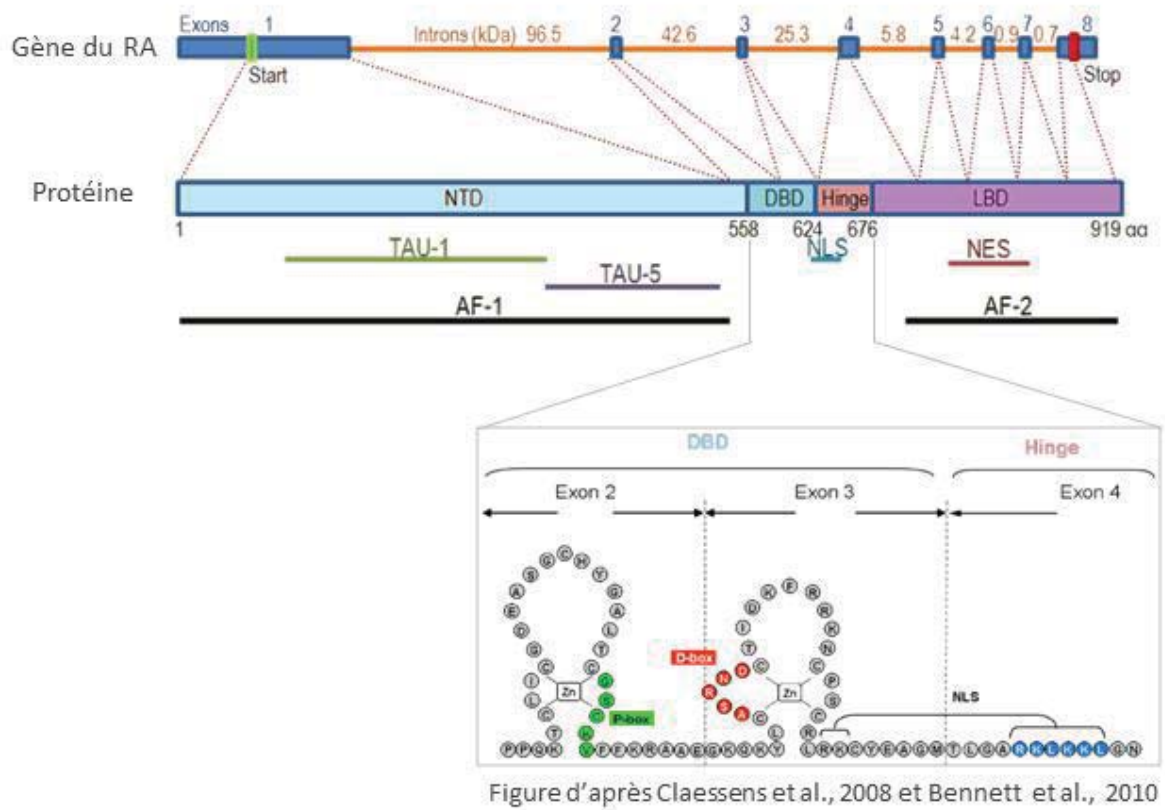


Figure d'après Claessens et al., 2008 et Bennett et al., 2010

Figure 8 : Structure du gène et de la protéine du récepteur aux androgènes.



### 2.2.1.1.2 Structure du gène et de la protéine

Chez l'homme, le gène du récepteur aux androgènes est localisé sur le chromosome X (q11-12). Il comporte 8 exons qui produisent un ARNm d'une longueur de 2760 nucléotides. La protéine qu'il génère a une longueur de 920 acides aminés et est composée de 4 domaines structurellement et fonctionnellement distincts (voir Figure 8).

#### 2.2.1.1.2.1 Le domaine NTD

Le domaine amino-terminal (AF1) présent entre les résidus 1 et 558 est responsable de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes, notamment par l'intermédiaire de deux motifs : Tau-1 (Transcription Activation Unit), entre les résidus 173 et 203, et Tau-5 entre les résidus 360 et 528. Ces motifs permettent l'interaction du récepteur aux androgènes avec les co-régulateurs de la transcription, aussi bien les co-activateurs que les co-répresseurs (Claessens et al., 2008). Le motif Tau-5 a été décrit comme un domaine d'activation autonome en interagissant avec le domaine riche en glutamine du co-activateur SRC/p160 (Christiaens et al., 2002). Une mutation sur Tau-1 ou sur Tau-5 rend le récepteur aux androgènes complètement inactif (Callewaert et al., 2006), démontrant que ces deux motifs sont nécessaires à l'activité transcriptionnelle du RA.

#### 2.2.1.1.2.2 Le domaine DBD

Le domaine de liaison à l'ADN du récepteur aux androgènes fait environ 80 acides aminés de long et est organisé en deux doigts de zinc codés respectivement par les exons 2 et 3 du gène. Cette structure est très conservée entre les membres de la super famille des récepteurs stéroïdiens nucléaires de type I. Ces récepteurs se fixent sur le même élément de réponse aux hormones (HRE) composé de répétitions inversées de deux sites de liaison hexamériques de type 5'-TGTTCT-3' séparés par trois nucléotides (Cato et al., 1987). Cependant, la spécificité de liaison du récepteur aux androgènes sur son ARE (Androgen Response Element) est due à deux séries de 5 acides aminés dont la séquence lui est propre, et qui sont présentes sur chacune des structures en doigt de zinc : la P-box sur le premier et la D-box sur le second (Umesono and Evans, 1989).

#### 2.2.1.1.2.3 La région Hinge

La région hinge, codée par l'exon 4 du gène du récepteur aux androgènes, sépare la dernière hélice- $\alpha$  du domaine de liaison à l'ADN et la première hélice- $\alpha$  du domaine de liaison du ligand (LDB). Cette région est assez peu conservée, mais comporte un signal de localisation nucléaire (NLS) (<sup>617</sup>RKCYEAGMTLGARKLKKL<sup>634</sup>) (Zhou et al., 1994). En position C-terminale par rapport à la région NLS : entre les résidus 639 à 657, se trouve une séquence de dégradation putative de type PEST

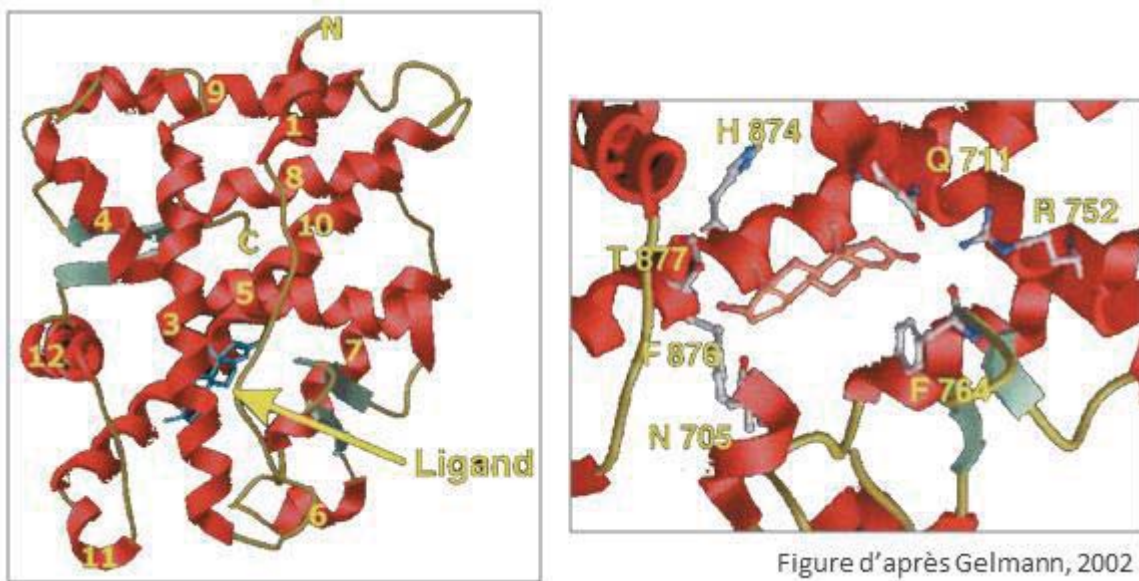


Figure 9 : Structure tridimensionnelle du domaine LBD du récepteur aux androgènes.

Cristallographie du domaine LBD du récepteur aux androgènes en présence de son ligand (à gauche). La figure de droite représente une vue plus détaillée de la même zone avec les résidus impliqués dans la liaison du récepteur au ligand.

(Sheflin et al., 2000), mais elle ne semble pas influencer la stabilité du récepteur aux androgènes (Haelens et al., 2007). Au sein de cette séquence, se trouve un résidu Sérine à la position 650, qui peut être phosphorylé par les MAP kinases JNK et p38, et semble être impliqué dans la régulation de la translocation du récepteur aux androgènes dans le noyau (Gioeli et al., 2006).

#### 2.2.1.1.2.4 Le domaine LBD

Le domaine de liaison au ligand du récepteur aux androgènes est organisé en un empilement de douze hélices- $\alpha$  autour d'une cavité centrale occupée par les androgènes. Dix-huit résidus présents sur les hélices 3, 5 et 11 entrent directement en contact avec le ligand (**voir Figure 9**) (Gelman, 2002; Matias et al., 2000; Sack et al., 2001). Cependant, la variété des mutations observées chez les patients montrant une insensibilité aux androgènes indique que plus qu'un motif particulier, c'est l'intégrité du domaine de liaison au ligand qui est nécessaire à l'activation du récepteur aux androgènes. En effet, la liaison du ligand implique un changement de conformation : l'hélice 12 se repositionne de manière à fermer la cavité dans laquelle se trouve le ligand, de plus, cela permet la formation d'un sillon hydrophobe (Heery et al., 1997) à la surface du LBD (Moras and Gronemeyer, 1998). Ce sillon est reconnu par divers co-activateurs du récepteur aux androgènes, ce qui favorise son activité transcriptionnelle (Heery et al., 1997). De plus, le sillon hydrophobe du LBD est entouré de deux résidus chargés : Lys720 et Glu897 qui peuvent entrer en contact avec le motif <sup>23</sup>FQNL<sup>27</sup> du domaine N-terminal du récepteur aux androgènes (Dubbink et al., 2004). Dans cette conformation, le signal NES (Nuclear Export Sequence) présent entre les résidus 742 et 817 est inaccessible, et le signal NLS (Nuclear Localization Sequence) de la région Hinge permet d'adresser le récepteur aux androgènes vers le noyau. Cependant, lorsque le ligand se détache du récepteur, le signal NES est dominant, ce qui explique la localisation cytoplasmique du récepteur aux androgènes inactif (Heinlein and Chang, 2002).

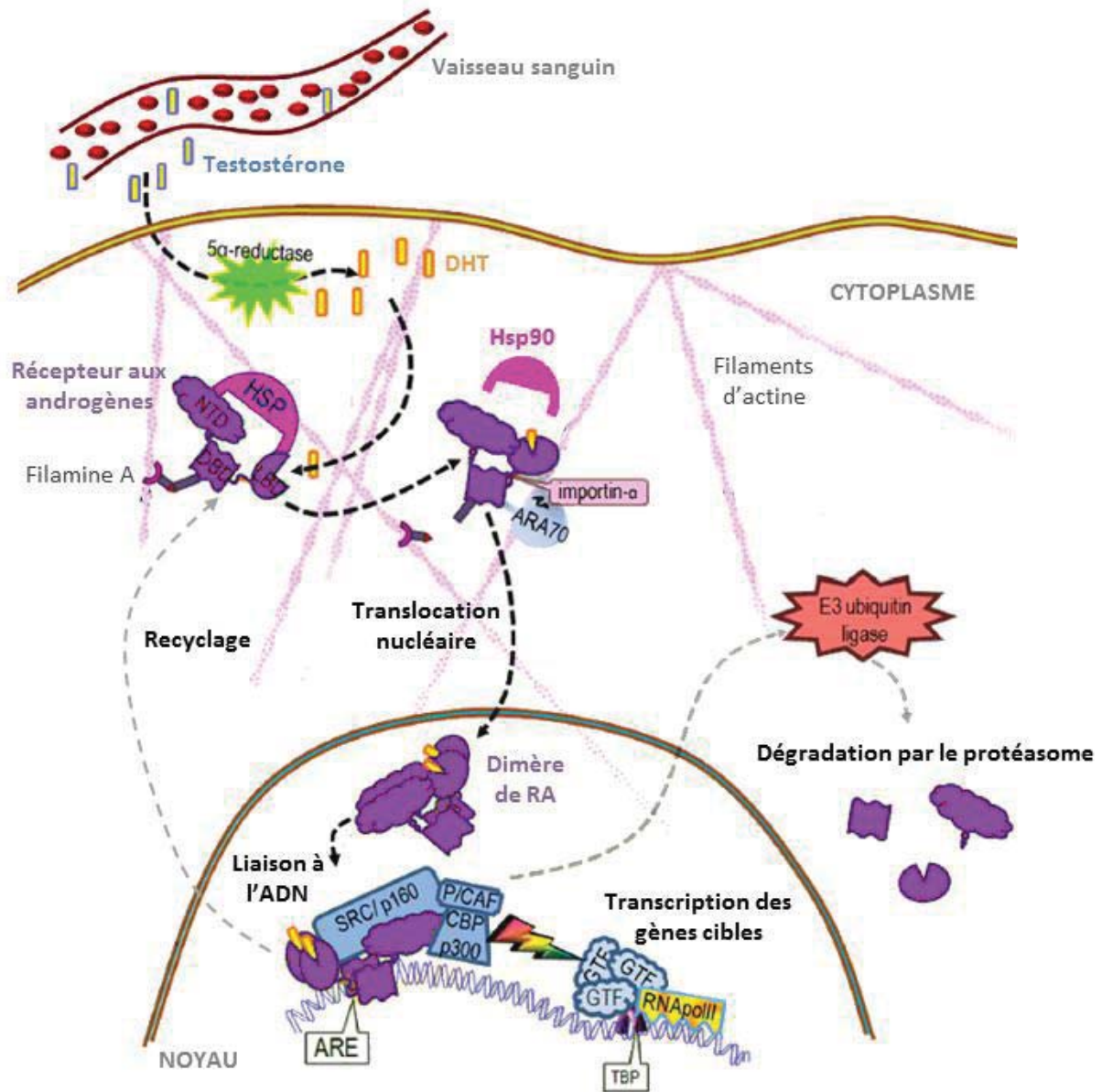


Figure d'après Bennett et al., 2010

Figure 10 : Signalisation du récepteur aux androgènes.

La testosterone pénètre dans la cellule où elle est réduite en DHT par la 5α-Réductase. La fixation de la DHT sur le récepteur aux androgènes induit un changement de conformation qui le libère de l'emprise des protéines chaperonnes. Ainsi, le RA peut migrer dans le noyau où il se dimérise avant de se fixer sur le motif ARE du promoteur de ses gènes cibles afin d'induire leur transcription.

### 2.2.1.2 Signalisation du récepteur aux androgènes

Le récepteur aux androgènes se trouve dans le cytoplasme, et ne pénètre dans le noyau qu'en présence de son ligand. Dans le noyau, le récepteur aux androgènes, associé à ses différents co-régulateurs, se fixe à l'ADN sur la séquence ARE, et permet la transcription de ses gènes cibles (voir Figure 10).

#### 2.2.1.2.1 Activation canonique du récepteur aux androgènes

En absence de son ligand, la séquence NLS du récepteur aux androgènes est inaccessible, donc le RA est cytoplasmique. Il est alors associé avec des protéines de choc thermique (HSP) (He et al., 1999; He et al., 2000; Loy et al., 2003), des protéines du cytosquelette (Veldscholte et al., 1992b) et d'autres protéines chaperonnes (Loy et al., 2003; Ozanne et al., 2000). Ces protéines peuvent relier le récepteur aux androgènes au cytosquelette, notamment via la Filamine. Ces interactions avec des protéines chaperonnes et avec le cytosquelette peuvent moduler la conformation du récepteur aux androgènes, donc favoriser une liaison efficace du ligand (Cardozo et al., 2003; Shatkina et al., 2003).

La testostérone est réduite en dihydrotestostérone (DHT) par la 5 $\alpha$ -reductase lorsqu'elle pénètre dans la cellule. La DHT est un ligand très efficace du récepteur aux androgènes; elle induit un changement de conformation des hélices  $\alpha$  3, 4 et 12 du LBD pour former le domaine fonctionnel AF-2 (Activation Function-2). Le domaine AF-2 interagit avec le motif <sup>23</sup>FQNLF<sup>27</sup> du domaine AF-1 en position N-terminale, qui est responsable de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes (He et al., 1999; He et al., 2002a; Liao et al., 2003; Schaufele et al., 2005). Ce changement de conformation permet au RA de se dissocier des protéines de choc thermique afin de pouvoir interagir avec des co-régulateurs comme ARA70 (Androgen-Receptor Associated Protein-70), ou l'Importine- $\alpha$ , qui sont responsables de la translocation du RA vers le noyau (Cutress et al., 2008; He et al., 2002a; Loy et al., 2003; Ozanne et al., 2000; Rahman et al., 2004; Schaufele et al., 2005).

#### 2.2.1.2.2 Transactivation du récepteur aux androgènes

Alternativement, le récepteur aux androgènes peut être phosphorylé par des kinases activées notamment par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), ou les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR); cela lui permet d'être actif en absence d'androgènes (voir paragraphe 2.4. Emergence de connexions entre les voies de signalisation, page 79) (Cao et al., 2006; Manin et al., 2002; Scheid and Woodgett, 2001; Yeh et al., 1999).

Il faut noter que l'activité du récepteur aux androgènes est régulée par des phosphorylations sur des résidus Sérine en présence et en absence de ligand (Gioeli et al., 2002). La fixation du ligand permet

## Introduction

nom du co-régulateur	Rôle du régulateur		Domaines du RA impliqués dans l'interaction			
	Activateur	Répresseur	NTD	DBD	Hinge	LBD
AES						
Akt		•				
ANPK	•			•	•	
ARA67/PAT1		•	•	•		•
ARA160	•		•	•		•
ARA24/RAN	•		•			
ARA267- $\alpha$	•			•		•
ARA54	•					•
ARA55	•					•
ARA70 (RFG, ELE1)	•		•			
ARIP3/PIAS $\alpha$	•	•		•		
ARIP4	•			•	•	
ARR19		•		•		
BAG-1L	•					
BRCA1	•		•			
c-Jun	•	•		•	•	
Calreticulin		•		•		
Caveolin-1	•		•			•
CBP	•		•			•
Cyclin D1		•	•	•		•
Cyclin E	•		•			
DAX-1		•				•
DJBP		•		•		
E6-AP	•					•?
ERM		•	•	•		•
FlnA		•			•	
F-SRC-1	•					•
FHL2	•		•			•
Gelsolin	•					•
GSK3 $\beta$		•	•			
GT198	•			•		
HBO1		•		•		•
HDAC1		•		•		•
HMG-1 and 2	•					
hsp40 (dnaJ, ydj1p)	•					•
hRad9		•				•
mZac1b	•	•				•
NCoR		•				•
P/CAF	•					
p53		•				
PAK6		•		•		•
PATZ		•				
PDEF	•			•		
PGC-1 (LEM6)	•					
PIAS1	•	•		•		
PIAS3	•	•	•			
PIASy		•		•		
PNRC	•	•				•
PRMT/CARM1	•					
PTEN		•		•		
RACK1		•				•
RAF (IDE)	•		•	•		
RB	•		•	•		
ReIA		•		•		
RIP140	•					•
SHP		•	•			•
Smad3	•	•				
Smad4		•		•		•
SMRT		•	•			•
SNURF (RNR4)	•			•	•	
SRA	•					
SRC-1 (NCoA-1)	•		•			•
SRC-3 (Rac3, ACTR, AIB1, p/CIP, TRAM1)	•					
SRY		•		•		
Supervillin	•		•			•
TFIIH, CAK	•		•			
TGIF		•		•		
TIF2 (GRIP1, NCoA-2, SRC-2)	•		•	•		•
Tip60	•				•	•
TR4		•	•	•		•
TRAM1/RAC3	•		•	•		•
Ubc9	•			•	•	
Zac-1	•					•

Tableau d'après Bennett et al., 2010

Figure 11 : Les co-régulateurs du récepteur aux androgènes : rôle dans la transcription et interaction avec le récepteur.

notamment au récepteur aux androgènes de recruter des kinases capables de le phosphoryler sur les Sérines 80, 93 et 641 supposées le protéger de la dégradation (Blok et al., 1998). Par ailleurs, les MAP kinases ERK, p38 et JNK, et la kinase Akt sont capables de phosphoryler le récepteur aux androgènes sur les résidus Sérine 213, 506 et 650 afin d'augmenter sa sensibilité à de faibles doses d'androgènes ou de recruter les co-activateurs nucléaires nécessaires au remodelage de la chromatine (Rochette-Egly, 2003).

#### **2.2.1.2.3 Signalisation génomique**

Lorsqu'il pénètre dans le noyau, le récepteur aux androgènes se dimérise et ses co-activateurs facilitent la liaison du domaine DBD du récepteur aux androgènes aux séquences ARE (Androgen Response Element) de l'ADN. Cela permet ensuite au RA de recruter de nouveaux co-activateurs ayant une activité d'histone acétyltransférase (HAT) comme CBP/p300, P/CAF via les membres de la famille de co-activateurs SRC/p160 (voir Figure 11) (Bennett et al., 2010; Heinlein and Chang, 2002). Ainsi la chromatine est remodelée, et permet la fixation des protéines de liaison à la TATA box (TBP), puis le recrutement de la machinerie basale de transcription (GTF). Enfin, l'ARN polymérase II peut commencer la transcription des gènes cibles du récepteur aux androgènes, parmi lesquels des gènes impliqués dans la mise en place du système sécrétoire, mais aussi dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Dehm and Tindall, 2006; Kaarbo et al., 2007; Lamont and Tindall, 2010).

La durée et l'efficacité de la transcription du récepteur aux androgènes dépendent de la nature de son ligand. Cette propriété est exploitée lors de l'élaboration des antagonistes utilisés pour inhiber la fonction du récepteur, afin de réduire le temps d'interaction entre le RA et l'ADN (Kaarbo et al., 2007). Finalement, lorsque le récepteur aux androgènes se détache de l'ADN, il peut, soit être recyclé dans le cytoplasme via sa région NES (Nuclear Export Sequence) présente au niveau du domaine LBD, soit être ubiquitinylé par l'E3 ubiquitin Ligase, puis dégradé par le protéasome.

Il faut noter que le récepteur aux androgènes fonctionne généralement sous forme d'homodimère, mais il est aussi capable de constituer des hétérodimères avec le récepteur orphelin TR4 (Testicular Receptor-4), et l'isoforme  $\alpha$  du récepteur aux œstrogènes, ce qui implique des variations dans la régulation de la transcription (Lee et al., 1999; Zhou et al., 1994).

#### **2.2.1.2.4 Signalisation non-génomique**

A cette signalisation génomique du récepteur aux androgènes s'ajoute une activité non canonique qualifiée de non-génomique, puisque caractérisée par une rapidité de réponse de l'ordre de quelques minutes, excluant les mécanismes de transcription-traduction beaucoup plus longs



Introduction

(Kousteni et al., 2001). Cette action du récepteur aux androgènes a lieu dans le cytoplasme ou à la membrane plasmique, et déclenche la libération du calcium intracellulaire et l'activation de protéines kinases comme les MAPK (ERK), la protéine kinase A (PKA), Akt et la protéine kinase C (PKC) (Baron et al., 2004; Foradori et al., 2008; Li and Al-Azzawi, 2009). Le récepteur aux androgènes peut activer ces cascades de signalisation en interagissant directement avec certains de leurs acteurs.

En effet, dans les cellules primaires murines VDEC de nature épithéliale, le domaine NTD du récepteur aux androgènes peut se lier à la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la phospho-inositide 3 kinase (PI3K), et ainsi activer la molécule effectrice Akt en aval. Cette activation d'Akt est complètement bloquée par le Bicalutamide, inhibiteur du RA (Baron et al., 2004). De même, dans les cellules LNCaP, lignée cellulaire dérivée d'un carcinome de prostate androgéno-dépendant, le récepteur aux androgènes peut avoir une action non-génomique en présence de son ligand. Il interagit, via les résidus 371 à 422 de son domaine NTD, avec le domaine SH3 (Src Homology 3) de la kinase Src ; cela induit un changement de conformation de Src qui stimule son activité enzymatique, ce qui conduit finalement à l'activation de la MAP kinase ERK2 (Migliaccio et al., 2000).



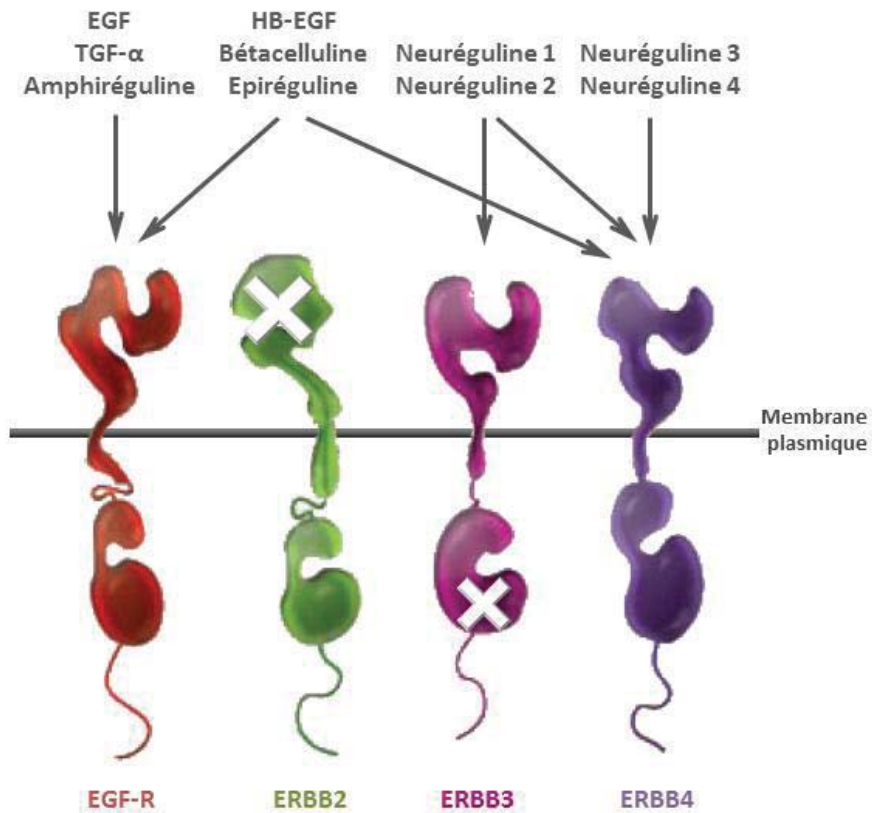


Figure d'après Zhang et al., 2007

Figure 12 : Spécificité des récepteurs de la famille ERBB.

## 2.2.2 EGF

L'EGF est un facteur de croissance ubiquitaire responsable de la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires. Il est synthétisé sous la forme d'un précurseur, puis est clivé pour devenir actif. L'EGF est constitué de 5 feuillets  $\beta$  reliés par trois ponts disulfures, cette organisation maintient la structure dans une conformation rigide et empêche sa dégradation par les protéases. L'EGF est une molécule soluble, et ne peut donc pas traverser les membranes plasmiques ; il agit sur les cellules par le biais de son récepteur.

### 2.2.2.1 Récepteur à l'EGF

Le clonage et le séquençage complet de l'ADNc de l'EGF-R ont permis de mettre en évidence pour la première fois des similitudes et des différences entre un récepteur membranaire et un oncogène viral aviaire : v-erbB (Downward et al., 1984; Ullrich et al., 1984; Yamamoto et al., 1983). Le récepteur à l'EGF fait partie de la classe des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) membranaires qui comprend 58 membres parmi lesquels plus de la moitié ont été trouvés surexprimés ou mutés dans des cas de maladies hyper- ou hypo-prolifératives (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

Le récepteur à l'EGF définit une famille qui comporte quatre membres : l'EGF-R (ERBB1, HER1), ERBB2 (HER2, NEU), ERBB3 (HER3) et ERBB4 (HER4) ayant des homologies de 25 à 80% selon les régions, le domaine kinase étant le plus conservé (Jorissen et al., 2003; Mitsudomi and Yatabe, 2010). Par ailleurs, les récepteurs de la famille HER (Human Epidermal growth factor Receptors) ont dix ligands différents classés en quatre groupes : l'epidermal growth factor (EGF), le transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) et l'amphiréguline se lient à l'EGF-R (HER1) ; l'heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), la bétacelluline (BTC) et l'épiréguline (EPR) se lient à HER1 et HER4 ; la neuréguline-1 (NRG-1) et la NRG-2 se fixent sur HER3 et HER4 ; tandis que la NRG-3 et la NRG-4 se lient uniquement à HER4 (**voir Figure 12**) (Beerli and Hynes, 1996; Carraway et al., 1994; Higashiyama et al., 1991; Peles and Yarden, 1993; Plowman et al., 1993; Riese et al., 1996; Savage et al., 1972; Shing et al., 1993; Tzahar et al., 1994; Zhang et al., 2007). Cependant, le récepteur HER2 ne lie aucun de ces ligands, il est donc supposé agir comme une sous-unité commune, capable de former des hétérodimères avec les trois autres formes d'EGF-R afin de favoriser l'activation des cascades de signalisation en aval (Graus-Porta et al., 1997).

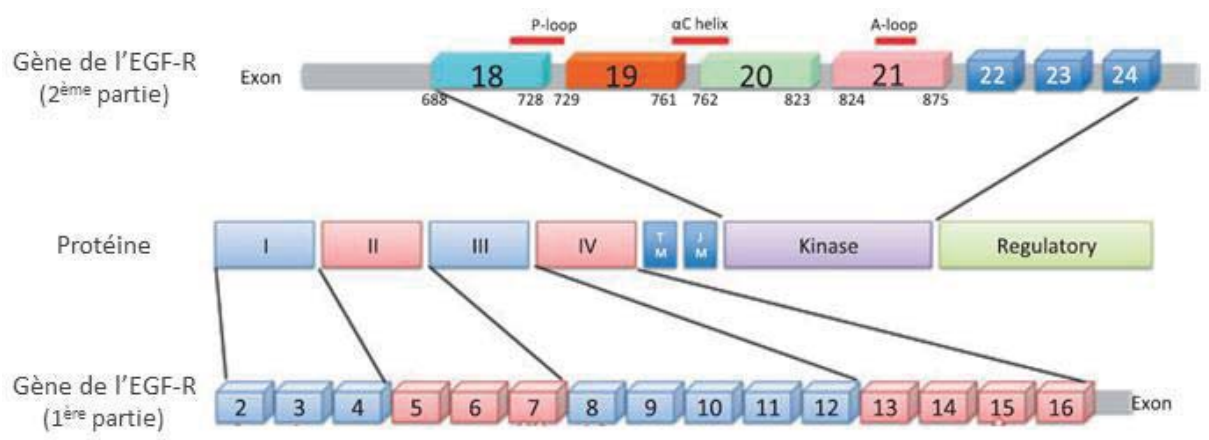


Figure d'après Mitsudomi and Yatabe, 2010

Figure 13 : Structure du gène et de la protéine du récepteur à l'EGF.

### 2.2.2.1.1 Structure du gène et de la protéine

Le gène de l'EGF-R se trouve sur le chromosome 7p12-13 et code pour un récepteur à activité tyrosine kinase de 170-kDa. L'EGF-R est synthétisé à partir d'un précurseur peptidique de 1210 acides aminés qui est inséré à la membrane plasmique après le clivage de 24 résidus de la séquence amino-terminale (Ullrich et al., 1984). L'EGF-R est composé de quatre domaines fonctionnels : le domaine de liaison du ligand extracellulaire, le domaine transmembranaire, le domaine tyrosine kinase intracellulaire et le domaine C-terminal régulateur (voir Figure 13) (Burgess et al., 2003).

#### 2.2.2.1.1.1 Domaine de liaison au ligand

Le domaine extracellulaire est codé par les exons 2 à 16 et comporte 4 régions distinctes : la région L1 (exons 2 à 4), la région CR1 (exons 5 à 7), la région L2 (exons 8 à 12) et la région CR2 (exons 13 à 16). Les régions L1 et L2 ont une conformation en hélices  $\beta$  et permettent la liaison de l'EGF. Ces domaines L1 et L2 adoptent une conformation créant une poche de liaison pour l'EGF. Les régions CR1 et CR2 quant à elles, sont composées de séquences riches en cystéine, et semblent être reliées entre elles par des ponts disulfures. De plus une grande boucle dépasse du domaine CR1 afin d'entrer en contact avec le domaine CR1 d'un autre EGF-R pour former un dimère (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). Le premier module de chacune des régions CR comporte un résidu Tryptophane (Trp<sup>176</sup> et Trp<sup>492</sup>) qui s'intercale entre la quatrième et la cinquième boucle de l'hélice  $\beta$  formée par la région L, cela permet de former une poche hydrophobe dans laquelle se trouvent d'autres résidus Tryptophane (Trp<sup>140</sup> et Trp<sup>453</sup>). Cette poche hydrophobe semble essentielle à la liaison du ligand au récepteur avec une forte affinité (Elleman et al., 2001). La région CR2 comporte une séquence entre les résidus 557 et 617 qui semble être suffisante pour adresser le récepteur à l'EGF vers les rafts membranaires (Yamabhai and Anderson, 2002).

#### 2.2.2.1.1.2 Domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire est codé par l'exon 17, et se trouve entre les résidus 622 et 644 de l'EGF-R (Ullrich et al., 1984). Cette région a une structure en hélice  $\alpha$  qui se prolonge le long du domaine juxta-membranaire (Rigby et al., 1998). Cette séquence est dotée de nombreuses fonctions régulatrices, comme la régulation négative de l'internalisation de l'EGF-R (Kil and Carlin, 2000), la localisation de l'EGF-R dans les cellules polarisées (He et al., 2002b), ou l'association avec la calmoduline qui entre en compétition avec la protéine kinase C (PKC) pour la liaison à l'EGF-R (Li and Villalobo, 2002; Martin-Nieto and Villalobo, 1998).

### 2.2.2.1.1.3 Domaine tyrosine kinase

Le domaine tyrosine kinase est codé par les exons 18 à 24 du gène de l'EGF-R. Il adopte la structure bilobée caractéristique des domaines kinases. Le lobe N-terminal (N-lobe) est codé par les exons 18 à 20 et est principalement formé de feuillets  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  ( $\alpha C$ ). Au contraire le lobe C-terminal (C-lobe), codé par les exons 21 à 24, est formé majoritairement d'hélices  $\alpha$ . Les deux lobes du domaine tyrosine kinase sont séparés par le sillon permettant la fixation de l'ATP. Des éléments de la machinerie catalytique bordent ce sillon, notamment la boucle riche en résidus Glycine (Gly<sup>695</sup>-Gly<sup>700</sup>) présente sur le N-lobe et permettant la liaison d'un groupement phosphate, et le C-lobe apporte le motif DFG (Asp<sup>831</sup> - Gly<sup>833</sup>), la boucle catalytique (Arg<sup>812</sup> - Asn<sup>818</sup>) contenant le résidu Asp<sup>813</sup>, et la boucle A (Asp<sup>831</sup> - Val<sup>852</sup>) (Stamos et al., 2002).

Il faut noter que HER3 ne dispose pas d'un domaine tyrosine kinase, il ne peut donc propager un signal que par l'intermédiaire d'une hétérodimérisation avec un autre membre de la famille de l'EGF-R (Guy et al., 1994; Schlessinger, 2004; Yarden and Sliwkowski, 2001).

### 2.2.2.1.1.4 Domaine C-terminal

Le domaine C-terminal est codé par les exons 25 à 28 du gène de l'EGF-R. Cette région contient de nombreux résidus Tyrosine dont la phosphorylation module l'association de molécules essentielles à la transduction du signal initiée par la liaison de l'EGF à son récepteur. Il existe aussi des résidus Sérine (Ser) et Thréonine (Thr) dont la phosphorylation semble être importante dans les processus d'endocytose. De plus, les résidus 984 à 996 du domaine C-terminal ont été décrits comme étant un site de liaison à l'actine (den Hartigh et al., 1992). Cette séquence semble être impliquée dans l'oligomérisation des récepteurs après leur activation par la fixation de leur ligand.

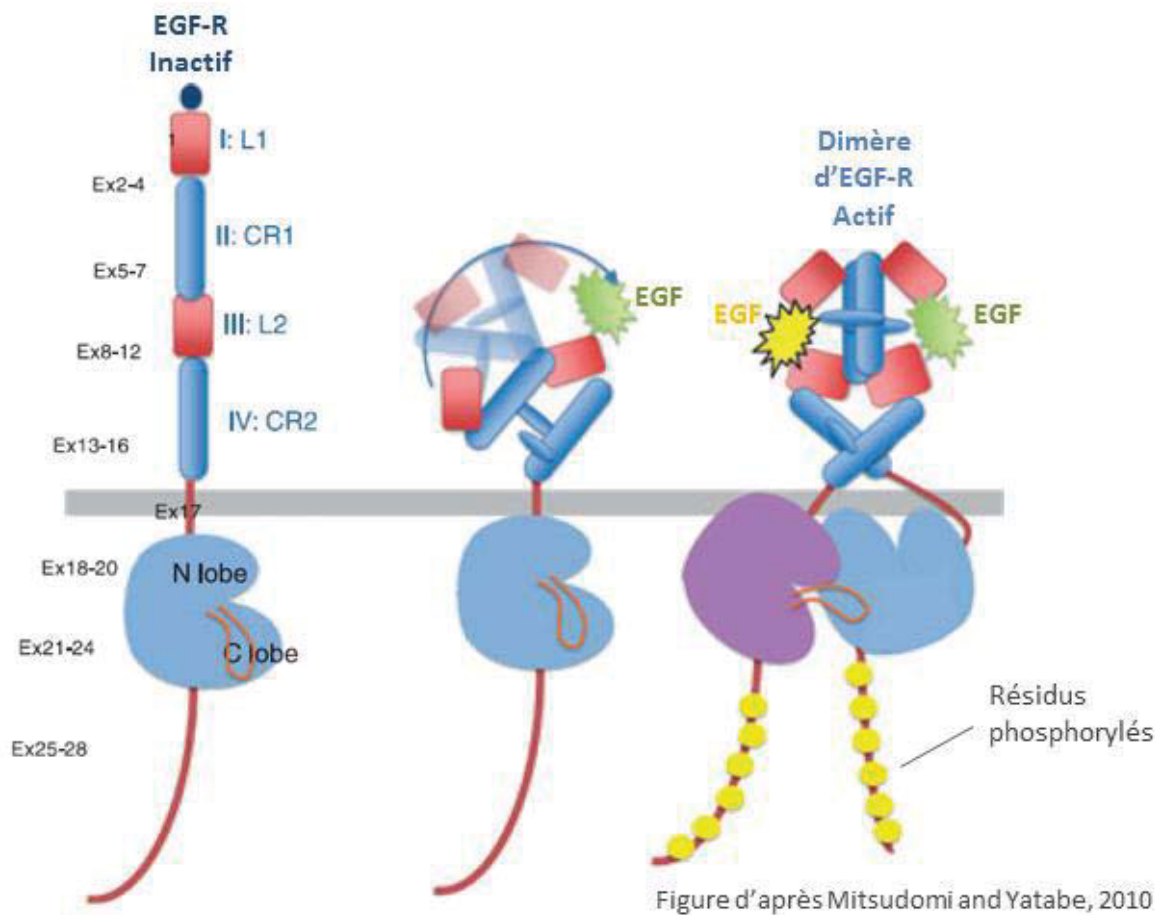


Figure 14 : Structure de l'EGF-R, et mode d'activation.

L'EGF peut se lier aux régions L1 et L2 du domaine extracellulaire de l'EGF-R suite à la rotation des domaines L1 et CR1. Ce changement de conformation permet la dimérisation de l'EGF-R, ce qui stimule l'activité catalytique des domaines kinase, responsables de l'autophosphorylation, donc de l'activation de l'EGF-R.

## 2.2.2.2 Signalisation de l'EGF-R

### 2.2.2.2.1 Fixation du ligand

L'EGF interagit avec les régions L1 et L2 de son récepteur (**voir Figure 14**). Des liaisons hydrogène se créent entre les résidus de l'EGF et ceux de l'EGF-R : Arg<sup>41</sup> se lie à Asp<sup>355</sup>, Glu<sup>43</sup> et Arg<sup>45</sup> se lient à Glu<sup>384</sup>, Cys<sup>31</sup> et Cys<sup>33</sup> se lient à Glu<sup>16</sup> et Gly<sup>18</sup>. Par ailleurs, le résidu Leu<sup>47</sup> de l'EGF se place dans la poche hydrophobe formée par les résidus Leu<sup>382</sup>, Phe<sup>412</sup>, Ala<sup>415</sup> et Ile<sup>438</sup>. Finalement, le plus grand des feuilletts  $\beta$  de l'EGF est attiré dans son récepteur. Il faut noter que les différents ligands des récepteurs de la famille ERBB ont le même mode de liaison, quel que soit leur récepteur. De plus, certains résidus sont conservés entre les différents ERBB (Leu<sup>14</sup>, Glu<sup>355</sup>, Phe<sup>357</sup>), indiquant leur importance dans la fixation du ligand (Jorissen et al., 2003).

Finalement, l'ectodomaine de l'EGF-R (résidus 1 à 621) est décrit pour interagir avec l'EGF et permettre la formation de dimères selon la stoechiométrie 2 : 2 (deux EGF-R et deux ligands) (Domagala et al., 2000; Lemmon et al., 1997; Odaka et al., 1997). La structure tridimensionnelle de l'ectodomaine de ERBB3 indique que la conformation des régions L1 et L2 exclut la possibilité d'une liaison de l'EGF à ces deux régions simultanément (Cho and Leahy, 2002).

### 2.2.2.2.2 Dimérisation

Lorsque l'EGF se fixe sur son récepteur, il subit un changement de conformation permettant sa dimérisation par l'intermédiaire d'une boucle présente au niveau du domaine CR1 qui peut interagir avec la poche présente à la base de cette boucle au niveau de l'EGF-R partenaire. Il existe aussi des contacts plus faibles entre la boucle du CR1 et les régions L1 et L2 de l'EGF-R partenaire. Ces interactions participent à la formation de dimères à la surface cellulaire (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). La formation des hétérodimères est moins bien caractérisée que celle des homodimères, mais il est admis que le récepteur ERBB2 est le partenaire favori de l'EGF-R (Graus-Porta et al., 1997; Karunagaran et al., 1996). De plus ce type d'hétérodimères est connu pour réduire le taux de dégradation de l'EGF-R (Lenferink et al., 1998). Par ailleurs, des hétéro-oligomères impliquant l'EGF-R et les récepteurs de surface comme le PDGF-R ont été décrits (Saito et al., 2001). De tels complexes peuvent se former grâce aux systèmes de protéines d'échafaudage, ou aux interactions entre molécules adaptatrices (Walker and Burgess, 1991).

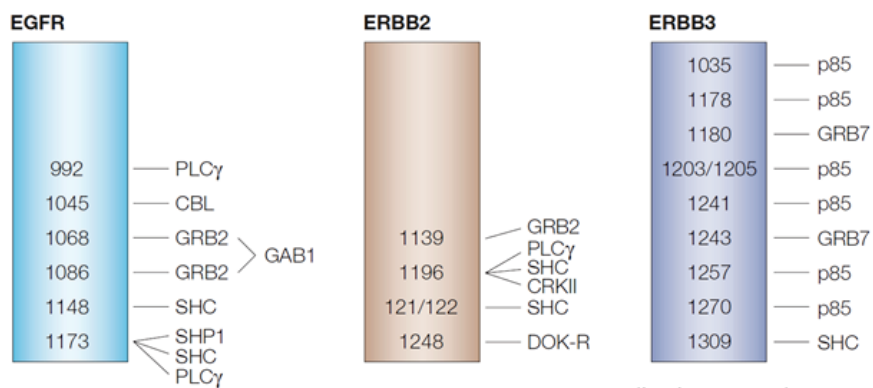


Figure d'après Hynes and Lane, 2005

**Figure 15 : Sites de phosphorylation des domaines cytoplasmiques d'EGF-R, ERBB2 et ERBB3.**

A chaque résidu phosphorylé correspond une ou plusieurs molécules de signalisation connue(s) pour s'y associer.



#### 2.2.2.2.3 Activation du domaine kinase de l'EGF-R

La dimérisation des récepteurs à l'EGF via leur région CR1 permet aux domaines kinases intracellulaires d'interagir selon une orientation tête-bêche (Zhang et al., 2006b). Ce changement de conformation par rotation du domaine cytoplasmique autour d'un point du domaine juxtamembranaire est nécessaire et suffisant pour activer le domaine kinase de l'EGF-R (Chantry, 1995; Gadella and Jovin, 1995; Moriki et al., 2001). Néanmoins, la région C-terminale participe à réguler la dimérisation des récepteurs, puisque la délétion des résidus 835 à 918 empêche la dimérisation de l'EGF-R en absence de ligand (Yu et al., 2002).

De nombreuses protéines à activité tyrosine kinase nécessitent une phosphorylation de leur boucle d'activation pour être activées (Hubbard et al., 1998). Cependant, l'activité kinase de l'EGF-R ne semble pas être soumise à ce type de régulation. En effet, la mutation de la seule Tyrosine présente au niveau de la boucle d'activation (Tyr<sup>845</sup>) n'affecte pas l'activité kinase de l'EGF-R (Tice et al., 1999). Ainsi, le changement de conformation du domaine tyrosine kinase de l'EGF-R augmente son affinité pour l'ATP, ce qui permet son activation (Ge et al., 2002).

#### 2.2.2.2.4 Activation des voies de signalisation en aval

Lorsque le domaine tyrosine kinase du récepteur à l'EGF est actif, il peut s'autophosphoryler, ou être phosphorylé par d'autres kinases telles que Src et JAK-2 (Tice et al., 1999; Yamauchi et al., 1997). Les résidus phosphorylés peuvent alors servir de sites d'ancrage aux domaines SH2 et PTB des molécules adaptatrices impliquées dans la signalisation intracellulaire. Il faut noter que chaque membre de la famille des ERBB peut recruter différentes molécules de signalisation (**voir Figure 15**) (Hynes and Lane, 2005). Les voies de signalisation induites par le récepteur à l'EGF fonctionnent de manière entremêlée et ne doivent pas être considérées individuellement.

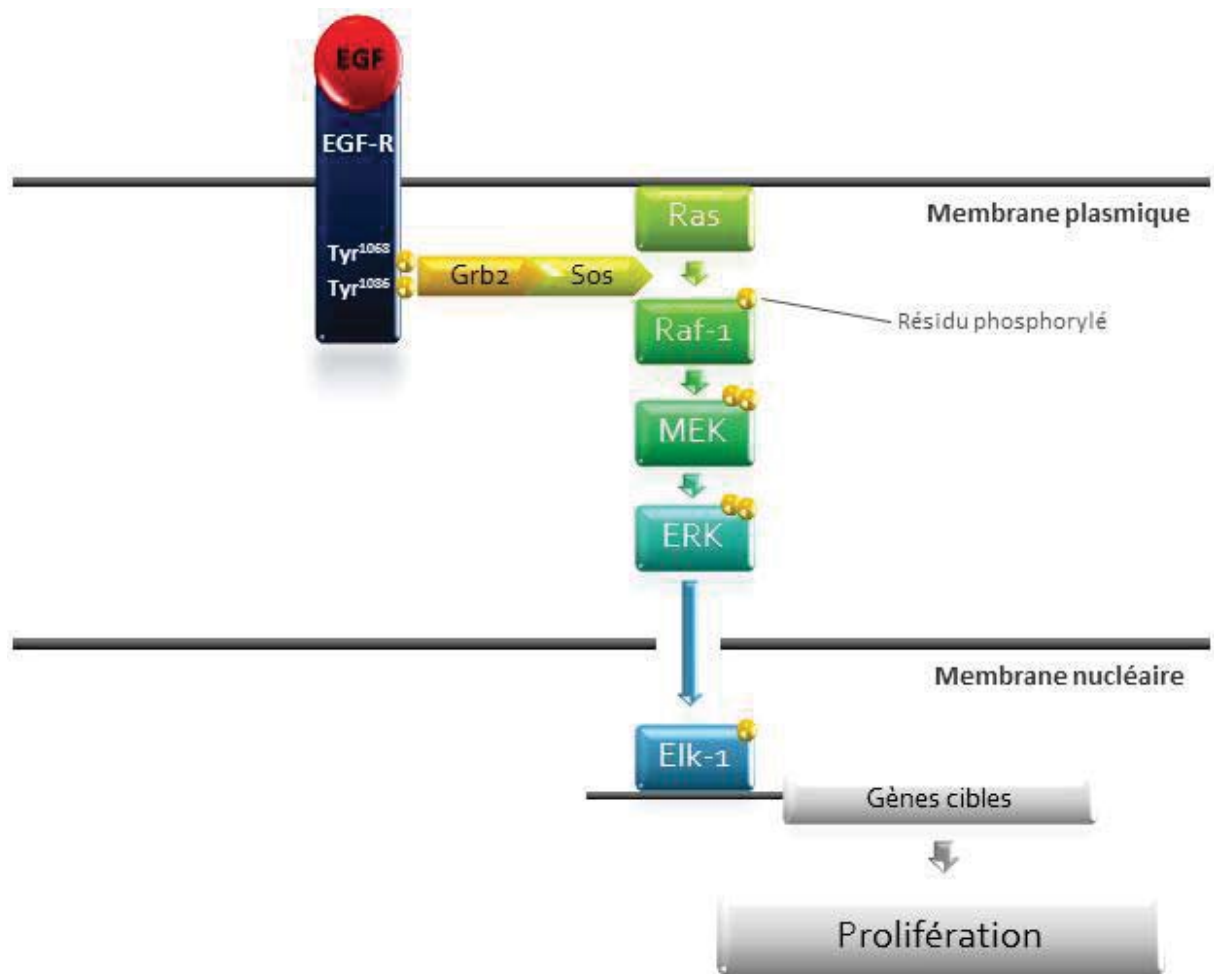


Figure 16 : Voie d'activation des MAP kinases ERK1/2.

#### 2.2.2.2.4.1 Voie Ras/MAPK

La voie de signalisation des MAP kinases est la principale voie induite par le récepteur à l'EGF (voir **Figure 16**) (Hemming et al., 1992; Salomon et al., 1995). Cette cascade induite par le proto-oncogène Ras implique la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor Receptor Bound protein 2*). Cette molécule est dotée d'un domaine SH2 capable de se lier aux résidus phosphorylés Tyr<sup>1068</sup> et Tyr<sup>1086</sup> de l'EGF-R (Batzer et al., 1994). La protéine adaptatrice Grb2 a aussi deux domaines SH3 qui interagissent avec les séquences riches en résidus Proline du facteur d'échange de nucléotides guanyliques, Sos (*Son of Sevenless*). Ainsi, Sos se relocalise du cytoplasme vers la membrane plasmique, ce qui le rapproche de son substrat : Ras, petite GTPase membranaire. Cette proximité permet à Sos de remplacer un GDP par un GTP sur Ras, qui passe ainsi de sa forme inerte à sa forme active. La protéine Ras peut alors se lier au domaine N-terminal de la Sérine/Thréonine kinase Raf-1, cette interaction induit le changement de conformation nécessaire à l'activation de Raf-1 (Hallberg et al., 1994). Raf-1 active les MAP Kinases (MEK) en les phosphorylant sur deux résidus Sérine. A cette étape, le signal est amplifié car les protéines MEK sont beaucoup plus abondantes que les protéines Raf. Les protéines MEK ainsi activées phosphorylent les MAP Kinases (ERK) sur les résidus Tyrosine et Thréonine du motif Tyr-Glu-Thr présent dans la boucle d'activation de son domaine kinase, et induisent l'activité catalytique des ERK (Liebmann, 2001). Les Sérine/Thréonine kinases ERK ont de nombreux substrats cytoplasmiques (Yoon and Seger, 2006), et peuvent aussi pénétrer dans le noyau par diffusion passive de dimères ou transport actif de monomères afin d'activer des substrats nucléaires. Le facteur de transcription Elk1 est un des substrats des ERK, il permet l'expression de gènes précocement induits (*immediate early gene : IEG*). Finalement, la voie ERK aboutit à des réponses cellulaires variées, comme la prolifération, la différenciation, la migration ou l'apoptose (Yang et al., 2003).

Introduction

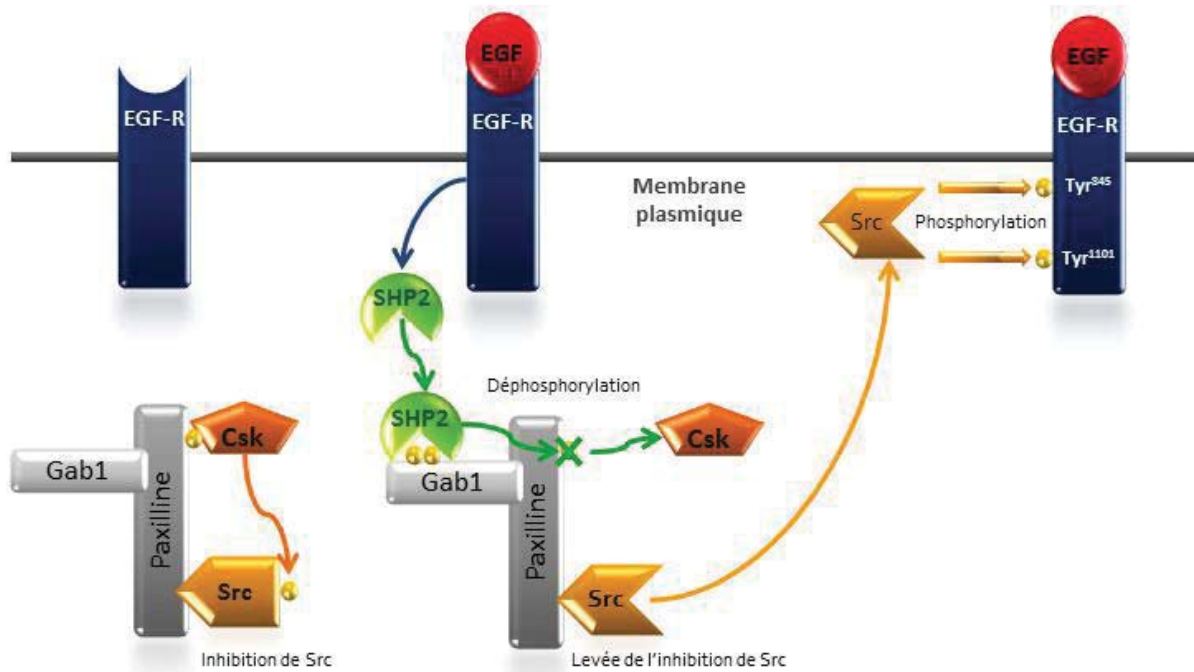


Figure d'après Ren et al., 2004

Figure 17 : Mode d'activation de la kinase Src et phosphorylation de l'EGF-R.

En absence d'EGF, la kinase Csk phosphoryle Src, ce qui la maintient dans un état inactif. Lorsque l'EGF-R est stimulé, la phosphatase SHP2 est activée et empêche l'action de Csk sur Src. Cette levée d'inhibition permet à la kinase Src d'aller phosphoryler l'EGF-R sur les résidus Tyr845 et Tyr1101.

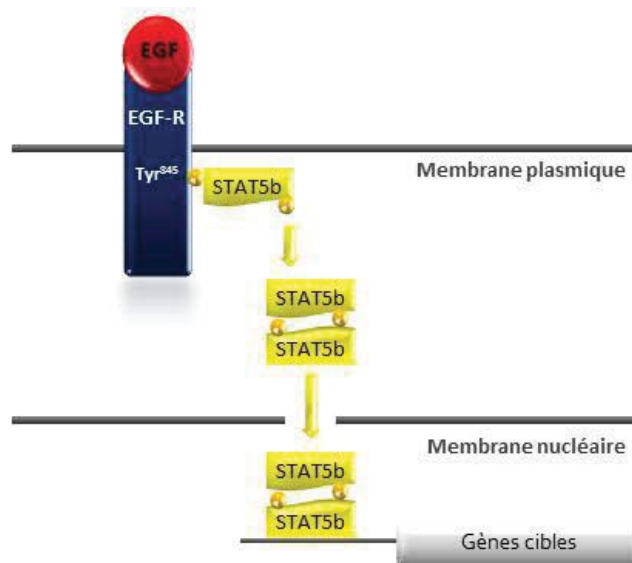


Figure 18 : Voie d'activation de STAT5b.

#### 2.2.2.2.4.2 Kinases Src

La kinase Src est membre d'une famille de 10 gènes, qui comporte par ailleurs : *fyn, yes, blk, frk, fgr, hck, lck, lyn, srms*. Ces kinases sont spécifiques des résidus Tyrosine, et ont une localisation cytoplasmique. Les SFK (Src Family Kinases) jouent un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération, la migration ou l'adhésion. La signalisation de la kinase Src interfère avec d'autres cascades telles que la voie JAK/STAT ou la voie PI3-K/Akt (Leu and Maa, 2003; Summy and Gallick, 2006; Yeatman, 2004). La kinase Src est capable d'interagir avec des résidus Tyrosine phosphorylés, notamment la Tyr<sup>845</sup>, présents au niveau du domaine kinase de l'EGF-R, via son domaine SH2, afin de favoriser la signalisation du récepteur à activité tyrosine kinase (**voir Figure 17**) (Leu and Maa, 2003).

#### 2.2.2.2.4.3 Voie STAT

Les protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) ont d'abord été décrites en aval des récepteurs de cytokines (Darnell, 1997; Ihle et al., 1997). Les sept gènes STAT (1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6) appartiennent à une famille de facteurs de transcription présents dans le cytoplasme sous forme de monomères (Darnell, 1997). De manière générale, les protéines STAT sont recrutées au niveau du récepteur via leur domaine SH2, puis elles sont phosphorylées par les kinases JAK (Janus Kinase) (voir paragraphe 2.2.3.2. Signalisation de l'IL-6, page 60) (Leonard, 2001). Les phosphorylations sur des résidus Tyrosine permettent la dimérisation des STAT, qui peuvent ainsi pénétrer dans le noyau afin d'induire l'expression de leurs gènes cibles (Yu and Jove, 2004; Zhong et al., 1994).

Les protéines STAT1, 3 et 5 sont impliquées dans le signal de l'EGF-R. Dans ce contexte, leur phosphorylation est indépendante de la protéine JAK (David et al., 1996; Leaman et al., 1996; Park et al., 1996). L'activation de STAT5b est la conséquence d'une coopération entre la kinase Src et l'EGF-R. Son activation nécessite en effet la phosphorylation par Src du résidu Tyr<sup>845</sup> présent au niveau du domaine kinase de l'EGF-R (Andl et al., 2004; David et al., 1996; Kloth et al., 2003). La protéine STAT5b est ainsi recrutée via son domaine SH2 au niveau de ce résidu Tyr<sup>845</sup>, où elle est phosphorylée sur des résidus Tyrosine, ce qui entraîne un changement de conformation permettant sa dimérisation, donc son activation (**voir Figure 18**).

#### 2.2.2.2.4.4 Voie PI3-K/Akt

La voie PI3K régule divers processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose, l'invasion ou la migration (Vivanco and Sawyers, 2002). La PI3 kinase est une enzyme composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Suite à la stimulation de l'EGF-R, il existe deux modes d'activation de la PI3 kinase.

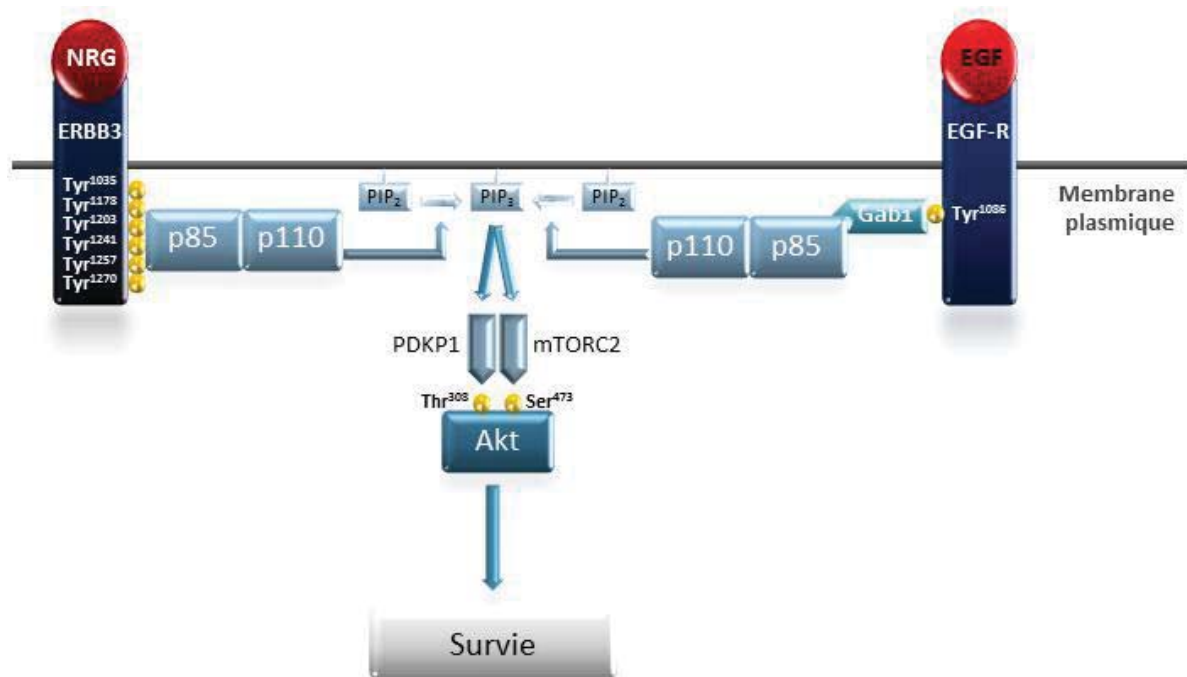


Figure 19 : Deux modes d'activation de la voie PI3K/Akt par deux récepteurs de la famille ERBB.

Contrairement à la neuréguline (NRG), l'EGF active indirectement cette voie par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Gab1.

Le mécanisme principal d'activation de la PI3 kinase dépend de l'hétérodimérisation entre l'EGF-R et ERBB3. ERBB3 comporte en effet de nombreux sites d'ancrage pour la sous unité p85 dans sa région cytoplasmique (Carpenter et al., 1993; Yarden and Sliwkowski, 2001). La protéine p85 dispose d'un domaine SH2 grâce auquel elle est capable d'interagir avec les résidus Tyrosine phosphorylés des motifs YxxM, présents sur ERBB3 (Yu et al., 1998a; Yu et al., 1998b). Alternativement, la sous-unité p85 de la PI3K peut s'associer avec l'EGF-R par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Gab1, qui interagit avec le résidu Tyr<sup>1086</sup> du domaine kinase (**voir Figure 19**) (Mattoon et al., 2004).

Ces deux associations permettent l'activation de la sous-unité catalytique p110, qui va phosphoryler le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) en PIP<sub>3</sub>, second messenger qui permet le recrutement d'Akt via son domaine Sérine/Thréonine kinase. Cette interaction induit un changement de conformation de la kinase qui permet sa phosphorylation sur les résidus Thr<sup>308</sup> et Ser<sup>473</sup> par les kinases PDKP1 (phosphoinositide dependent kinase 1) et mTORC2 (mammalian Target of Rapamycin Complex 2), respectivement (Stokoe et al., 1997; Vivanco and Sawyers, 2002). La kinase Akt peut ainsi phosphoryler diverses cibles jouant un rôle dans la survie cellulaire, comme Bad, la Pro-Caspase 9, ou le facteur de transcription NFκB, qui permet l'expression des gènes de la famille anti-apoptotique Bcl2, et des inhibiteurs de caspases c-IAP1, c-IAP2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein).

#### 2.2.2.2.5 Recyclage ou dégradation des récepteurs

Après leur activation, les récepteurs de la famille de l'EGF-R sont internalisés, puis adressés à la dégradation lysosomale, ou recyclés à la membrane plasmique. L'endocytose médiée par la clathrine est le mécanisme majeur d'internalisation de l'EGF-R. La partie C-terminale de l'EGF-R semble jouer un rôle dans la régulation de ce processus. Ce domaine comporte en effet divers résidus Sérine et Tyrosine qui peuvent être phosphorylés, et ainsi servir de point d'ancrage à des protéines impliquées dans les mécanismes d'internalisation et de dégradation (Sorkin and Goh, 2009).

Les différents ligands des récepteurs de la famille de l'EGF-R stimulent l'internalisation de leur récepteur. Selon leur nature, ils induisent soit le recyclage, soit la dégradation de leur récepteur. En effet, l'HB-EGF et la Bétacelluline adressent l'EGF-R à la dégradation lysosomale. Au contraire, le TGF-α et l'Epiréguline entraînent un recyclage total de leurs récepteurs. L'amphiréguline, quant à elle, n'induit pas la dégradation de l'EGF-R, mais son recyclage est significativement ralenti, et l'EGF entraîne la dégradation de la majorité des récepteurs, mais pas la totalité (Roepstorff et al., 2009).

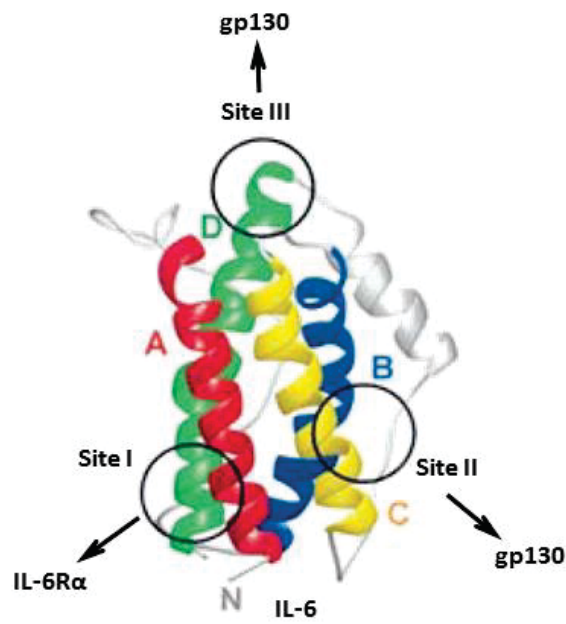


Figure d'après Heinrich et al., 2003

Figure 20 : Structure tridimensionnelle de l'IL-6.

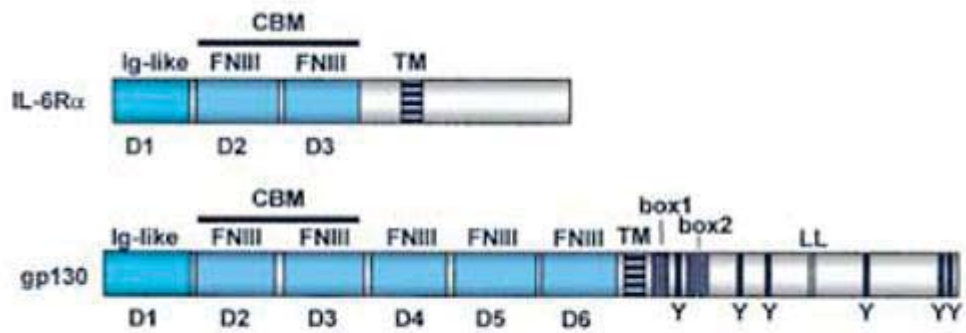


Figure d'après Heinrich et al., 2003

Figure 21 : Structures de l'IL-6R $\alpha$  et de gp130.



### 2.2.3 IL-6

L'Interleukine-6 est une cytokine, c'est-à-dire un facteur soluble produit par les cellules et sécrété dans l'environnement pour agir sur les cellules voisines afin d'en réguler la différenciation, la survie, l'apoptose ou encore la prolifération. L'Interleukine-6 appartient à la famille des cytokines inflammatoires de type IL-6, comprenant aussi l'IL-11, le LIF (Leukaemia Inhibitory Factor), l'OSM (Oncostatine M), le CNTF (Ciliar Neurotrophic Factor), la CT-1 (cardiotrophin-1) et la CLC (cardiotrophin-like cytokine). Ces cytokines ont aussi bien des propriétés pro-inflammatoires qu'anti-inflammatoires, et jouent un rôle important dans l'hématopoïèse et la réponse immunitaire (Heinrich et al., 2003).

Le gène de l'IL-6 est localisé sur le chromosome 7p21-14. Il est transcrit sous la forme d'un ARNm d'une longueur de 1,3 kb et doté de 5 exons. Ce messenger est traduit en une protéine de 184 acides aminés, d'une masse moléculaire d'environ 20 kDa. L'IL-6 comporte quatre résidus Cystéine, deux ponts disulfure, et deux sites de N-glycosylation (Heinrich et al., 1998). La structure tertiaire de l'IL-6 est caractérisée par la présence de quatre hélices  $\alpha$  (A, B, C et D) disposées de manière antiparallèle et interconnectées par des structures en forme de boucle (**voir Figure 20**) (Heinrich et al., 2003; Somers et al., 1997; Xu et al., 1997).

#### 2.2.3.1 Récepteur à l'IL6

Le récepteur à l'IL-6 est composé de deux sous-unités : une protéine transmembranaire de 80 kDa qui reconnaît spécifiquement l'IL-6 (IL-6R $\alpha$ ), et une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa (gp130) responsable de la transduction du signal (**voir Figure 21**).

##### 2.2.3.1.1 IL-6R $\alpha$

La transcription du gène de l'IL-6R $\alpha$  donne un messenger de 5 kb qui permet l'expression d'une protéine de 449 acides aminés, d'une masse moléculaire d'environ 80 kDa et dotée de cinq sites de N-glycosylation. Le domaine N-terminal extracellulaire de l'IL-6R $\alpha$  est composé de 339 acides aminés organisés en 3 régions définies : un domaine immunoglobuline (D1) et deux domaines Fibronectine de type III (FNIII) nommés D2 et D3. Ces derniers constituent le module de liaison des cytokines (CBM pour Cytokine Binding Module). La structure du CBM est conservée : le domaine D2 comporte des motifs riches en résidus Cystéine, et le domaine D3 est caractérisé par la présence d'un motif WSXWS (Bazan, 1990; Varghese et al., 2002). Le domaine transmembranaire de l'IL-6R $\alpha$  est composé de 28 acides aminés, tandis que le domaine C-terminal intracellulaire de 82 résidus n'est pas capable d'induire la signalisation intracellulaire de lui-même. Pour cela, l'IL-6R $\alpha$  a besoin de la sous-unité

gp130 commune à tous les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 (Heinrich et al., 2003; Heinrich et al., 1998).

### 2.2.3.1.2 Gp130

Le gène de la glycoprotéine gp130 est transcrit sous la forme d'un ARNm de 7 kb. Ce message est traduit en une protéine de 896 acides aminés, d'une masse moléculaire d'environ 130 kDa et qui comporte dix sites de N-glycosylation. Le domaine extracellulaire N-terminal de gp130 est composé de 597 acides aminés organisés en 6 régions définies : un domaine immunoglobuline (D1) et cinq domaines Fibronectine de type III (FNIII) nommés D2, D3, D4 et D5. Comme pour l'IL-6R $\alpha$ , les domaines D2 et D3 constituent le CBM (D2 comporte des motifs riches en Cystéine, et D3 porte un motif WSXWS). Le domaine transmembranaire de gp130 est composé de 22 acides aminés, et son domaine C-terminal cytoplasmique de 277 acides aminés est caractérisé par de nombreux résidus Tyrosine, cibles de phosphorylations, et par un motif di-Leucine ayant un rôle dans l'internalisation du ligand (Chow et al., 2001; Dittrich et al., 1996; Heinrich et al., 2003; Heinrich et al., 1998; Hibi et al., 1990).

### 2.2.3.2 Signalisation de l'IL-6

#### 2.2.3.2.1 Interaction IL-6 / IL-6R $\alpha$

La liaison de la cytokine sur son récepteur a été largement étudiée. Le domaine immunoglobuline de l'IL-6R $\alpha$  n'est pas nécessaire à cette interaction (Yawata et al., 1993). Cependant le motif CBM présent dans les régions de type fibronectine III (D2 et D3) de l'IL-6R $\alpha$ , contient des résidus essentiels à la fixation de l'IL-6 (Grotzinger et al., 1997; Kalai et al., 1997; Kalai et al., 1996; Yawata et al., 1993). L'IL-6 possède trois sites d'interaction avec son récepteur (**voir Figure 20**). Le site I est constitué des résidus en position C-terminale de l'hélice D et de la partie C-terminale de la boucle reliant les hélices A et B. Ce site détermine la spécificité de la liaison de la cytokine à son récepteur IL-6R $\alpha$ , puisque les sites II et III permettent l'interaction de l'IL-6 avec la sous-unité gp130.

#### 2.2.3.2.2 Recrutement de gp130

Le site II comporte les résidus proches du centre des hélices A et C. Il semble qu'il constitue le site universel de liaison des cytokines de la famille de l'IL-6 à la glycoprotéine gp130 (**voir Figure 20**). Selon la cytokine, le site III peut permettre le recrutement de LIFR, OSMR ou d'une autre gp130, comme c'est le cas pour l'IL-6. Ce dernier site est composé des résidus présents à la fin de la boucle CD, et sur les parties N-terminales de l'hélice B et de la boucle AB. Les domaines de gp130 impliqués dans l'interaction avec l'IL-6 sont plus variés que ceux de l'IL-6R $\alpha$ .

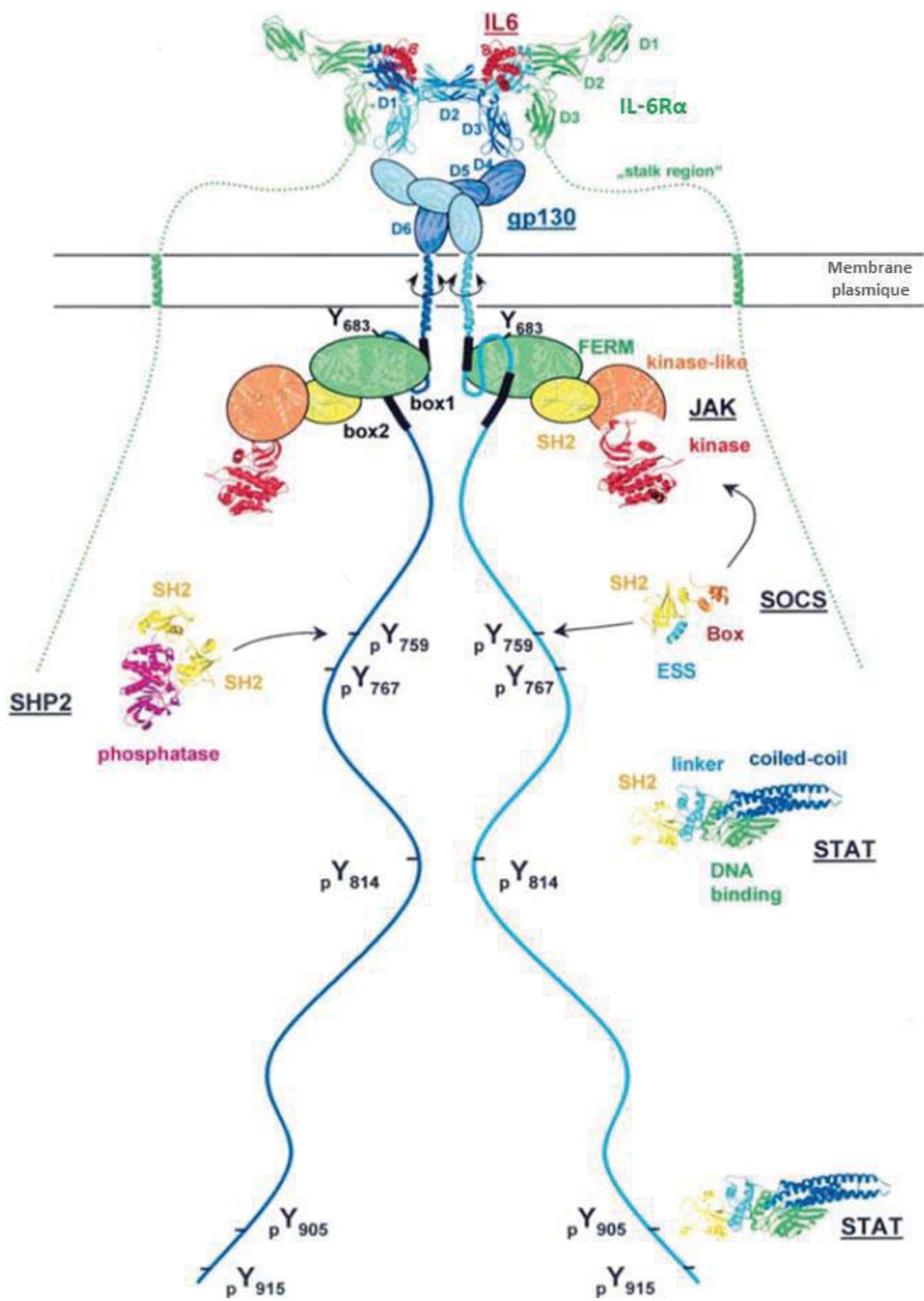


Figure d'après Heinrich et al., 2003

Figure 22 : Voies de signalisation induites par l'IL-6.

La fixation de l'IL-6 sur son récepteur IL-6Rα et gp130 entraîne le changement de conformation de gp130 responsable de l'activation des kinases JAK. Ainsi les JAK peuvent phosphoryler divers résidus de gp130 nécessaires à la liaison de molécules de signalisation, comme STAT, SHP2 ou SOCS.

En effet, le motif CBM composé des domaines D2 et D3 se lie au site II tandis que le site III de l'IL-6 s'associe au domaine immunoglobuline D1 présent en position N-terminale sur gp130 (Hammacher et al., 1998; Kurth et al., 1999; Owczarek et al., 1997; Pflanz et al., 2000; Timmermann et al., 2000). Finalement, la liaison de l'IL-6 à son récepteur aboutit à la formation d'un hexamère composé de deux molécules d'IL-6, deux molécules d'IL-6R $\alpha$  et deux molécules gp130 et capable de déclencher des cascades de signalisation intracellulaire (voir Figure 22).

#### 2.2.3.2.3 Activation des voies de signalisation

La protéine gp130 ne possède pas d'activité kinase intrinsèque, mais elle est associée de manière constitutive à des protéines à activité tyrosine kinase de la famille JAK (pour Janus Kinase), JAK1, JAK2 et TYK2 (Giese et al., 2003). Les JAK se lient en effet à la région juxta-membranaire de gp130 qui contient les motifs : box 1 (riche en Proline) et box 2 (séquence composée d'acides aminés hydrophobes suivis de résidus chargés). Ces deux domaines et la séquence intermédiaire sont importants pour l'interaction gp130-JAK, mais aussi pour l'activité catalytique de JAK (Haan et al., 2002; Haan et al., 2000; Murakami et al., 1991; Radtke et al., 2002). La structure des kinases JAK indique que le domaine Tyrosine kinase qui se trouve en position C-terminale est précédé d'un domaine pseudokinase responsable de la régulation de l'activité catalytique (O'Shea et al., 2002). Par ailleurs, les kinases JAK ont une séquence SH2 potentielle, et un domaine FERM (Four-point-one Ezrin Radixin Moesin) en position N-terminale, à travers lequel elles interagissent avec le domaine juxta-membranaire de gp130 (Haan et al., 2001). La fixation de l'IL-6 sur son récepteur induit le recrutement, puis la dimérisation de gp130, et ce changement de conformation favorise l'activation des kinases JAK par transphosphorylation. Les JAK peuvent ainsi phosphoryler six résidus Tyrosine au niveau de la partie cytoplasmique de gp130, ce qui crée des sites d'ancrage pour les molécules dotées d'un domaine SH2.

##### 2.2.3.2.3.1 Voie STAT

Les protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) font partie d'une famille de 7 membres (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6) de facteurs de transcription. Elles ont une structure conservée, avec un site de liaison à l'ADN, un domaine d'oligomérisation coiled-coil et un domaine SH2 leur permettant de se fixer sur des motifs contenant des Tyrosines phosphorylées (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998; Vinkemeier et al., 1998). Certaines protéines STAT sont capables de former des hétérodimères, tandis que d'autres ne sont activées que sous forme d'homodimères. Une stimulation par l'IL-6 active principalement STAT3, mais aussi STAT1, dans une moindre mesure. L'activation des STAT requiert une association transitoire avec un récepteur de cytokine via leur

domaine SH2 (Heim et al., 1995; Hemmann et al., 1996; Stahl et al., 1995). STAT3 se lie à différents motifs Y<sup>p</sup>XXQ sur gp130 : Y<sup>767</sup>RHQ, Y<sup>814</sup>FKQ, Y<sup>905</sup>LPQ et Y<sup>915</sup>MPQ. STAT1 se lie aux motifs de type Y<sup>p</sup>XPQ : Y<sup>905</sup>LPQ and Y<sup>915</sup>MPQ (Gerhartz et al., 1996). Suite à leur interaction avec le récepteur, les facteurs STAT sont phosphorylés sur un résidu Tyrosine (Tyr<sup>701</sup> pour STAT1 et Tyr<sup>705</sup> pour STAT3) (Kaptein et al., 1996; Shuai et al., 1993). Cela favorise la formation de dimères de STAT via leur domaine SH2 (Shuai et al., 1994). Les dimères actifs peuvent ensuite pénétrer dans le noyau afin d'exercer leur rôle de facteur de transcription et permettre l'expression de gènes impliqués dans divers processus cellulaires tels que la survie et la régulation du cycle cellulaire.

#### 2.2.3.2.3.2 Rôle de la Tyrosine phosphatase SHP2

Une stimulation par l'IL-6 n'active pas uniquement la voie JAK/STAT, elle induit aussi l'activation de la voie des MAP kinases par l'intermédiaire de la Tyrosine phosphatase SHP2 (SH2 domain containing Tyrosine Phosphatase) (Kim and Baumann, 1999). La protéine SHP2 peut en effet se lier au résidu phosphorylé Tyr<sup>759</sup> de gp130 (Stahl et al., 1995) et être phosphorylée de manière JAK1 dépendante (Schaper et al., 1998). Les résidus Tyr<sup>542</sup> et Tyr<sup>580</sup> de SHP2 permettent le recrutement du complexe Grb2/Sos au récepteur (Fukada et al., 1996; Holgado-Madruga et al., 1996; Schiemann et al., 1997). Le facteur d'échange Sos étant à proximité de la membrane plasmique, il peut activer la petite GTPase Ras, ce qui permet d'activer toute la voie ERK. Alternativement, la phosphatase SHP2 peut lier Gab1 (Grb2-associated binder-1), protéine adaptatrice localisée à la membrane plasmique par un domaine PH, et qui contient des sites de liaison pour Grb2, SHP2, PI3K, Crk, PLC $\gamma$  et le récepteur c-Met (Gu et al., 1998; Holgado-Madruga et al., 1996; Liu and Rohrschneider, 2002; Schaeper et al., 2000). L'IL-6 déclenche la phosphorylation de Gab1 sur un résidu Tyrosine, il peut ainsi interagir avec SHP2 et p85 $\alpha$ , ce qui implique aussi une activation de la voie PI3K/Akt. Par ailleurs, l'interaction entre SH2 et Gab1 peut mener à l'activation de la MAP kinase ERK2 (Takahashi-Tezuka et al., 1998).

#### 2.2.3.2.4 Terminaison du signal

En condition physiologique, pour éviter une hyper stimulation des voies induites par l'IL-6, divers mécanismes de rétrocontrôles négatifs sont mis en place. Trois d'entre eux sont décrits ci-dessous.

La protéine SHP2 décrite ci-dessus pour avoir un rôle positif dans le signal de l'IL-6, en activant des cascades de signalisations telles que la voie des MAP kinases et la voie PI3K/Akt, joue aussi un rôle dans l'inhibition de la signalisation du récepteur à l'IL-6. En effet la protéine SHP2 a un domaine phosphatase en position C-terminale, dont l'activité catalytique est permise lorsque la protéine est liée à la Tyr<sup>759</sup> phosphorylée du domaine cytoplasmique de gp130 (Lechleider et al., 1993; Pluskey et al., 1995; Sugimoto et al., 1994), ou lorsque SHP2 est phosphorylée sur les résidus Tyr<sup>542</sup> et Tyr<sup>580</sup> (Lu

et al., 2001a). La phosphatase ainsi activée peut déphosphoryler gp130, JAK et STAT (Gunaje and Bhat, 2001; Lehmann et al., 2003), et ainsi inhiber la signalisation en réponse à l'IL-6.

Les protéines PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) sont des corégulateurs transcriptionnels des facteurs STAT (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998; Valdez et al., 1997). La PIAS3 a notamment été décrite pour inhiber spécifiquement les gènes cibles de STAT3 en réponse à l'IL-6 (Chung et al., 1997). L'interaction entre les protéines PIAS et les facteurs STAT nécessite une phosphorylation sur un résidu Tyrosine au niveau de STAT.

L'expression des protéines SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling), notamment SOCS1 et SOCS3 est induite par le facteur de transcription STAT3 en réponse à l'IL-6. Elles sont toutes deux capables d'inhiber la phosphorylation de gp130, JAK et STAT (Naka et al., 1997; Starr et al., 1997). Pour exemple, SOCS1, via son domaine SH2, interagit avec la boucle d'activation du domaine kinase de JAK pour inhiber son activité catalytique à l'aide de son domaine KIR (Kinase Inhibitory Region) (Yasukawa et al., 1999). La protéine SOCS3, quant à elle, peut se lier à la Tyr<sup>759</sup> de gp130, et ainsi entrer en compétition avec la phosphatase SHP2 (De Souza et al., 2002; Nicholson et al., 2000; Schmitz et al., 2000). De plus il a été montré que les protéines SOCS sont impliquées dans la dégradation des protéines avec lesquelles elles interagissent. Elles peuvent en effet faire partie du complexe E3 Ubiquitin Ligase et interagir avec l'Elongin C via leur boîte SOCS (Kamura et al., 1998; Zhang et al., 1999). La protéine SOCS1 a notamment été décrite pour adresser la kinase JAK2 au protéasome (De Sepulveda et al., 2000; Frantsve et al., 2001; Kamizono et al., 2001; Rui et al., 2002; Ungureanu et al., 2002).

## 2.3 Le contexte pathologique

### 2.3.1 Le cancer de la prostate

#### 2.3.1.1 Incidence et mortalité

Le cancer de la prostate est le cancer dont l'incidence est la plus élevée en France et dans les pays d'Europe et d'Amérique du Nord. En 2005, 62245 nouveaux cas ont été décelés en France, ce qui représente près de 20% de l'ensemble des cancers. Aux Etats-Unis en 2006, 234460 cas ont été diagnostiqués (Penson and Chan, 2007). L'incidence du cancer de la prostate en France est en hausse depuis 20 ans, elle a augmenté de +6,3% entre 1980 et 2005, et de +8,5% entre 2000 et 2005 ; ce phénomène est dû à un dépistage plus systématique par dosage du PSA (Prostate Specific Antigen). Il faut noter que 95% des nouveaux cas diagnostiqués le sont chez les individus âgés de 50 à 84 ans, la moyenne étant de 71 ans. Malgré son incidence très élevée, le cancer de la prostate n'est pas le plus fatal, il a été à l'origine de 9202 décès en 2005, contre 21000 pour le cancer du poumon. De plus, la mortalité due au cancer de la prostate est en baisse : elle a diminué de 0,9% entre 1980 et 2005, et de 2,5% entre 2000 et 2005. Les statistiques indiquent une survie à 5 ans de 80% pour la tranche d'âge 55-75 ans, qui baisse à 75% pour les individus âgés de 75 à 80 ans. L'âge moyen de décès suite à un cancer de la prostate est de 80 ans. Ces statistiques ont été tirées du rapport de l'Institut National du Cancer édité en Octobre 2009 et intitulé « *La situation du cancer en France en 2009* ».

#### 2.3.1.2 Facteurs de risque

L'âge et les antécédents familiaux constituent les facteurs de risque classiques pour le développement du cancer de la prostate. Mais à ce jour, le rôle des facteurs environnementaux est encore largement débattu. Certaines études suggèrent que la consommation de graisses, de viande rouge, de certaines vitamines, de carotènes et de quantités importantes de produits laitiers, ainsi que l'exposition au cadmium et aux pesticides pourraient augmenter le risque de développer ce type de cancer. Au contraire, l'activité sexuelle, ainsi que la consommation d'alcool ou de tabac n'ont pas été mis en cause en tant que facteurs de risque potentiels.

#### 2.3.1.3 Dépistage

Le plus souvent, le cancer de la prostate n'engendre aucun symptôme au début de son évolution, il est donc nécessaire de mettre en place des protocoles de dépistage systématique. Pour cela, deux examens sont effectués : le dosage du PSA (Prostate Specific Antigen) et le toucher rectal.



Le PSA est une protéine produite en temps normal par la prostate et que l'on retrouve dans le sang, permettant un dosage à partir d'un prélèvement sanguin. Si la concentration en PSA dépasse le seuil de 4 ng/ml, cela indique que la prostate est en souffrance, il peut s'agir d'un adénome (syndrome hyperprolifératif bénin), d'une prostatite (infection de la prostate), ou d'un cancer.

Le toucher rectal consiste en une palpation de la prostate à travers la paroi du rectum. Il permet au médecin de déceler une augmentation de volume, un durcissement de la glande, ou une surface irrégulière. Cet examen ne permet de mettre en évidence que des tumeurs palpables.

Si les deux examens précédents révèlent des anomalies, le diagnostic ne peut être confirmé qu'après une biopsie de la prostate. Les prélèvements de fragments de tissu prostatique sont observés au microscope afin de déceler la présence éventuelle de cellules tumorales.

#### **2.3.1.4 Traitements**

Il existe différents types de traitements qui sont utilisés seuls ou en association, et dont le choix dépend de la situation de chaque patient : la chirurgie, la radiothérapie et l'hormonothérapie.

La prostatectomie totale consiste à éliminer la prostate dans son ensemble avec les vésicules séminales. Ce procédé chirurgical n'est valable que si le cancer est encore localisé, et a pour conséquence une incontinence transitoire ou définitive suite à la lésion du sphincter, et des troubles de l'érection. De plus, les canaux déférents sont sectionnés et ligaturés, ce qui supprime définitivement l'éjaculation.

La radiothérapie consiste à irradier par des rayons X, les cellules tumorales de la prostate afin de les détruire. Ce traitement de 35 à 40 jours a des conséquences sur les systèmes urinaire et digestif, et induit à terme des troubles de l'érection.

L'hormonothérapie est un traitement général qui consiste à empêcher l'action des androgènes sur la prolifération des cellules tumorales, notamment grâce à des molécules qui empêchent l'action des hormones sexuelles mâles : les anti-androgènes (Flutamide, Bicalutamide, Cyprotérone Acetate). C'est le principal traitement lorsque le cancer en est au stade métastatique, mais il a de nombreux effets secondaires liés à la déplétion en hormone sexuelle mâle.



### 2.3.2 Développement tumoral

La carcinogenèse a lieu au niveau de l'épithélium prostatique et résulte notamment de perturbations des signaux entre le stroma et l'épithélium (Hayward et al., 1997). Les conditions environnementales induites par des processus tels que l'inflammation, jouent un rôle dans la transformation de l'épithélium prostatique. Le cancer de la prostate implique différents types cellulaires comme les cellules luminales différenciées qui dépendent des androgènes pour proliférer, et les cellules de type cellules souches ou progénitrices cancéreuses capables de proliférer de manière massive et incontrôlée. Les traitements antihormonaux induisent la mort des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes, mais aboutissent généralement à un échappement tumoral vers l'androgéno-indépendance : les cellules tumorales acquièrent la capacité de proliférer en absence d'hormones mâles.

La notion de cellule souche tumorale est largement acceptée, néanmoins, l'origine de cette cellule hypothétique est actuellement très intensivement débattue (Taylor et al., 2010). Les cellules tumorales ont généralement des caractéristiques spécifiques des cellules luminales, et expriment notamment le récepteur aux androgènes. Cependant, des expériences effectuées sur des populations de cellules murines stromales, basales et luminales et basées sur l'introduction de signaux oncogéniques (surexpression du facteur de transcription de la famille ETS ERG1 ou activation constitutive de la voie PI3K), ont permis à l'équipe de O.N. Witte de montrer que les cellules basales représentent une cible efficace d'initiation du cancer de la prostate, contrairement aux cellules luminales (Lawson et al., 2010). De plus, le marqueur CD133 spécifique des cellules souches a aussi été retrouvé dans les cellules tumorales (Collins et al., 2005; Richardson et al., 2004). Ainsi, les cellules tumorales expriment à la fois un marqueur de cellules souches, et de cellules luminales. Cela soulève deux hypothèses : soit les cellules CD133<sup>+</sup> sont les cellules souches tumorales, et expriment le récepteur aux androgènes, soit les cellules luminales acquièrent l'expression de CD133 ainsi que des capacités de cellule souche (Vander Griend et al., 2008). Finalement, le phénotype des cellules tumorales est connu, mais leur point d'origine fait encore l'objet de débats.

#### 2.3.2.1 Initiation

Les événements associés à l'initiation du cancer de la prostate ne sont pas précisément connus, mais certaines données indiquent que ce cancer se développe suite à des lésions de l'épithélium prostatique, comme des atrophies inflammatoires chroniques (Hudson, 2004; Hussain et al., 2003; Palapattu et al., 2005; Schalken and van Leenders, 2003; van Leenders et al., 2003). Ces lésions, dues

à des infections ou à une exposition prolongée à des toxines, entraînent une réponse inflammatoire qui peut induire des dommages oxydatifs sur les cellules épithéliales (Hussain et al., 2003).

L'inflammation est un phénomène complexe impliquant des cytokines et des cellules du système immunitaire (leucocytes, granulocytes, lymphocytes). Le but de la réponse inflammatoire est de créer un microenvironnement au niveau de la lésion tissulaire, permettant la reconnaissance et la destruction des cellules endommagées, ainsi que l'élimination des particules étrangères (Coussens and Werb, 2002).

Cependant, les radicaux oxygénés et azotés ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$ , ROS, RNOS), qui sont les premiers médiateurs de cette réponse inflammatoire, sont aussi décrits pour altérer les structures protéiques, causer la peroxydation des lipides et induire des mutations génétiques (Beckman and Koppenol, 1996; Ernst and Gold, 2000; Espey et al., 2002). Ainsi, les radicaux libres engendrent des modifications post-traductionnelles sur des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, l'apoptose, la signalisation ou les réactions enzymatiques (Jaiswal et al., 2001; Melino et al., 1997; Pervin et al., 2001). Pour exemple, dans un modèle d'inflammation chronique non prostatique (tissus de patients atteints de recto-colite ulcéro-hémorragique), l'espèce réactive  $\text{NO}^\bullet$  est capable de causer des modifications structurales de la protéine p53 qui affectent sa fonction dans le cycle cellulaire (Hofseth et al., 2003). Les altérations génétiques observées dans le cancer de la prostate concernent notamment les suppresseurs de tumeur PTEN et NKX3.1, ainsi que le proto-oncogène c-myc (Ellwood-Yen et al., 2003; Iwata et al., 2010; Ma et al., 2005). Ces différentes données indiquent que les radicaux libres ont un rôle transformant, et que par leur intermédiaire, l'inflammation peut favoriser la carcinogenèse de la prostate (voir aussi paragraphe 2.3.3.3. IL-6, page 74).

### **2.3.2.2 Progression tumorale**

Il existe dans la prostate un petit groupe de cellules souches épithéliales, ainsi que des cellules progénitrices (cellules T/A), impliquées dans le renouvellement cellulaire au cours des processus de régénération de la prostate (voir paragraphe 2.1.1.2.2. Compartiment prolifératif, page 18). Les cellules progénitrices partagent certaines caractéristiques avec les cellules souches, comme la croissance illimitée ou la capacité à générer différents types cellulaires plus différenciés. Cette population cellulaire pourrait être la cible des altérations génétiques induites par les substances toxiques libérées lors de l'inflammation. Il est possible que ces altérations génétiques dérégulent les cascades de signalisation mitogéniques, fournissant alors des progéniteurs cancéreux. En effet, les tumeurs sont composées d'une population hétérogène de cellules épithéliales montrant divers degrés de différenciation, une prolifération illimitée et un taux réduit de mort cellulaire par apoptose

(Hudson, 2004; Schalken and van Leenders, 2003; van Leenders et al., 2003). Par ailleurs, de nombreuses voies de signalisation sont dérégulées dans les cellules progénitrices cancéreuses des tumeurs de la prostate (Voies des Androgènes, des Œstrogènes, de l'EGF, du TGF- $\alpha$ , du TGF- $\beta$ , de Hedgehog, de Wnt/ $\beta$ -caténine) (voir paragraphe 2.3.3. Aspects moléculaires de la signalisation tumorale, page 72) (Mimeault and Batra, 2006).

#### **2.3.2.2.1 Stade androgéno-dépendant**

La croissance du cancer de la prostate dépend du ratio entre les cellules qui prolifèrent et celles qui meurent. Les androgènes régulent ce ratio, d'une part en stimulant la prolifération cellulaire, et d'autre part en inhibant l'apoptose. La quantité d'androgènes présente dans l'environnement est donc cruciale pour la survie et la prolifération des cellules tumorales. Les traitements par hormonothérapie qui consistent en une suppression des androgènes causent une régression du cancer. En effet, en absence d'androgènes, le taux de prolifération cellulaire est réduit, tandis que le taux de mort cellulaire est augmenté, menant à l'extinction des cellules tumorales (Denmeade et al., 1996).

Il existe pourtant certaines cellules tumorales qui acquièrent la capacité de survivre dans cet environnement privé d'androgènes. Ce phénomène d'échappement tumoral vers l'androgéno-indépendance constitue un facteur de mauvais pronostic. Ce processus implique différents mécanismes moléculaires permettant au récepteur aux androgènes de fonctionner différemment. Il peut devenir hypersensible aux androgènes, être activé par d'autres hormones stéroïdiennes, ou être transactivé par d'autres voies de signalisation (Feldman and Feldman, 2001).

Au niveau moléculaire, l'hypersensibilité du récepteur aux androgènes n'est pas à proprement parler de l'androgéno-indépendance, puisqu'il requiert la fixation de son ligand pour fonctionner. L'hypersensibilité du récepteur aux androgènes peut être due à une amplification de son gène, qui entraîne une expression intensive du récepteur (Koivisto et al., 1997; Visakorpi et al., 1995), ou à une augmentation de la stabilité de la molécule dans la cellule (Gregory et al., 2001b). Par ailleurs, une augmentation de l'activité enzymatique de la 5 $\alpha$ -Réductase, peut maintenir un niveau de DHT suffisant dans les cellules pour activer le récepteur aux androgènes (Labrie et al., 1986). De même, certains mécanismes peuvent faciliter la signalisation du récepteur aux androgènes, comme une relocalisation dans le noyau plus efficace, ou une augmentation de l'expression de ses co-activateurs (Gregory et al., 2001a). Ces différents processus permettent au récepteur aux androgènes de fonctionner efficacement, même en présence d'une faible quantité d'androgènes.

### 2.3.2.2.2 Stade androgéno-indépendant

Il existe deux mécanismes d'activation du récepteur aux androgènes qui n'impliquent pas la présence de son ligand naturel. Ces mécanismes sont strictement androgéno-indépendants.

Le récepteur aux androgènes peut en effet perdre la spécificité pour son ligand, et être activé par d'autres hormones stéroïdiennes, ou même par des antagonistes (Gottlieb et al., 1998; Small and Srinivas, 1995; Zhao et al., 2000). Cette perte de spécificité est due à des mutations génétiques altérant le domaine de liaison au ligand (T877A ou L701H) (Gaddipati et al., 1994; Veldscholte et al., 1992a; Zhao et al., 1999). La fréquence de ce type de mutation est augmentée dans les tumeurs androgéno-indépendantes par rapport aux prélèvements effectués avant l'hormonothérapie (Marcelli et al., 2000; Taplin et al., 1995; Tilley et al., 1996). Cela indique que ces mutations sont sélectionnées au cours de l'échappement tumoral car elles confèrent un avantage prolifératif aux cellules qui les portent.

Alternativement, le récepteur aux androgènes peut être activé par des mécanismes indépendants du ligand, il est alors qualifié de « récepteur hors-la-loi » (outlaw receptor) (McGuire et al., 1991). Ce mécanisme de transactivation implique d'autres voies de signalisation. Certains facteurs de croissance comme l'IGF-1, le KGF et l'EGF, par l'intermédiaire des cascades de signalisation qu'ils induisent, peuvent activer le récepteur aux androgènes, lui permettant de favoriser l'expression de ses gènes cibles (Culig et al., 1994). Par exemple, le récepteur à activité tyrosine kinase de la famille de l'EGF-R, ERBB2, est capable d'activer le récepteur aux androgènes par l'intermédiaire de la voie des MAP kinases, en le phosphorylant (Yeh et al., 1999). Ce même récepteur ERBB2 peut aussi activer le RA par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt, car Akt peut phosphoryler le RA sur les résidus Ser<sup>213</sup> et Ser<sup>791</sup> afin de l'activer (Wen et al., 2000; Zhou et al., 2000). Par ailleurs, l'adaptateur CRKL (Chicken tumor virus number-10 Regulator of Kinase-Like protein) qui interagit avec le récepteur aux androgènes et favorise l'expression de ses gènes cibles, participe à la restauration de l'activité transcriptionnelle du RA en présence de son inhibiteur non-stéroïdien (Bicalutamide) (Reebye et al., 2010)

### 2.3.2.3 Stade métastatique

Le stade métastatique constitue l'étape ultime de la progression tumorale. La tumeur localisée finit en effet par acquérir des capacités invasives, ce qui permet aux cellules tumorales de se disperser dans les tissus périphériques par l'intermédiaire des canaux lymphatiques et des vaisseaux sanguins. Les premières zones colonisées sont les ganglions lymphatiques pelviens, puis les métastases de cancer de prostate peuvent ensuite se retrouver au niveau des ganglions distaux, du cerveau, du foie,

Introduction

des poumons, mais surtout des os, leur site métastatique favori (Chen et al., 2004; Chung et al., 2005; De et al., 2003; Deftos et al., 2005). Divers facteurs de croissance sont impliqués dans la migration cellulaire et l'invasion tumorale, comme l'EGF, l'IGF et le VEGF.

### 2.3.3 Aspects moléculaires de la signalisation tumorale

#### 2.3.3.1 Hormones stéroïdiennes

##### 2.3.3.1.1 Androgènes

Les androgènes sont nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules tumorales de stade androgéno-dépendant. Le récepteur aux androgènes, en tant que facteur de transcription, permet l'expression de gènes impliqués dans le développement du cancer de la prostate (Suzuki et al., 2003). Il favorise notamment l'expression de l'EGF-R, de c-Myc et de la cavéoline-1, protéines impliquées dans la survie, la prolifération, ou l'invasion (Bernard et al., 2003; Li et al., 2001; Topping et al., 2003). Par ailleurs, les androgènes régulent négativement l'accumulation de céramides dans les cellules tumorales, ce qui a pour effet d'inhiber l'apoptose. En effet, en absence d'androgènes, la Céramide-C<sub>16</sub> endogène s'accumule ; il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub>, suivi d'une entrée des cellules tumorales en apoptose (Eto et al., 2003; Kimura et al., 2001; Mimeault and Batra, 2006).

Les mécanismes grâce auxquels la tumeur s'accommode de la pénurie d'androgènes dans l'environnement ont été évoqués précédemment (voir paragraphe 2.3.2.2.2. Stade androgéno-indépendant, page 70), et mettent notamment en cause des mutations ponctuelles du récepteur aux androgènes au niveau de son domaine de fixation au ligand. Ces mutations entraînent une activation du récepteur aux androgènes par des molécules anti-androgènes ou par d'autres hormones stéroïdiennes comme les œstrogènes ou la progestérone (Feldman and Feldman, 2001; Horoszewicz et al., 1983; Taplin and Balk, 2004; Veldscholte et al., 1992a). Cette dérégulation du récepteur aux androgènes lui permet de fonctionner dans un environnement différent. De plus, le récepteur aux androgènes peut être activé par d'autres voies de signalisation, cette notion sera abordée par la suite (voir paragraphe 2.4. Emergence de connexions entre les voies de signalisation, page 79).

##### 2.3.3.1.2 Œstrogènes

Chez l'homme âgé, le cancer de la prostate se développe dans un environnement dominé par les œstrogènes et dans lequel les niveaux d'androgènes diminuent (Ho, 2004). Certaines études menées sur des lignées cellulaires d'origine métastatique (LNCaP, DU-145, PC3) ont montré qu'elles expriment ER- $\beta$  et/ou ER- $\alpha$  (Cheung et al., 2005; Lau et al., 2000). Ces mêmes lignées cellulaires expriment des niveaux significatifs d'aromatase, enzyme qui catalyse la transformation de la testostérone en estradiol (E2), ligand du récepteur aux œstrogènes (Ellem et al., 2004). Dans ce contexte, il a été montré que le ligand E2 induit la prolifération des cellules LNCaP, et cet effet est réprimé par des inhibiteurs du récepteur aux œstrogènes, mais aussi par des inhibiteurs du récepteur

aux androgènes (Maggiolini et al., 2004). Cela indique qu'il existe un lien entre la voie du récepteur aux androgènes et la voie du récepteur aux œstrogènes dans les cellules tumorales de stade métastatique. Alternativement, le récepteur aux androgènes, qui est muté dans les cellules LNCaP, pourrait être activé directement par un ligand naturel du récepteur aux œstrogènes, comme cela a été démontré dans des cellules de patients (Elo et al., 1995).

### 2.3.3.2 EGF

Dans les cellules tumorales, une activation aberrante du récepteur à l'EGF et des récepteurs de la famille ERBB, qu'elle soit dépendante ou non d'un ligand, induit la prolifération, la survie, la migration, et l'échappement métastatique (Hynes and Lane, 2005; Jorissen et al., 2003). Les récepteurs de la famille ERBB et leurs ligands sont souvent retrouvés surexprimés dans les cellules tumorales (Normanno et al., 2006). Si le récepteur à l'EGF peut être activé par ses ligands de manière autocrine ou paracrine, il peut aussi être rendu constitutivement actif par des mutations comme une délétion du domaine extracellulaire ou une mutation sur le domaine kinase (Normanno et al., 2006; Wieduwilt and Moasser, 2008). Les voies de signalisation induites par le récepteur à l'EGF sont impliquées dans la prolifération, la survie ou l'invasion des cellules tumorales et semblent contribuer à la progression tumorale du stade localisé au stade métastatique (Bonaccorsi et al., 2004b; Lu and Kang, 2010; Mimeault et al., 2006; Mimeault et al., 2003; Torring et al., 2003).

En ce qui concerne le cancer de la prostate, la surexpression du récepteur à l'EGF et de certains de ses ligands (EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, amphiréguline) est corrélée avec l'agressivité tumorale ; c'est un signe de mauvais pronostic et de résistance aux traitements (Bartlett et al., 2005; Bostwick et al., 2004; Di Lorenzo et al., 2002; Hernes et al., 2004; Kambhampati et al., 2005; Mimeault et al., 2006; Mimeault et al., 2003; Zellweger et al., 2005).

L'EGF joue un rôle dans le microenvironnement tumoral, et surtout dans l'interaction entre les cellules tumorales et le stroma (De Luca et al., 2008). En effet, l'EGF peut provoquer des perturbations de l'adhésion entre les cellules épithéliales et la lame basale dans le but de faciliter l'invasion des cellules tumorales (DU-145). Pour cela, il induit la déphosphorylation, donc l'inactivation des kinases d'adhésion focale (FAK), et favorise l'endocytose de l'E-Cadhérine grâce à la Cavéoline-1 (Lu et al., 2001b). Par ailleurs, l'EGF stimule l'expression du VEGF par les cellules tumorales, et par cet intermédiaire, il a un effet mitogénique sur les cellules endothéliales associées à la tumeur (De Luca et al., 2008). Cela permet d'une part d'irriguer la tumeur, et d'autre part d'offrir un moyen de dispersion aux cellules tumorales.

Il faut noter que le signal induit par l'EGF est important dans le développement des métastases osseuses (Kim et al., 2003). L'EGF est en effet exprimé par le stroma ostéogénique (Festuccia et al., 2005). De plus, l'EGF et le TGF- $\alpha$  favorisent la résorption osseuse par les ostéoclastes, ce qui libère de la place pour que les cellules métastatiques puissent s'ancrer (De Luca et al., 2008).

### 2.3.3.3 IL-6

L'Interleukine-6 est une cytokine inflammatoire exprimée par les cellules basales de l'épithélium prostatique normal. L'IL-6 est aussi retrouvée dans diverses tumeurs solides, notamment dans les tumeurs prostatiques (Chung et al., 1999; Hobisch et al., 2000; Siegall et al., 1990). De même, le récepteur à l'IL-6 (IL-6R $\alpha$ ) a été détecté dans une majorité d'échantillons de tissus provenant de patients atteints d'hyperplasies bénignes ou de carcinomes prostatiques (Siegsmond et al., 1994). Par ailleurs, le taux d'IL-6 sérique est très élevé chez les patients atteints de cancers hormono-résistants (stade androgéno-indépendant) (Akimoto et al., 1998; Drachenberg et al., 1999; Michalaki et al., 2004; Twillie et al., 1995). Ainsi, un taux d'IL-6 circulant élevé constitue un facteur de mauvais pronostic pour le patient atteint d'un adénocarcinome de prostate (George et al., 2005; Nakashima et al., 2000).

Dans des lignées de cellules tumorales (LNCaP et DU-145), l'IL-6 transmet un signal anti-apoptotique en activant la voie PI3-K/Akt (Chung et al., 2000). L'activité catalytique de la kinase Akt permet en effet la phosphorylation de différentes cibles jouant des rôles importants dans la survie cellulaire, et la résistance à l'apoptose (Feldman and Feldman, 2001). L'IL-6 peut aussi favoriser la prolifération des lignées cellulaires dérivées de métastases insensibles aux androgènes (PC-3 et Du-145), mais son effet sur les cellules androgéno-sensibles (LNCaP) est plus controversé. Certaines équipes de recherche affirment que l'IL-6 stimule leur croissance, tandis que d'autres décrivent une inhibition de la prolifération (Degeorges et al., 1996; Giri et al., 2001; Mori et al., 1999; Okamoto et al., 1997; Spiotto and Chung, 2000). L'IL-6 semble en effet subir une transition fonctionnelle d'un effet paracrine inhibant la croissance, vers un effet autocrine stimulant la prolifération, au cours de l'échappement tumoral vers l'androgéno-indépendance (Chung et al., 1999). Par ailleurs, l'IL-6 semble être impliquée dans les processus associés à la progression tumorale, comme l'invasion et l'angiogenèse. En effet, une stimulation à long-terme par l'IL-6 induit, dans les cellules LNCaP, la sécrétion du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), gène-cible du facteur de transcription STAT3, et surtout, facteur-clé de l'angiogenèse (Steiner et al., 2004). Conjointement, la stimulation paracrine des cellules LNCaP par l'IL-6 produite par les cellules DU-145 en co-culture, induit, dans les cellules LNCaP, la sécrétion de la promatrilysine (Matrix Metalloproteinase 7) dont le rôle est de



dégrader la matrice extracellulaire (Stratton et al., 2001). Cela indique un rôle de la sécrétion paracrine d'IL-6 par les cellules stromales ou les cellules tumorales voisines, sur l'invasion tumorale.

Divers stimuli sont à l'origine de la surexpression de l'IL-6 dans les cellules cancéreuses, notamment l'hypoxie et le TGF- $\beta$ . Les mécanismes mis en jeu passent par l'action du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, cible d'Akt, activée notamment par l'IL-6. En effet, les cellules PC-3 et DU-145 expriment les sous-unités p50 et p65 de NF- $\kappa$ B de manière constitutive, contrairement aux cellules LNCaP (androgéno-dépendantes). Par ailleurs, la surexpression de l'inhibiteur I $\kappa$ B de NF- $\kappa$ B dans les cellules PC-3 et DU-145 entraîne une réduction drastique de l'expression de l'IL-6 (Zerbini et al., 2003).

Dans les cellules souches embryonnaires murines, l'hypoxie induit la libération de radicaux oxygénés (ROS) qui activent les MAP kinases p38 et SAPK/JNK, qui à leur tour permettent l'activation du facteur de stress NF- $\kappa$ B, puis celle du facteur de transcription spécifique de l'hypoxie HIF-1 $\alpha$ . Cette cascade de signalisation aboutit à l'expression des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, ainsi qu'à la production de la cytokine inflammatoire IL-6 (Lee et al., 2010). Le niveau d'expression du TGF- $\beta$  est élevé chez les patients atteints d'un cancer de la prostate. Dans les cellules PC-3 et DU-145, le TGF- $\beta$  agit par l'intermédiaire de l'activation de Smad2 et des MAP kinases p38, qui phosphorylent l'inhibiteur I $\kappa$ B, donc favorisent la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Park et al., 2003).

Les androgènes ont un effet inhibiteur sur l'activité de NF- $\kappa$ B, donc un blocage des androgènes par les traitements antihormonaux favorise l'expression de l'IL-6 par les cellules cancéreuses. Cette action autocrine de l'IL-6 sur les cellules tumorales favorise leur survie et leur prolifération, ce qui peut expliquer l'émergence de l'androgéno-indépendance (Keller et al., 1996).

### **2.3.3.4 Autres cytokines**

#### **2.3.3.4.1 TGF- $\beta$**

Les cytokines de la famille du TGF- $\beta$  jouent un rôle dans l'homéostasie tissulaire en régulant la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules stromales et épithéliales. Le TGF- $\beta$  peut avoir un rôle aussi bien positif que négatif sur la prolifération pendant le développement de l'épithélium prostatique. Cela varie le long de l'axe proximal-distal des canaux en formation (voir paragraphe 2.1.3.4.2. TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), page 30)

Dans les cellules LNCaP, le TGF- $\beta$  induit l'apoptose en agissant notamment sur deux de ses effecteurs : la cofiline subit une translocation mitochondriale, et la prohibitine est exportée du noyau vers le cytoplasme. La perte du récepteur T $\beta$ RII ou de la cofiline réduit l'apoptose et induit l'invasion cellulaire (Zhu et al., 2006). De même, l'inhibition du signal induit par le TGF- $\beta$  réduit la progression

tumorale chez la souris *nude* (Zhang et al., 2005). Au contraire, la stimulation du récepteur aux androgènes par la DHT augmente l'apoptose induite par le TGF- $\beta$  (Bruckheimer and Kyprianou, 2001).

Au cours de la progression tumorale vers l'androgéno-indépendance, les cellules deviennent insensibles à l'action inhibitrice du TGF- $\beta$  sur leur croissance, suite à la perte ou à la mutation de ses effecteurs ou de son récepteur (Akhurst and Derynck, 2001), notamment par méthylation de son promoteur (Zhao et al., 2005). Conjointement, le TGF- $\beta$  est surexprimé dans les adénocarcinomes de prostate de stade avancé, et exerce diverses fonctions sur les cellules via les voies de signalisation dépendantes et indépendantes des Smad (Derynck and Zhang, 2003; Roberts et al., 1986; Zhu and Kyprianou, 2005). Ainsi, une forte expression du ligand TGF- $\beta$ 1, associée à une perte de son récepteur a des effets pro-oncogénique, et est donc facteur de mauvais pronostic (Gerdes et al., 2004). Par ailleurs, dans la lignée de carcinome de prostate androgéno-indépendant PC-3, le TGF- $\beta$ 2 favorise la survie et la résistance à l'apoptose en stimulant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Lu et al., 2004).

Le TGF- $\beta$  est aussi impliqué dans les processus d'invasion tumorale et le développement des métastases osseuses. Il est en effet capable d'induire l'expression de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, thrombospondine, ostéopontine, ostéonectine, élastine, ou inhibiteurs de métalloprotéases) nécessaires à la migration des cellules tumorales et à leur survie dans les niches de métastases osseuses (Chung et al., 2003).

Il faut noter que dans les cellules stromales, le TGF- $\beta$  régule positivement l'expression du FGF autant au niveau des transcrits que des protéines (Story et al., 1996).

#### **2.3.3.4.2 FGF**

De nombreux acteurs du signal du FGF sont retrouvés exprimés de manière aberrante dans les tumeurs prostatiques (Dorkin et al., 1999; Giri and Ittmann, 1999). La surexpression de l'isoforme du récepteur FGFR2IIIb dans les cellules tumorales, restaure notamment leur différenciation (Feng et al., 1997; Matsubara et al., 1998). Ainsi sa perte ou son épissage en FGFR2IIIc dans les cellules épithéliales est favorable à la progression tumorale (Kwabi-Addo et al., 2001; Naimi et al., 2002; Wu et al., 2003). De même, les cellules tumorales expriment le récepteur FGFR1, normalement restreint au compartiment stromal, cela favorise l'établissement d'une boucle autocrine par l'expression de FGF (Feng et al., 1997; Giri and Ittmann, 1999; Wang et al., 2002a; Yan et al., 1993). De plus, une hausse de l'expression de FGF-10 dans le stroma prostatique, associée à l'expression du récepteur

FGFR1 dans l'épithélium participe à l'induction de la transformation tumorale (Acevedo et al., 2007; Lin and Wang, 2010; Memarzadeh et al., 2007).

Les modifications de l'expression de différents membres de la famille des FGF, ainsi que de leurs récepteurs sont impliquées dans la progression tumorale vers l'androgéno-indépendance. En effet, les FGF-1, 2, 6, 7 et 8 voient leur expression augmenter dans les cellules du stroma tumoral. De même, les récepteurs FGFR-1 et FGFR-4 présents à la surface des cellules d'adénocarcinome de prostate, sont associés à la progression tumorale. Les FGFR activent diverses voies de signalisation, incluant celles de la Phospholipase C $\gamma$ , la PI3K/Akt et les MAP kinases. Ainsi ils favorisent la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, l'invasion, l'angiogenèse et surtout la progression vers l'androgéno-indépendance (Kwabi-Addo et al., 2004; Niu and Xia, 2009).

#### **2.3.3.4.3 HGF**

Le HGF joue un rôle dans la régulation de la prolifération, la mobilité, la morphogenèse et l'angiogenèse au sein des tumeurs. Son expression aberrante, ainsi que celle de son récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (c-Met) est un facteur de mauvais pronostic. Le récepteur aux androgènes réprime l'expression de c-Met via la voie de transcription Sp1 en présence d'androgènes (Verras et al., 2007). En conséquence, une réduction de l'expression des androgènes par ARN interférence induit l'expression et l'activation du récepteur c-Met de l'HGF, ce qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses d'une manière androgéno-indépendante (Maeda et al., 2006).

#### **2.3.3.4.4 IGF-1**

L'IGF-1 est principalement synthétisé par les cellules du stroma en réponse aux androgènes, tandis que son récepteur (IGF-1R) est exprimé à la surface des cellules épithéliales. L'action paracrine de l'IGF-1, sur l'épithélium de prostate, et par l'intermédiaire de c-Jun, permet sa prolifération (Li et al., 2007). Au cours de la progression tumorale, l'expression de l'IGF-1 induite par les androgènes augmente dans les cellules épithéliales. Ainsi l'action de l'IGF-1 sur les cellules tumorales de prostate devient autocrine et stimule la prolifération, tout en réprimant l'apoptose. En effet, une activation du récepteur IGF-1R bloque l'apoptose induite par le TGF- $\beta$ , suggérant une interaction entre ces deux voies de signalisation (Danielpour, 2005).

Une surexpression de l'IGF-1 induit la transformation néoplasique de l'épithélium prostatique murin. A l'inverse, des expériences d'ARN interférence ciblant l'IGF-1R, inhibent la prolifération et l'invasion tumorale. En effet, l'IGF-1 favorise l'invasion des cellules androgéno-indépendantes DU-145 *in vitro* (Saikali et al., 2008). Il faut noter que l'IGF-1 est présent en grande quantité dans les os, principal site

d'implantation des métastases (Ohlson et al., 2007). Cette invasion tumorale induite par l'IGF-1 est réduite par les inhibiteurs spécifiques des voies des MAP kinases et de la PI3 kinase (Saikali et al., 2008).

#### **2.3.3.4.5 VEGF**

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est connu pour son rôle dans l'angiogenèse normale et tumorale, il est donc la cible de thérapies anti-angiogéniques dans le cadre du cancer (Eskens, 2004; Hurwitz et al., 2004). En effet, en conditions pathologiques, notamment au sein de tumeurs androgéno-dépendantes, les androgènes ont été décrits pour réguler l'expression du VEGF par les myofibroblastes du stroma, via l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inductible Factor) (Boddy et al., 2005). Ainsi, le VEGF active de manière paracrine les cellules endothéliales pour stimuler l'angiogenèse, afin d'augmenter la densité des capillaires, ce qui aboutit à la vascularisation de la tumeur en phase croissante (Kimbrow and Simons, 2006; Muir et al., 2006). Il faut noter que dans le contexte du cancer de la prostate, le VEGF n'est pas seulement produit par les cellules stromales, mais aussi par les cellules tumorales de type épithélial (Levine et al., 1998). De plus, une augmentation de l'expression de VEGF-C et VEGFR-3 est associée à la progression tumorale et à l'échappement métastatique vers les ganglions proximaux (Jennbacken et al., 2005). Par ailleurs, les thérapies hormonales réduisent la quantité d'androgènes disponible dans le microenvironnement tumoral. Cela induit un niveau élevé de radicaux oxygénés intracellulaires, ce qui favorise la synthèse du VEGF-C, et active la GTPase RalA, impliquée dans l'oncogénèse (Rinaldo et al., 2007).

## 2.4 Emergence de connexions entre les voies de signalisation

Dans les cellules tumorales, comme dans les cellules normales, les voies de signalisation ne doivent pas être considérées individuellement, car elles sont inter-connectées. Ceci est d'autant plus vrai dans les cellules tumorales où des voies de signalisation synergisent pour favoriser l'hyperprolifération qui confère un avantage sélectif aux cellules cancéreuses. De plus, ces connexions entre les cascades de signalisation jouent un rôle dans l'échappement tumoral vers l'androgéno-indépendance. En effet, les cellules auparavant tributaires des hormones mâles pour leur survie, leur différenciation et leur prolifération, acquièrent la capacité de croître en réponse à d'autres stimuli. Ici, les connexions entre les voies de signalisation seront divisées en deux catégories : la connexion verticale et la connexion horizontale. La connexion verticale est la plus fréquemment observée et concerne les cas au cours desquels un stimulus induit une voie de signalisation qui aboutit au contrôle de l'expression d'un ou plusieurs effecteurs d'une autre voie de signalisation. Et le terme de connexion horizontale englobe tous les cas d'interaction fonctionnelle entre les molécules de deux voies de signalisation, comme la phosphorylation, la séquestration, l'adressage à la dégradation, ou même la transactivation.

### 2.4.1 Relation entre le récepteur aux androgènes et les récepteurs ERBB

#### 2.4.1.1 Connexion verticale

La lignée cellulaire LNCaP dérivée d'un adénocarcinome de prostate androgéno-dépendant est un bon modèle d'étude des interactions entre le récepteur aux androgènes et les récepteurs de la famille ERBB. Dans ces cellules, une inhibition de l'expression du récepteur aux androgènes par ARN interférence induit l'expression du récepteur ERBB2 de la famille de l'EGF-R. L'inhibition de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes par le Bicalutamide, ainsi que la suppression des androgènes dans le milieu de culture ont le même effet positif sur l'expression et l'activation du récepteur ERBB2. Au contraire, une stimulation du récepteur aux androgènes par la DHT réduit l'expression du récepteur ERBB2 au niveau transcriptionnel (Berger et al., 2006).

Réciproquement, des expériences d'ARN interférence ciblant le récepteur ERBB2 ont montré que son absence dans les cellules LNCaP induit l'expression du récepteur aux androgènes observée au niveau protéique (Berger et al., 2006).

Plus récemment, l'équipe de Steven P. Balk a montré que le récepteur à l'EGF ainsi qu'ERBB2 sont impliqués dans l'expression du récepteur aux androgènes dans les cellules de cancer de prostate LNCaP, LAPC4, C4-2 (Cai et al., 2009). Ils ont montré que l'EGF, ligand de l'EGF-R, réduit l'expression

du récepteur aux androgènes indépendamment de l'activation de la PI3 kinase et d'ERK, tandis que l'heréguline- $\beta$ 1, ligand du dimère ERBB2/ERBB3, régule négativement l'expression du récepteur aux androgènes par l'intermédiaire de la PI3-kinase. De plus, l'EGF et l'heréguline- $\beta$ 1 induisent la dégradation de l'ARN messenger du récepteur aux androgènes sans affecter la stabilité de la protéine. La durée de vie du récepteur aux androgènes est même augmentée dans les cellules LNCaP cultivées en absence d'androgènes (Cai et al., 2009).

Afin d'étudier les relations entre le récepteur aux androgènes et le récepteur ERBB2 *in vivo*, des cellules LNCaP ont été injectées à des souris immunodéficientes ; elles forment des tumeurs en six semaines (Berger et al., 2004), après lesquelles certains individus sont castrés. Deux à quatre semaines après la castration, l'expression d'ERBB2 est augmentée significativement et s'accompagne d'une hausse du niveau de PSA sérique (Berger et al., 2006).

Par ailleurs, l'EGF régule positivement l'expression des gènes cibles du récepteur aux androgènes dans les lignées cellulaires cancéreuses (Culig et al., 1994). De plus, les gènes cibles de l'EGF et des androgènes sont exprimés dans un variant androgéno-indépendant de la lignée LNCaP (LNCaP-LNO) en absence de stimulation par les androgènes ou les facteurs de croissance. Parmi ces gènes, 75% sont stimulés aussi bien par l'EGF que par les androgènes (Oosterhoff et al., 2005). Ces données indiquent que le récepteur ERBB2, mais aussi l'EGF-R jouent un rôle dans l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes, même en absence d'androgènes.

Les tumeurs prostatiques qui se développent en absence d'androgènes sont sensibles aux inhibiteurs de l'activité kinase des récepteurs de la famille ERBB. Cependant, en présence d'androgènes, ces tumeurs deviennent insensibles à ce type de traitement (Mellinghoff et al., 2002). Cela suggère que la voie du récepteur aux androgènes court-circuite celle de l'EGF-R pour induire la prolifération, ou que l'activité kinase des récepteurs de la famille ERBB favorise la croissance tumorale en activant la voie du récepteur aux androgènes. Dans ce contexte, des traitements par ARN interférence ciblant à la fois le récepteur aux androgènes et le récepteur ERBB2 induisent la mort cellulaire (Berger et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats indique que le récepteur aux androgènes régule l'expression des récepteurs de la famille ERBB, et réciproquement. En absence d'androgènes, le récepteur ERBB2 peut suppléer le RA et permettre l'expression de ses gènes cibles. Cela correspond au comportement des cellules tumorales exposées à des thérapies hormonales, et qui survivent en s'échappant vers l'androgéno-indépendance.

### 2.4.1.2 Connexion horizontale

Les expériences menées dans deux lignées cellulaires provenant de carcinomes mammaire (MCF-7) et prostatique (LNCaP), montrent que l'inhibition du récepteur aux œstrogènes par le ICI 182 780 et du récepteur aux androgènes par le Bicalutamide, bloque la synthèse d'ADN et les réarrangements du cytosquelette induits par l'EGF (Migliaccio et al., 2005). Réciproquement, dans des cellules issues d'adénocarcinomes de prostate exprimant le récepteur aux androgènes de manière endogène (lignées LAPC4, et LNCaP), une inhibition de l'activité kinase des récepteurs de la famille ERBB par le PKI-166 réduit l'activation du récepteur aux androgènes par son ligand (R1881) (Mellinghoff et al., 2004). Au contraire, l'expression ectopique du récepteur aux androgènes par les cellules androgéno-indépendantes PC-3 leur confère un phénotype moins agressif en interférant avec la signalisation de l'EGF-R (Bonaccorsi et al., 2004a).

Il faut noter que l'inhibiteur PKI-166 est spécifique du récepteur ERBB2 qui n'a aucun ligand connu, et ne peut agir que sous forme d'hétéro-dimère avec ERBB3 et ERBB4. Ces complexes induisent la voie PI3-kinase/Akt qui active une kinase phosphorylant le récepteur aux androgènes au niveau du résidu Ser<sup>81</sup>, site nécessaire à sa stabilité et à sa fonction (Mellinghoff et al., 2004). Donc l'activité kinase du récepteur ERBB2, ainsi que la voie PI3 kinase favorisent l'activité du récepteur aux androgènes dans les cellules tumorales en le stabilisant.

Par ailleurs, une interaction entre le récepteur à l'EGF et le récepteur aux androgènes a été mise en évidence au niveau de la membrane plasmique dans les cellules tumorales LNCaP et PC-3-AR (Bonaccorsi et al., 2004c; Bonaccorsi et al., 2008), ainsi que dans les cellules normales VDEC (Leotoing et al., 2007). Cette association a ensuite été confirmée par immuno-précipitation (Bonaccorsi et al., 2004c). Cette interaction entre l'EGF-R et le RA semble jouer un rôle important dans l'invasion et le développement de métastases du cancer de la prostate (Niu and Xia, 2009).

De plus, une stimulation des cellules LNCaP et MCF-7 par l'EGF induit l'association d'un complexe composé du récepteur à l'EGF, des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes, et de la kinase Src. Ces interactions s'accompagnent de modifications, comme l'activation de Src et la phosphorylation des récepteurs au niveau de résidus Tyrosine (Migliaccio et al., 2005). Des expériences basées sur l'ARN interférence ciblant les récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes, ainsi que sur l'inhibition chimique de la kinase Src par le PP2, montrent que ce complexe est essentiel à l'action de l'EGF en tant que facteur de croissance dans les cellules tumorales (Migliaccio et al., 2005).

Ces différentes données décrivent une interaction fonctionnelle et physique entre les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes, le récepteur à l'EGF et la kinase Src, et suggèrent que cette

connexion favorise la signalisation de l'EGF et des récepteurs stéroïdiens par l'intermédiaire de l'action de la kinase Src, notamment dans les cellules d'adénocarcinomes hormono-dépendants.

## 2.4.2 Relations entre le récepteur aux androgènes et les autres voies

### 2.4.2.1 Connexion verticale

#### 2.4.2.1.1 IL-6

Le niveau d'IL-6 supérieur à 7 pg/ml chez les patients atteints d'un cancer de la prostate androgéno-indépendant, est facteur de mauvais pronostic (Adler et al., 1999; Nakashima et al., 2000; Twillie et al., 1995). Cela indique un lien entre le récepteur aux androgènes et l'IL-6 (Culig et al., 2002). En effet, au cours de la tumorigenèse, les niveaux d'IL-6, sécrétée par le stroma, et d'IL-6R $\alpha$ , exprimé par le stroma et l'épithélium, augmentent dans le tissu prostatique. De plus, les voies JAK/STAT, MAPK, PI3K/Akt sont activées en réponse à l'IL-6 dans les cellules tumorales (Culig et al., 2005).

#### 2.4.2.1.2 IGF-1

Comme pour l'IL-6, des niveaux élevés d'IGF-1 circulant sont corrélés avec une incidence augmentée du cancer de la prostate (Fan et al., 2007; Pollak et al., 1998; Wolk et al., 1998). Cela indique qu'il existe des relations entre les voies de l'IGF-1 et du récepteur aux androgènes. En effet, les androgènes induisent l'expression de l'IGF-1 et de son récepteur dans les cellules de carcinome de prostate, favorisant ainsi leur survie (Zhu and Kyprianou, 2008). A l'inverse, la castration réduit le taux de transcrits de l'IGF-1 dans les tissus normaux, et cette baisse est associée à l'apoptose des cellules épithéliales (Ohlson et al., 2007). Réciproquement, l'IGF-1 stimule l'expression des gènes cibles du récepteur aux androgènes, tandis que l'inhibition de l'IGF-1R aboutit à la rétention du RA dans le cytoplasme, donc à des changements dans l'expression des gènes cibles des androgènes (Wu et al., 2006; York et al., 2005). De plus, la DHT, l'IGF-1 et l'EGF permettent l'expression de 20 gènes communs, cela implique que l'IGF-1 stimule des gènes régulés par les androgènes dans les cellules tumorales (York et al., 2005).

Par ailleurs, l'activation de l'IGF-R1 par son ligand bloque l'apoptose induite par le TGF- $\beta$  dans les cellules épithéliales, indiquant l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les voies de l'IGF-1 et du TGF- $\beta$  (Danielpour, 2005; Niu and Xia, 2009).

#### 2.4.2.1.3 TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est surexprimé au cours de la progression tumorale vers le stade métastatique, et agit via les voies de signalisation dépendantes des Smad (Derynck and Zhang, 2003; Roberts et al., 1986; Zhu



and Kyprianou, 2005). Dans une lignée de cellules tumorales androgéno-indépendantes, exprimant le récepteur aux androgènes de manière ectopique (lignée PC-3-AR), le TGF- $\beta$ 1 supprime l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes en réponse à la DHT, et réduit l'expression de c-myc. Réciproquement, le récepteur aux androgènes réduit l'activité transcriptionnelle des Smad induite par le TGF- $\beta$ 1, inhibant ainsi son action (Chipuk et al., 2002). De plus, la DHT régule négativement l'expression du récepteur T $\beta$ RII au niveau transcriptionnel (Song et al., 2008).

#### **2.4.2.1.4 FGF**

Dans les cellules de prostate, le récepteur aux œstrogènes régule la synthèse de FGF-2 et FGF-7, tandis que le récepteur aux androgènes modifie l'expression de FGF-1, FGF-2, FGF-8 et FGF-10 (Nakano et al., 1999; Rosini et al., 2002; Saric and Shain, 1998). Par ailleurs, les récepteurs FGFR-1 et FGFR-4 jouent un rôle dans la progression tumorale en activant des voies de signalisation impliquées dans l'androgéno-indépendance (Kwabi-Addo et al., 2004; Niu and Xia, 2009).

#### **2.4.2.1.5 VEGF**

Dans les tumeurs androgéno-dépendantes, les androgènes ont été décrits pour réguler l'expression du VEGF via l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Boddy et al., 2005). De même, il existe une forte corrélation entre les expressions des facteurs HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , le VEGF et le récepteur aux androgènes (Banham et al., 2007; Boddy et al., 2005). En effet, la DHT induit un doublement des quantités du VEGF et de son transcrite dans les fibroblastes humains fœtaux (Levine et al., 1998). Au contraire, en absence d'androgènes, l'expression du VEGF diminue dans les cellules de carcinome prostatique (Cheng et al., 2004; Niu and Xia, 2009). Cependant, des expériences menées sur la lignée LNCaP ont montré une augmentation de l'expression du VEGF-C après un sevrage en androgènes (Rinaldo et al., 2007). Ces données indiquent que le récepteur aux androgènes peut être transactivé en absence de son ligand par des signaux environnementaux, comme l'hypoxie (Zhu and Kyprianou, 2008).

### **2.4.2.2 Connexion horizontale**

#### **2.4.2.2.1 IL-6**

Des expériences menées sur la lignée cellulaire androgéno-dépendante LNCaP indiquent que la durée de stimulation par l'IL-6 influence le devenir cellulaire. Un traitement à court terme implique des mécanismes paracrines. Cela inhibe la prolifération des cellules LNCaP et induit leur différenciation en cellules neuroendocrines. Au contraire, un traitement à long terme implique des mécanismes autocrines, favorise la prolifération cellulaire et active la voie du récepteur aux androgènes (Lee et

al., 2007). Cette capacité de l'IL-6 à activer le RA en absence de ligand suggère un rôle de la cytokine pendant la progression tumorale vers l'androgéno-indépendance. Cette hypothèse est confortée par des études menées sur des modèles de xénogreffes de tumeurs de prostate qui montrent qu'un anticorps neutralisant l'action de l'IL-6, induit l'apoptose, réduit la prolifération et ralentit la progression tumorale (Niu and Xia, 2009; Wallner et al., 2006)

#### 2.4.2.2.2 IGF-1

L'IGF-1 favorise la transactivation du récepteur aux androgènes en absence de son ligand, et permet ainsi la prolifération des cellules de carcinome prostatique (Burfeind et al., 1996; Culig et al., 1994; Orio et al., 2002). En effet, l'IGF-1, par l'intermédiaire de son récepteur, induit la voie PI3K/Akt qui phosphoryle, donc inactive la molécule Foxo1. Lorsqu'elle est active, Foxo1 interagit avec le domaine C-terminal du récepteur aux androgènes de manière ligand dépendante et interfère avec sa liaison à l'ADN, elle réduit ainsi l'expression de ses gènes cibles (Fan et al., 2007). Son inactivation par l'IGF-1 participe donc à favoriser l'action du récepteur aux androgènes.

#### 2.4.2.2.3 TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est capable d'induire la translocation du récepteur aux androgènes du noyau vers le cytoplasme, modifiant ainsi son action (Gerdes et al., 2004).

Par ailleurs, via son récepteur T $\beta$ RII et la kinase T $\beta$ RI, le TGF- $\beta$  active Smad3 et Smad4 capables d'interagir avec le récepteur aux androgènes au niveau de ses domaines de liaison à l'ADN et au ligand (Zhu and Kyprianou, 2005). L'interaction entre le récepteur aux androgènes et Smad3 a été décrite *in vitro* et *in vivo* et implique le domaine amino-terminal du récepteur et le domaine MH2 de Smad3 (Hayes et al., 2001). Cette interaction induite par le TGF- $\beta$ , favorise la transactivation du récepteur aux androgènes en présence de DHT (Zhu et al., 2008). Il faut noter que dans les lignées PC-3 et LNCaP, l'addition de Smad3 augmente la transactivation du RA, alors que la co-transfection de Smad3 et Smad4 la réprime (Kang et al., 2002). En effet, le complexe Smad3-Smad4 réduit l'activité du récepteur aux androgènes en l'acétylant.

De plus, l'activité transcriptionnelle des Smad induite par le TGF- $\beta$  est inhibée par la surexpression du co-régulateur ARA55 du récepteur aux androgènes. Cette inhibition est expliquée par l'existence d'une interaction entre ARA55 et Smad3 (Wang et al., 2005; Zhu and Kyprianou, 2008). Par ailleurs, la kinase Pyk2, activée par les MAP kinases, phosphoryle le co-régulateur ARA55 sur le résidu Tyr<sup>43</sup>, ce qui a pour conséquence de l'inactiver et de réprimer la transactivation du récepteur aux androgènes (Wang et al., 2002b).

#### **2.4.2.2.4 FGF**

Il existe une interaction fonctionnelle entre le récepteur aux androgènes et les facteurs FGF-2, 7 et 8 (Niu and Xia, 2009). Par ailleurs, le FGF-10 est sécrété en réponse aux androgènes et active la voie PI3-K/Akt, capable d'induire la transactivation du récepteur aux androgènes (Memarzadeh et al., 2007). A son tour, le récepteur aux androgènes facilite la survie cellulaire induite par le FGF par l'intermédiaire de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Gonzalez-Herrera et al., 2006; Rosini et al., 2002; Zhu and Kyprianou, 2008).

#### **2.4.2.2.5 VEGF**

Les androgènes régulent l'expression du VEGF par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Boddy et al., 2005). Réciproquement, le VEGF-C induit une hausse de l'expression de Bag-1L, co-activateur du récepteur aux androgènes. Cela suggère la transactivation du récepteur aux androgènes par ce facteur de croissance, en présence de doses très faibles d'androgènes et même en leur absence (Rinaldo et al., 2007). Ces données indiquent que le récepteur aux androgènes peut être transactivé en absence de son ligand par l'activation de la voie du VEGF suite à un stress comme l'hypoxie.

### **2.4.3 Relations entre le récepteur à l'EGF et les autres voies**

#### **2.4.3.1 Connexion verticale**

Les relations entre l'EGF-R et les autres voies de signalisation impliquent rarement les connexions de type vertical, puisque peu de facteurs de transcription sont impliqués directement. Cependant, il a été montré dans un contexte de carcinome ovarien – lignées OVCA433 et SKOV3 qui surexpriment le récepteur à l'EGF et expriment le récepteur à l'IL-6 – que l'activation de l'EGF-R par son ligand favorise la prolifération et la migration cellulaire, et induit l'expression de l'IL-6 dans un délai d'une heure. L'activation autocrine de l'IL-6R $\alpha$  stimule JAK2 et STAT3 et favorise la migration cellulaire. Au contraire, une inhibition de la voie de l'IL-6 au niveau de l'IL-6R $\alpha$ , par un anticorps neutralisant, ou au niveau de JAK2, par un inhibiteur chimique, réduit la production d'IL-6 et la mobilité cellulaire (Colomiere et al., 2009). Ces résultats montrent que l'EGF induit l'expression de l'IL-6, qui favorise la mobilité des cellules de carcinome ovarien, via la voie JAK2/STAT3.

#### **2.4.3.2 Connexion horizontale**

Elle implique deux principaux mécanismes : la phosphorylation d'un récepteur induite par l'activation de l'autre voie, et la libération d'un ligand de l'EGF-R suite à la stimulation d'une autre voie.

#### **2.4.3.2.1 Transphosphorylation de l'EGF-R**

Ce premier mécanisme de connexion entre voies de signalisation est le plus étudié à ce jour, il existe donc une quantité d'exemples non négligeable.

##### **2.4.3.2.1.1 IFN $\gamma$**

La lignée cellulaire A431, provenant d'un carcinome épithélial humain, surexprime le récepteur à l'EGF. Sa stimulation par l'Interféron- $\gamma$  induit une phosphorylation de l'EGF-R sur les résidus Tyrosine en position 845, 992, 1045, 1068 et 1148, dès 5 min de traitement. Cette phosphorylation requiert l'activité catalytique de plusieurs kinases : l'EGF-R, Src et JAK2. De plus, l'IFN- $\gamma$  est aussi capable d'induire l'activation de STAT1 et de ERK1/2 par l'intermédiaire de l'activité kinase de l'EGF-R et de Src (Burova et al., 2007). Par ailleurs, ce lien entre l'EGF-R et l'IFN $\gamma$  a été observé plus récemment dans un modèle de cellules endothéliales vasculaires. En effet, une stimulation de ces cellules par l'IFN $\gamma$  induit un rapide clivage de la neuréguline, un pro-ligand membranaire de l'EGF-R. Ainsi activé, l'EGF-R stimule l'activation de la voie ERK1/2, ainsi que l'angiogenèse (Kalinowski et al., 2010). Ces données montrent que l'Interféron- $\gamma$  est capable de transactiver le récepteur à l'EGF par l'intermédiaire de diverses kinases qui impliquent différents mécanismes.

##### **2.4.3.2.1.2 OSM**

L'Oncostatine M est une cytokine pléiotropique identifiée pour sa capacité à inhiber la croissance de plusieurs lignées tumorales (Horn et al., 1990; Zarling et al., 1986). L'OSM fait partie de la famille de l'IL-6, et induit la voie JAK/STAT via le corécepteur gp130. L'OSM inhibe la prolifération des cellules de carcinome mammaire exprimant le récepteur aux œstrogènes, notamment en induisant leur différenciation (Douglas et al., 1998). Des expériences menées sur des lignées cellulaires de cancer du sein, exprimant ou non le récepteur aux œstrogènes, MCF-7 (RE<sup>+</sup>) et MDA-MD-231 (RE<sup>-</sup>), ont montré que l'IL-6 et l'OSM inhibent la prolifération et induisent la différenciation par l'intermédiaire de gp130. Cet effet est amplifié par l'EGF et l'Heréguline, autre ligand de l'EGF-R. De plus, des expériences d'immuno-précipitation ont mis en évidence des associations entre gp130, le récepteur OSMR $\beta$ , ERBB2 et ERBB3. En effet, l'EGF induit la phosphorylation de gp130, tandis que l'OSM favorise la phosphorylation de STAT3, probablement par l'intermédiaire de gp130. Finalement, l'OSM, comme l'EGF sont capables d'activer les MAP kinases (Grant et al., 2002). Ces données indiquent qu'il existe une synergie entre l'Oncostatine M et l'EGF dans les cellules de carcinome mammaire.

#### 2.4.3.2.1.3 IGF-II

Des expériences menées sur des lignées cellulaires issues de carcinomes mammaires (MCF-7 et T47D) et sur leur variant résistant au tamoxifène (Tam-R et T47D-R) ont montré que ces variants expriment le récepteur à l'IGF-I (IGF-IR) à des niveaux moindres que les lignées classiques, alors que le niveau de phosphorylation de l'IGF-IR reste équivalent. Ce résultat s'explique par la sécrétion autocrine de l'IGF-II par les cellules résistantes au tamoxifène. De plus, l'IGF-II induit l'activation du récepteur à l'IGF-I, mais aussi la phosphorylation du récepteur à l'EGF, tandis que l'EGF est capable d'induire uniquement la phosphorylation de son propre récepteur. L'IGF-II peut donc transactiver le récepteur à l'EGF, via la phosphorylation de l'EGF-R sur son résidu Tyr<sup>845</sup> par la kinase Src (Knowlden et al., 2005). Les données mettent en évidence une transactivation du récepteur à l'EGF par l'IGF-II qui favorise la croissance cellulaire. En effet, une inhibition chimique des domaines kinases et l'IGF-IR et de Src réduit la prolifération des cellules tumorales résistantes au tamoxifène (Knowlden et al., 2005).

#### 2.4.3.2.1.4 GH

Le récepteur à l'hormone de croissance (GH) fait partie des récepteurs à cytokines et est fortement exprimé dans le foie, tissu cible de l'hormone de croissance. La fixation de l'hormone de croissance sur son récepteur permet l'activation de la kinase JAK2 et de la voie des MAP kinases.

Des expériences menées sur des lysats extraits de foie murin ont montré que l'hormone de croissance stimule la phosphorylation du récepteur à l'EGF sur son résidu Tyr<sup>1068</sup>, par l'intermédiaire de JAK2. Cette Tyrosine phosphorylée constitue un site d'ancrage pour l'adaptateur Grb2, première étape de l'activation de la voie des MAP kinases (Yamauchi et al., 1997). Ces données montrent une transactivation du récepteur à l'EGF par phosphorylation en réponse à une stimulation par l'hormone de croissance.

Une autre équipe a mis en évidence ce type d'interaction dans la lignée cellulaire de fibroblastes pré-adipocytaires 3T3-F442A qui exprime de manière endogène le récepteur à l'hormone de croissance (GH), et les récepteurs de l'EGF : EGF-R et l'ERBB2. En effet, l'hormone de croissance active JAK2, et induit la phosphorylation du récepteur ERBB2 sur des résidus Sérine et Thréonine, et la phosphorylation de l'EGF-R, qui sert de plateforme de signalisation pour la GH. L'inhibiteur PB98059 spécifique de MEK, bloque ces phosphorylations, à l'inverse de l'inhibiteur de la PKC (Huang et al., 2003). Cela indique que les effets d'une stimulation par l'hormone de croissance sur le récepteur à l'EGF passent par l'action de la kinase MEK dans les cellules de type fibroblastique.

#### 2.4.3.2.1.5 uPAR

L'uPA (Urokinase-type Plasminogen Activator) est une Sérine protéinase qui se lie au récepteur uPAR, et qui est impliquée dans les processus de cicatrisation dans un contexte normal, et dans les processus de migration dans un contexte tumoral (Blasi and Carmeliet, 2002).

Les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) prolifèrent en réponse à l'EGF lorsqu'ils surexpriment le récepteur à l'urokinase, alors qu'en absence de l'uPAR, le niveau de phosphorylation de l'EGF-R sur le résidu Tyr<sup>845</sup> diminue, de même que le taux d'activation de STAT5b. Une surexpression de c-Src restaure le phénotype mitogène de l'EGF. Ces résultats ont ensuite été confirmés à l'aide d'une lignée de cellules de cancer du sein (MDA-MD-231) (Jo et al., 2007). Ces données montrent que le récepteur à l'urokinase favorise l'action du récepteur à l'EGF par l'intermédiaire de la kinase Src, qui phosphoryle l'EGF-R sur la Tyr<sup>845</sup>, site de liaison et d'activation de STAT5b.

Par ailleurs, dans les cellules de cancer de prostate n'exprimant pas le récepteur aux androgènes, les niveaux d'ERBB2 et uPAR sont plus élevés que dans les cellules exprimant le RA. De plus, la sécrétion d'uPA est reliée au phénotype invasif des cellules cultivées en Matrigel. Une inhibition de l'activité kinase de l'EGF-R et d'ERBB2 bloque la migration cellulaire induite par l'uPA, indiquant une connexion entre l'uPAR et l'EGF-R (Festuccia et al., 2005).

#### 2.4.3.2.2 Clivage d'un pro-ligand de l'EGF-R

Ce mécanisme de transactivation du récepteur à l'EGF consiste en un clivage d'un pro-ligand membranaire par des métallo-protéinases de la matrice (MMP) de type ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease). Les ADAM sont logées dans la membrane plasmique, et leur pro-domaine en position N-terminale les maintient dans une conformation inactive. Elles sont activées suite au clivage de ce pro-domaine par les voies de la furine ou de la plasmine, ou bien par d'autres métallo-protéinases. Les ADAM peuvent alors cliver différents pro-ligands selon leur spécificité. Les inhibiteurs TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteases) régulent leur fonction (Murphy, 2008). De plus, le domaine cytoplasmique des ADAM comporte divers sites de phosphorylation, mais aussi un motif PxxP, point d'ancrage des protéines ayant un domaine SH3, il est donc soupçonné de jouer un rôle dans l'activation ou la régulation des ADAM (Kessenbrock et al., 2010; Seals and Courtneidge, 2003). L'action des ADAM libère un pro-ligand de l'EGF-R, qui peut alors agir sur son récepteur, et activer les voies de signalisation en aval, notamment la voie des MAP kinases ERK1/2 (Werry et al., 2005). En effet, une inhibition chimique des ADAM affecte l'activation de ERK (Shah and Catt, 2004).

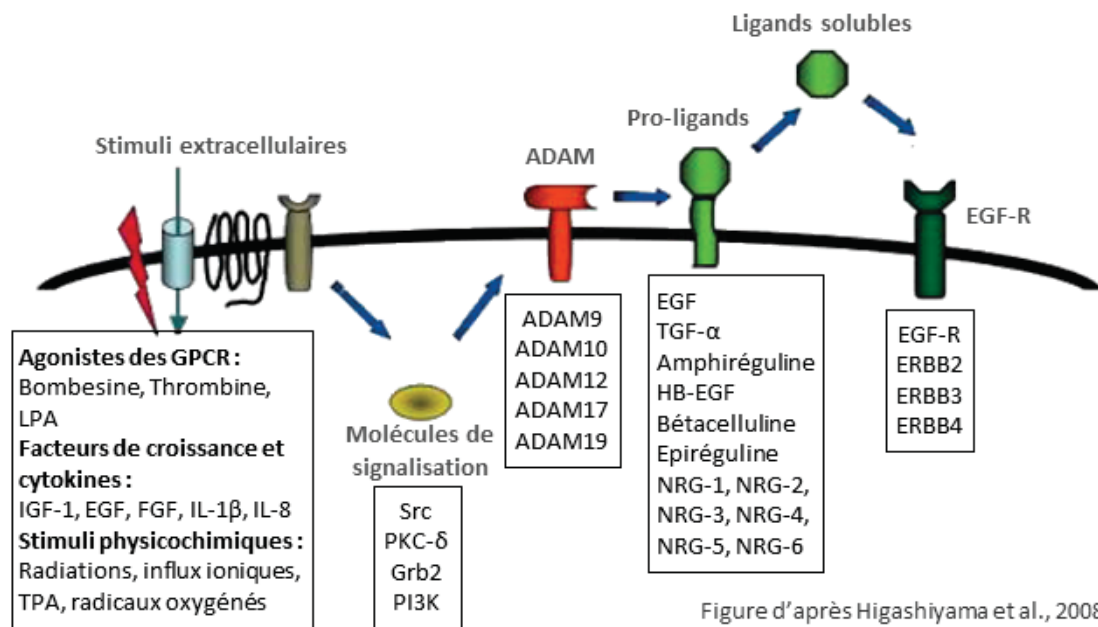


Figure 23 : Mécanisme général de la transactivation de l'EGF-R par le clivage d'un ligand.

Divers stimuli extracellulaires activent des molécules de signalisation capables de favoriser l'action de métalloprotéinases spécifiques, les ADAM. Ces protéines sont responsables du clivage d'un pro-ligand membranaire des récepteurs de la famille ERBB.

Les ADAM sont activées par diverses conditions environnementales et stimuli : les radicaux oxygénés, les radiations, le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), les influx calciques, la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) par le LPA (lysophosphatidic acid), la Bombésine, la stimulation de récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, FGF) ou aux cytokines (IL-1, IL-8). Différentes molécules de signalisation (Src, PKC- $\delta$ , PI3K, Grb2) participent à ce mécanisme selon un mode d'action qui n'est pas encore bien défini (**voir Figure 23**) (Higashiyama et al., 2008). Certains de ces stimuli sont rencontrés au cours de l'inflammation ou de la carcinogenèse. Il faut noter que certaines ADAM sont surexprimées en conditions pathologiques, notamment dans le cadre du cancer et de l'inflammation (Edwards et al., 2008; Higashiyama et al., 2008). En effet, les MMP et les ADAM jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation, l'angiogenèse, l'invasion et l'établissement des métastases (Kessenbrock et al., 2010).

Plusieurs exemples d'une transactivation de l'EGF-R ont été décrits dans les cellules normales et tumorales. Parmi les plus récents, Kasina et coll. ont montré dans les cellules épithéliales de prostate non transformées N15C6, qu'une stimulation par le ligand CXCL12 du récepteur couplé aux protéines G CXCR4, induit le clivage de l'amphiréguline membranaire. Ce mécanisme requiert l'activité kinase de Src et l'activation de la métallo-protéinase ADAM10, et aboutit à la prolifération cellulaire, suite à l'activation de l'EGF-R par l'amphiréguline (Kasina et al., 2009). Par ailleurs, la stimulation de lignées cellulaires cancéreuses d'origine gastrique, par le TGF- $\beta$  induit le clivage du pro-HB-EGF par ADAM17. Il en résulte une augmentation du niveau de phosphorylation de l'EGF-R, associée à la prolifération des cellules (Ebi et al., 2010).



## 2.5 Les objectifs de la thèse

La littérature propose de nombreux exemples de connexions entre les voies de signalisation dans les cellules tumorales. Au contraire, dans les cellules normales, les différentes cascades de signalisation nécessaires à la régulation du devenir de la cellule sont généralement décrites comme étant linéaires. La question que je pose ici est de savoir si les interactions entre voies de signalisation pré-existent dans les cellules normales, sous une forme régulée, et sont exploitées dans les cellules tumorales suite à la disparition de ces contrôles. L'idée serait donc d'identifier des connexions entre voies de signalisation dans les cellules normales, ainsi que les systèmes de régulation qui les accompagnent, afin de pouvoir rétablir ces contrôles et réduire le potentiel prolifératif des cellules tumorales.

Pour mener ces recherches, je me suis intéressée à deux signalisations qui sont impliquées dans des situations physiologiques distinctes.

- ✓ Le signal de IL-6 et son interaction avec la voie de l'EGF. L'IL-6 est un acteur important de l'inflammation, qui est une réponse naturelle à une agression afin de maintenir l'intégrité de l'épithélium prostatique. De plus, l'inflammation est considérée comme un processus impliqué dans l'initiation du développement tumoral (De Marzo et al., 2007).
- ✓ La signalisation non-génomique du récepteur aux androgènes et son lien avec la voie de l'EGF. En accord avec l'hypothèse de travail, cette interaction fonctionnelle déjà décrite dans les cellules tumorales de prostate pourrait être impliquée dans le maintien de l'épithélium prostatique en contrôlant la prolifération de la couche basale en réponse aux facteurs de croissance libérés par les cellules stromales, notamment l'EGF (Berry et al., 2008).

Le choix du modèle de travail s'est porté sur la lignée RWPE-1 car elle constitue un bon modèle de cellules de la couche basale de l'épithélium normal de la prostate. En effet, la lignée RWPE-1 a été dérivée de la zone périphérique de l'épithélium d'une prostate humaine normale. Cette lignée a été immortalisée par les gènes E6 et E7 du Papilloma-virus 18 (HPV-18), mais n'a pas de pouvoir transformant (Bello et al., 1997). Elle est en effet incapable de former des colonies en agar mou, et ne forme pas de tumeur chez les souris immunodéficientes (Webber et al., 2001). Les cellules RWPE-1 expriment le récepteur aux androgènes, ainsi que le récepteur à l'EGF. Elles se différencient et s'organisent en acini en réponse aux androgènes, et prolifèrent en réponse à l'EGF (Bello-DeOcampo et al., 2001; Harma et al., 2010; Webber et al., 2001). Par ailleurs, l'expression d'une forme mutée de la GTPase Ras constitutivement active dans la lignée RWPE-1, suffit à la transformer en une lignée

tumorale (RWPE-2) (Webber et al., 1997). Cela confirme que la voie ERK1/2 joue un rôle critique dans la prolifération de cette lignée.

Au niveau de l'organisation de l'épithélium prostatique, la lignée RWPE-1 est représentative du compartiment basal prolifératif. Elle exprime en effet des marqueurs de ce compartiment, comme les kératines 5 et 14, ou le marqueur p63. De plus, une très faible proportion de la population exprime le marqueur CD133 (0,24%), spécifique des cellules souches (Litvinov et al., 2006). La lignée cellulaire RWPE-1, avec son hétérogénéité, est considérée comme un modèle de cellules T/A de l'épithélium de prostate.

En contexte inflammatoire, l'IL-6 est libérée par les cellules immunitaires et les cellules stromales. Ainsi présente dans le micro-environnement des cellules épithéliales, l'IL-6 favorise leur survie et leur prolifération. Cette signalisation permet de conserver l'intégrité de l'épithélium dans un tel contexte. Par ailleurs, les récepteurs de la famille de l'EGF-R stimulent la prolifération cellulaire en induisant diverses voies de signalisation, parmi lesquelles la voie ERK1/2. Cette cascade de signalisation joue un rôle critique dans l'expansion des cellules T/A. Les acteurs moléculaires de ces deux voies de signalisation sont surexprimés dans les cellules tumorales, indiquant un rôle potentiel dans l'initiation du cancer et sa progression. C'est pourquoi j'ai cherché à mettre en évidence les relations qui existent entre l'IL-6 et l'EGF-R dans les cellules normales.

En contexte physiologique, les androgènes induisent la sécrétion d'EGF par les cellules stromales. Ce facteur de croissance favorise la prolifération des cellules T/A de l'épithélium prostatique. Les androgènes agissent aussi sur les cellules différenciées de la couche luminale, en favorisant leur survie et leur différenciation. L'induction de la différenciation par les androgènes suppose la présence de leur récepteur dans les cellules T/A. Cette population exprime effectivement le récepteur aux androgènes, mais à des niveaux quasiment indétectables (Heer et al., 2007). Les cellules de type T/A semblent donc être le siège d'une balance entre la prolifération induite par l'EGF et la différenciation en réponse aux androgènes. Dans ce contexte, j'ai étudié les relations qui existent entre la signalisation du récepteur aux androgènes et la voie ERK dans les cellules RWPE-1.

Finalement, l'ensemble des données obtenues au cours de ce travail me permettront d'établir l'existence de connexions entre les voies de signalisation essentielles à la survie, à la prolifération ou à la différenciation dans un modèle de cellules T/A de prostate normale. Ces interactions fonctionnelles pouvant jouer un rôle dans le processus de transformation, il sera intéressant de comprendre leur système de régulation, ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents.

---

## **3 RESULTATS**

---

## 3.1 Article 1

### 3.1.1 Résumé

L'IL-6 est une cytokine inflammatoire qui favorise la survie et la prolifération des cellules épithéliales de prostate. Les récepteurs de la famille de l'EGF-R stimulent aussi la prolifération de ces cellules. Les acteurs moléculaires de ces deux voies de signalisation sont surexprimés dans les cellules tumorales, indiquant un rôle potentiel dans l'initiation du cancer et sa progression. Nous avons donc recherché une interaction entre la voie de l'EGF-R et celle de l'IL-6, ainsi que son impact sur la prolifération des cellules épithéliales de prostate normale.

En réponse à l'EGF, les cellules RWPE-1 – modèle de cellules basales de l'épithélium de prostate normale – ont une prolifération optimale qui s'accompagne d'une activation persistante de la voie ERK1/2. Au contraire, l'IL-6 induit une prolifération modérée, ainsi qu'une activation transitoire d'ERK1/2. Le blocage de cette voie de signalisation par l'U0126, inhibiteur de MEK montre que cette voie ERK1/2 est essentielle à la prolifération des cellules RWPE-1 (voir figure 1).

La cinétique d'activation de la voie STAT par l'IL-6 est persistante, contrairement à celle d'ERK1/2, indiquant une différence dans l'activation ou la régulation de ces deux voies de signalisation. Or les récepteurs de cytokines sont capables d'induire la transactivation du récepteur à l'EGF par clivage d'un pro-ligand. Nous avons donc recherché l'implication possible de l'EGF-R dans l'activation de la voie ERK1/2 en réponse à l'IL-6, à l'aide d'un inhibiteur de son activité kinase PD153035. L'activité kinase de l'EGF-R s'est avérée indispensable dans cette signalisation (voir figure 2). Par ailleurs, la kinase Src a souvent été impliquée dans ce type de mécanisme. D'une part, son inhibition par le PP2 réduit drastiquement le niveau d'activation d'ERK1/2 en réponse à l'IL-6, mais pas à l'EGF et d'autre part le résidu Tyr<sup>845</sup> cible spécifique de Src est phosphorylé en réponse à l'EGF mais pas à l'IL-6 (voir figure 3), indiquant un rôle de Src dans ce mécanisme, en amont de l'activation de l'EGF-R.

Ensuite, l'utilisation d'un inhibiteur généraliste des métallo-protéinases nous a permis de confirmer l'hypothèse du clivage d'un pro-ligand de l'EGF-R en réponse à l'IL-6. Afin d'identifier plus précisément les métallo-protéinases impliquées dans ce processus, nous avons mené une approche par inhibiteurs chimiques spécifiques des principales ADAM : ADAM10 et ADAM17. Les inhibiteurs GI254023X et TAPI-2, respectivement spécifiques d'ADAM10 et ADAM17, induisent une réduction partielle de l'activité d'ERK1/2. Cependant, le GW280264X, capable d'inhiber ADAM17, mais aussi ADAM10, dans une moindre mesure, réduit significativement l'activation d'ERK1/2 en réponse à l'IL-6 (voir figure 4). Ce résultat indique une possible coopération entre ADAM10 et ADAM17 pour cliver le pro-ligand responsable de l'activation de l'EGF-R, donc de la voie ERK1/2.

L'ensemble de ces résultats indique que l'IL-6, libérée en conditions inflammatoires, favorise la prolifération cellulaire en induisant le clivage d'un pro-ligand membranaire de l'EGF-R, via ADAM10 et ADAM17 et avec l'intervention de Src.

Ce manuscrit, a été accepté pour publication dans le journal « *Cellular Signalling* » le 17.11.10 et mis en ligne le 01.12.10.

## 3.1.2 Manuscrit


**ARTICLE IN PRESS**

CLS-07233; No of Pages 7

Cellular Signalling xxx (2010) xxx–xxx

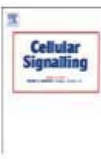
---

Contents lists available at ScienceDirect



**Cellular Signalling**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cellsig](http://www.elsevier.com/locate/cellsig)



## Epidermal growth factor receptor transactivation is implicated in IL-6-induced proliferation and ERK1/2 activation in non-transformed prostate epithelial cells

Nadège Poncet, Johann Guillaume, Guy Mouchiroud \*

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5534, CNRS, Université Lyon 1, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 10 October 2010  
Accepted 17 November 2010  
Available online xxx

**Keywords:**  
EGF receptor  
IL-6  
ERK1/2  
Transactivation  
Prolifération  
Normal epithelial cells

### ABSTRACT

Epidermal growth factor receptor (EGF-R) is a receptor tyrosine kinase that can be activated by molecules other than its cognate ligands. This form of crosstalk called transactivation is frequently observed in both physiological and pathological cellular responses, yet it involves various mechanisms. Using the RWPE-1 cell line as a model of non-transformed prostate epithelial progenitor cells, we observed that interleukin-6 (IL-6) is able to promote cell proliferation and ERK1/2 activation provided that EGF-R kinase activity is not impaired. Treatment with GM6001, a general matrix metalloprotease inhibitor, indicated that IL-6 activates EGF-R through cleavage and release of membrane-anchored EGF-R ligands. Several inhibitors were used to test implication of "a disintegrin and metalloprotease" ADAM10 and ADAM17. GW280264X that targets both ADAM10 and ADAM17 blocked IL-6-induced proliferation and ERK1/2 phosphorylation with same potency as GM6001. However, ADAM10 inhibitor G254023X and ADAM17 inhibitor TAPI-2 were less efficient in inhibiting response of RWPE-1 cells to IL-6, indicating possible cooperation of ADAM17 with ADAM10 or other metalloproteases. Accordingly, our findings suggest that IL-6 stimulates shedding of EGF-R ligands and transactivation of EGF-R in normal prostate epithelial cells, which may be an important mechanism to promote cell proliferation in inflammatory prostate.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Growth factors, their receptors and downstream kinases are often over-expressed or mutated in cancer, thereby triggering deregulation of several signal transduction pathways. As a consequence, signaling cascades may be altered in different ways, leading to their constitutive activation by autocrine stimulation or receptor transactivation [1,2]. Significant advances have been recently made in the field of prostate cancer development, pointing to key roles of epidermal growth factor receptor (EGF-R) family and cytokine signaling, in particular interleukin-6 (IL-6), in androgen-independent stages and metastasis [1,3,4]. In contrast, signaling events that might affect early steps of prostate cancer remain poorly understood. Paracrine stimulation of EGF-R has been suspected to participate to proliferation of androgen-dependent prostatic tumors, whereas IL-6 provided by inflammatory cells or reactive stroma might stimulate growth of epithelial cells primed to tumor conversion by initiating mutations [5,6]. Better knowledge of the function and regulation of these signaling cascades in normal prostate progenitor cells should help understand which molecular mechanisms are involved in prostate carcinogenesis. In this context, the major purpose of the present study was to investigate on

signaling mechanisms implicating EGF-R and IL-6 in the proliferation of normal prostate epithelial cells.

EGF-R belongs to the ErbB receptor family that consists of four closely related receptors: ErbB1/EGF-R, ErbB2/neu/HER2, ErbB3, and ErbB4. Eleven ligands have been identified that show overlapping but specific binding to ErbB proteins [7,8]. In addition, there is increasing evidence that ErbB receptors can induce intracellular signals not only in response to cognate ligands but also following transactivation by cross-talking receptors and downstream signaling pathways [9]. All four ErbB receptors are expressed in the mouse [10] or human prostate [11,12], as well as most of their cognate ligands [11,13]. Consequently, ErbB receptors are physiologically activated in the normal prostate [10]. In the human prostate, EGF-R is mainly expressed by proliferative epithelium, whereas expression of its ligands, EGF and TGF- $\alpha$ , is found in both epithelial and stromal cells and increases in hyperplastic prostate [14–16]. Interestingly, mice deficient for EGF or TGF- $\alpha$  show defects in the formation of prostatic epithelial ducts during fetal development [17]. Moreover, sustained EGF treatment promotes physiological prostate development in newborn rats [18]. Collectively, data support an important role for EGF-R and its ligands in prostate epithelium growth.

IL-6 is a pleiotropic cytokine that is strongly implicated in regulating immune and inflammatory responses. IL-6 mediates its activity through a receptor complex composed of two subunits: the  $\alpha$ -receptor subunit that specifically binds IL-6 (IL-6R $\alpha$ ), and the signal transducing subunit gp130 [19]. Besides its role as an autocrine

\* Corresponding author. Tel.: +33 472 448 372; fax: +33 472 432 685.  
E-mail address: [guy.mouchiroud@univ-lyon1.fr](mailto:guy.mouchiroud@univ-lyon1.fr) (G. Mouchiroud).



## ARTICLE IN PRESS

2

N. Poncet et al. / Cellular Signalling xxx (2010) xxx–xxx

proliferation and survival factor in advanced prostate tumor cells [20], IL-6 is gaining interest as a pro-inflammatory cytokine since a wealth of studies highlighted links between prostate inflammation and tumorigenesis [21,22]. In normal prostate, IL-6 and IL-6-R $\alpha$  are expressed in basal epithelium, whereas gp130 expression is increasing in hyperplastic basal epithelium [23,24]. Finally, IL-6 activates Stat3 and stimulates proliferation in primary epithelial cells from human prostate [20].

In the normal prostate, proliferation compartment is restricted to the basal epithelium where a small population of stem cells can give rise to transient/amplifying (TA) cells. These progenitor cells have strong proliferation potential, but limited self-renewal capabilities, and ultimately differentiate into secretory cells [25]. Here we used the immortalized human prostate cell line RWPE-1 as a model of prostate TA cells [26]. RWPE-1 cells express TA cell markers, undergo in vitro acinar differentiation in response to androgen and do not form tumors when injected into nude mice [27–29]. Interestingly, they show dose-dependent proliferation in response to EGF [26], and IL-6 can stimulate RWPE-1 cell proliferation, albeit with lower efficiency than EGF [30]. Therefore, we used this cell line to study IL-6 response and possible link with EGF signaling in non-transformed prostatic epithelial cells.

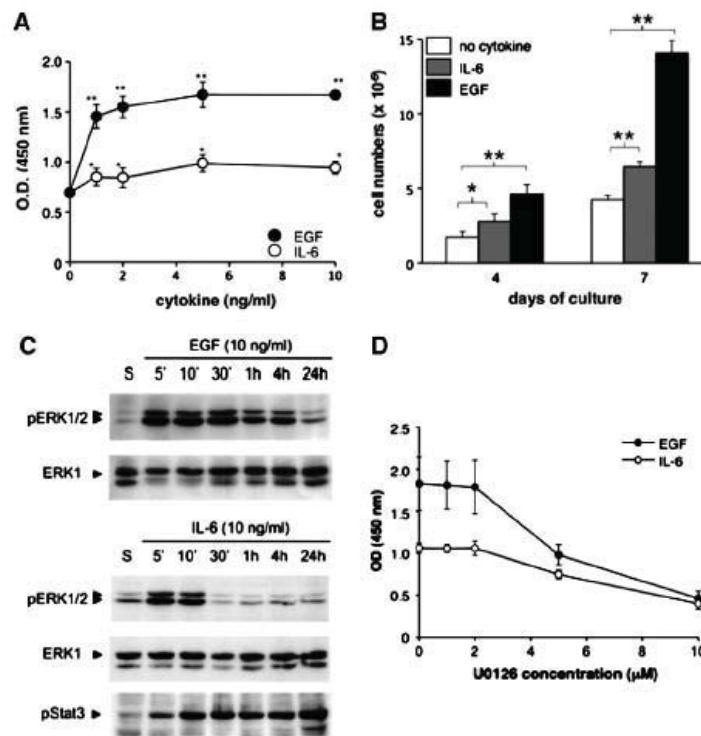
## 2. Materials and methods

## 2.1. Reagents

EGF and IL-6 (Peprotech) were dissolved to a concentration of 10  $\mu$ g/ml in Keratinocyte-Serum Free Medium (K-SFM, Invitrogen) and stored in aliquots at  $-20^{\circ}$  C. WST-1 cell proliferation reagent was obtained from Roche Diagnostics. TAPI-2 and Insolution inhibitors U0126, PP2, PD153035, Jak Inhibitor I and GM6001 were purchased from Calbiochem. ADAM inhibitors GI254023X and GW280264X were kindly provided of Dr. A. Ludwig (Institute for Molecular Cardiovascular Research, University Hospital Aachen, Germany).

## 2.2. Cell culture and proliferation assays

RWPE-1 cell line, a gracious gift from Dr. N. Alloli (Institute of Functional Genomics, Lyon), was maintained in K-SFM supplemented with 5 ng/ml EGF and 50  $\mu$ g/ml bovine pituitary extract (complete K-SFM, Invitrogen). Dose-response tests of cytokines or inhibitors were performed in miniaturised proliferation assay as follows: 5000 cells were seeded in 96-well culture plates in K-SFM supplemented as



**Fig. 1.** EGF and IL-6 differently induce proliferation and ERK1/2 activation in RWPE-1 cells. (A) RWPE-1 cells were cultivated for 5 days in 96-well plates in the presence of various concentrations of EGF or IL-6 and proliferation was measured with WST-1 reagent as described in Materials and methods. O.D. (450 nm): optical density measured at 450 nm. (B) Cells were cultivated in culture flasks in the presence of EGF (10 ng/ml) or IL-6 (10 ng/ml) for indicated times. Proliferation data are given as total cell numbers (C) Cells were growth factor-deprived for 3 h then stimulated with EGF or IL-6 for indicated times. Blots were probed with antibodies that specifically recognize phosphorylated forms of ERK1/2 (pERK1/2) or Stat3 (pStat3). Membranes were stripped and re-probed with anti-ERK1 antibody for loading controls. (D) Cells were cultivated in culture medium supplemented with EGF (10 ng/ml) or IL-6 (10 ng/ml) and in the presence of different U0126 concentrations as indicated. Cultures were performed and treated as in (A), (B) and (D). Results are given as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.) for 3 independent experiments (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.001).

Please cite this article as: N. Poncet, et al., Cell. Signal. (2010), doi:10.1016/j.cellsig.2010.11.009

## ARTICLE IN PRESS

N. Poncet et al. / Cellular Signalling xxx (2010) xxx–xxx

3

specified in the text (200  $\mu$ l per well). After 5 days of culture, WST-1 reagent was added into each well for a 4-hour incubation at 37 °C according to manufacturer's instructions and optical density at 450 nm was measured using a Victor X5 plate reader (Perkin-Elmer). All cultures were performed in a humidified incubator at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3. Cell stimulation and signaling studies

Cells were washed free of growth factors then incubated in basal K-SFM. After 3 h of starvation, medium was replaced by fresh K-SFM supplemented by EGF (10 ng/ml) or IL-6 (10 ng/ml) for various times, as specified in the text. To stop stimulation, medium was removed and changed with cold PBS supplemented by 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich). Inhibitors were added to cultures 30 min before EGF or IL-6; other conditions (inhibitor concentrations and stimulation times) are specified in the text. TAPI-2 was dissolved in ethanol whereas other inhibitors were dissolved in DMSO. Therefore, control cultures were performed in the presence of ethanol or DMSO at final concentrations equal to that in corresponding experimental points.

### 2.4. Cell lysis and immunoblotting

Cells were removed from culture surface by using a cell scraper, centrifuged and lysed in cold radio immunoprecipitation assay buffer (1% deoxycholic acid, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, pH 7.4) containing protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) and 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Insoluble material was removed by centrifugation, and the protein concentration was determined by using the Protein Assay solution (Bio-Rad). Proteins from equalized cell lysates were separated on a SDS-polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membrane, and blotted with specific primary antibodies: anti-phospho-Stat3, anti-Stat3, anti-phospho-EGF-R (Tyr<sup>845</sup>) or anti-EGF-R (Cell Signaling Technologies); anti-phospho-ERK or anti-ERK1 (Santa Cruz). Antibody binding was visualized using HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich) and ECL<sup>+</sup> reagent (GE Healthcare).

### 2.5. Statistical analysis

Results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean for at least 3 independent experiments. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (paired-data analysis). *P* values < 0.05 were considered as statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. ERK1/2 activation drives proliferative response of RWPE-1 cells to EGF or IL-6

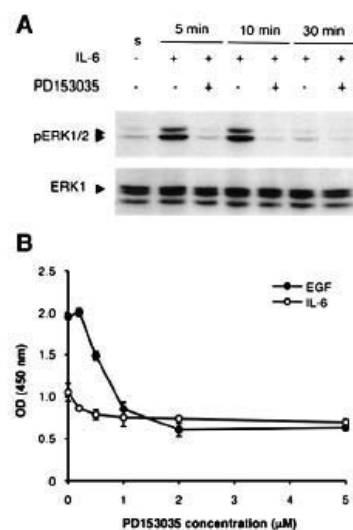
Cells were cultured in 96-well plates in K-SFM supplemented with BPE for 5 days in the presence of increasing concentrations of EGF or IL-6, then proliferation was assessed using WST-1 reagent. Consistent with previous data [26,30,31], EGF and IL-6 stimulated RWPE-1 cell proliferation in a dose-dependent manner, with a plateau level at 5 ng/ml for each cytokine (242  $\pm$  28% and 139  $\pm$  8%, as compared to control, respectively) (Fig. 1A). Viable cell numeration using Trypan Blue dye was also performed after 4 or 7 days of cultivation in culture flasks, and confirmed higher proliferation rates of RWPE-1 cells in response to EGF than in response to IL-6 (Fig. 1B).

Since persistent ERK1/2 activation was associated to cell proliferation in various models [32], the effects of EGF and IL-6 on ERK1/2 phosphorylation were assessed in time-course studies. For that, exponentially growing RWPE-1 cells were starved of EGF and BPE for 3 h, then stimulated with 10 ng/ml EGF or 10 ng/ml IL-6 for various times, as indicated. Western blotting analysis of cell lysates

showed that EGF readily stimulated ERK1/2 phosphorylation reaching a peak at 5 min of EGF stimulation, but persisting for at least 4 h of EGF stimulation (Fig. 1C). In contrast, IL-6 that proved to be a weak mitogen for RWPE-1 cells could only transiently stimulate ERK1/2 phosphorylation (Fig. 1C). Interestingly, IL-6 induced strong and sustained Stat3 phosphorylation under the same conditions, which indicated efficient IL-6 signal transduction (Fig. 2). Therefore, data strongly suggested correlation between ERK1/2 activation and proliferative response in RWPE-1 cells. To test the role of ERK1/2 in mitogenic signaling induced by EGF and IL-6, we used the specific MEK inhibitor U0126. Fig. 1D shows that U0126 inhibited proliferation of RWPE-1 cells in response to EGF or IL-6 in a dose-dependent manner, confirming essential role of ERK1/2 activation in prostate epithelial cell growth.

### 3.2. ERK1/2 activation and proliferation in response to IL-6 requires EGF-R kinase activity

IL-6 can induce ERK activation through recruitment of the tyrosine phosphatase SHP2 on specific phosphotyrosines of the gp130 subunits constituting the IL-6 receptor. In turn, SHP2 becomes phosphorylated by JAK2 and is able to recruit Grb2-SOS complexes, thereby triggering Ras activation and downstream events leading to ERK1/2 phosphorylation and activation [19]. Thus, ERK1/2 phosphorylation in response to IL-6 depends on Jak2 activity, which we verified in RWPE-1 cells by using Jak Inhibitor I (data not shown). However, as shown in Fig. 1C, IL-6 transiently stimulated ERK1/2 phosphorylation while it induced sustained Stat3 phosphorylation. These different kinetics might indicate either that negative regulation occurs downstream of JAK2/SHP2 to modulate ERK1/2 phosphorylation, or that IL-6 stimulates a



**Fig. 2.** IL-6-induced ERK1/2 activation and proliferation requires EGF-R kinase activity. (A) Cells were growth factor-deprived for 3 h then stimulated with IL-6 (10 ng/ml) for indicated times in the presence or not of the EGF-R kinase inhibitor PD153035. Inhibitor (10  $\mu$ M) was added during the final 30 min of growth factor starvation. Blots were probed with anti-pERK1/2 antibody, then stripped and reprobed with anti-ERK1 antibody for loading controls. (B) Cells were cultivated for 5 days in 96-well plates in the presence of EGF (10 ng/ml) or IL-6 (10 ng/ml) and various PD153035 concentrations as indicated. Proliferation was measured with WST-1 reagent. Results are given as mean  $\pm$  S.E.M. for 3 independent experiments.

Please cite this article as: N. Poncet, et al., Cell. Signal. (2010), doi:10.1016/j.cellsig.2010.11.009



## ARTICLE IN PRESS

4

N. Poncet et al. / Cellular Signalling xxx (2010) xxx-xxx

JAK2-dependent alternative pathway for activating ERK1/2. Since cytokine receptors have been shown to transactivate EGF-R [33,34], we first asked whether stimulation of ERK1/2 phosphorylation by IL-6 in RWPE-1 cells would require EGF-R activity. For that, 3-hour starved RWPE-1 cells were stimulated by IL-6 for various times in the presence or not of PD153035, a potent inhibitor of EGF-R kinase activity. Fig. 2A clearly shows that blocking EGF-R kinase activity prevented IL-6 to induce ERK1/2 phosphorylation. Moreover, PD153035 similarly inhibited proliferation induced by either EGF or IL-6 in RWPE-1 cells (Fig. 2B), pointing to possible role of EGF-R in IL-6-induced ERK1/2 activation. Alternately, data might implicate ErbB2 rather than EGF-R since PD153035 can also inhibit other EGF-R family members in intact cells [35] and, in prostate cancer cells, IL-6 stimulation results in association of gp130 subunit of IL-6-R with Erb2, which is essential to ERK1/2 activation [34]. However, we considered this possibility very unlikely since RWPE-1 cells do not express detectable levels of ErbB2 protein [36]. In conclusion, data strongly suggest that IL-6 is able to transactivate EGF-R in non-transformed prostate epithelial cells.

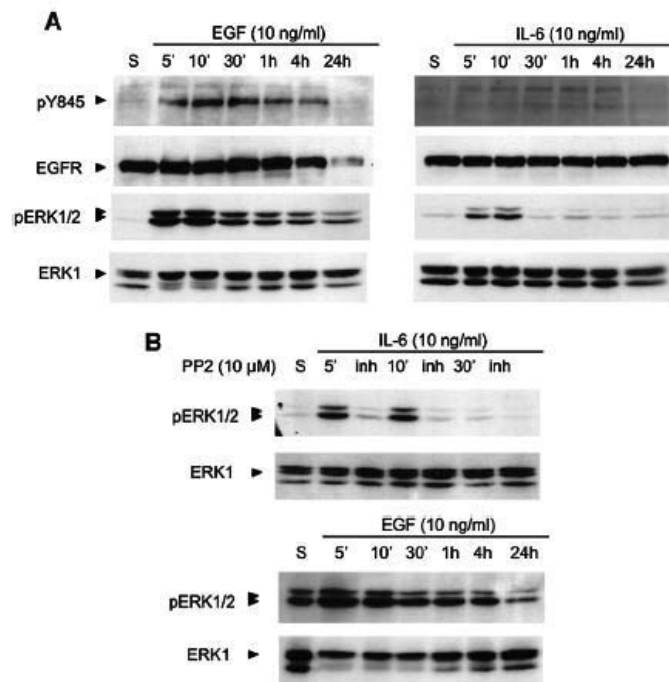
### 3.3. Src family kinases indirectly contribute to EGF-R transactivation

We first asked whether IL-6 receptor could directly transactivate EGF-R. As previously shown for growth hormone, JAK2 might phosphorylate EGF-R, creating binding site for Grb2/Sos and thereby activating ERK1/2, but this mechanism does not require EGF-R kinase activity [33]. Therefore, our observation that ERK1/2

activation by IL-6 in RWPE-1 cells necessitates EGF-R kinase activity (Fig. 2A) apparently rules out the possibility that JAK2 mediates EGF-R transactivation in response to IL-6. Another mechanism might implicate phosphorylation and subsequent activation of EGF-R by Src family kinases (SFK; reviewed by [37]). To test this possibility, RWPE-1 cells were starved of growth factors for 3 h, then stimulated for various times with EGF or IL-6. Corresponding cell lysates were subjected to western blotting with an antibody specifically detecting phosphorylation of Tyr<sup>845</sup>, a major SFK substrate on EGF-R [38]. EGF induced strong and sustained Tyr<sup>845</sup> phosphorylation, correlating with ERK1/2 activation (Fig. 3A). In contrast, no phosphorylation of Tyr<sup>845</sup> could be detected following IL-6 stimulation, while the transient activation of ERK1/2 could be observed. Thus, we concluded that IL-6 did not induce SFK to phosphorylate EGF-R in RWPE-1 cells. Interestingly, the SFK inhibitor PP2 strongly inhibited ERK1/2 phosphorylation induced by IL-6, not that induced by EGF (Fig. 3B), indicating that SFK might be indirectly implicated in EGF-R transactivation.

### 3.4. Metalloproteases mediate EGF-R transactivation by IL-6

Next, we asked whether EGF-R transactivation by IL-6 would implicate proteolytic release of EGF-R ligands, as previously shown in response to various agonists [39]. EGF-R ligands can be cleaved and released from the cell surface by activation of membrane-bound metalloproteases [40]. This mechanism was tested here by using the general metalloprotease inhibitor GM6001. For that purpose, 3-hour



**Fig. 3.** Implication of SFK in IL-6-induced pERK1/2 activation. (A) Cells were growth factor-deprived for 3 h then stimulated with EGF or IL-6 for indicated times. Blots were probed with antibodies that specifically recognize the phosphorylation of EGF-R on Tyr 845 (pY845) or pERK1/2. Membranes were stripped and re-probed with anti-EGF-R antibody for loading controls. (B) Cells were growth factor-deprived for 3 h then stimulated with IL-6 (10 ng/ml) for indicated times in the presence or not of the SFK inhibitor PP2 or with EGF (10 ng/ml) for indicated times in the presence of PP2. Corresponding EGF stimulation in the absence of PP2 is shown in (A). PP2 (10 μM) was added during the final 30 min of growth factor starvation. Blots were probed with anti-pERK1/2 antibody, then stripped and re-probed with anti-ERK1 antibody for loading controls.

Please cite this article as: N. Poncet, et al., Cell. Signal. (2010), doi:10.1016/j.cellsig.2010.11.009



## ARTICLE IN PRESS

N. Poncet et al. / Cellular Signalling xxx (2010) xxx-xxx

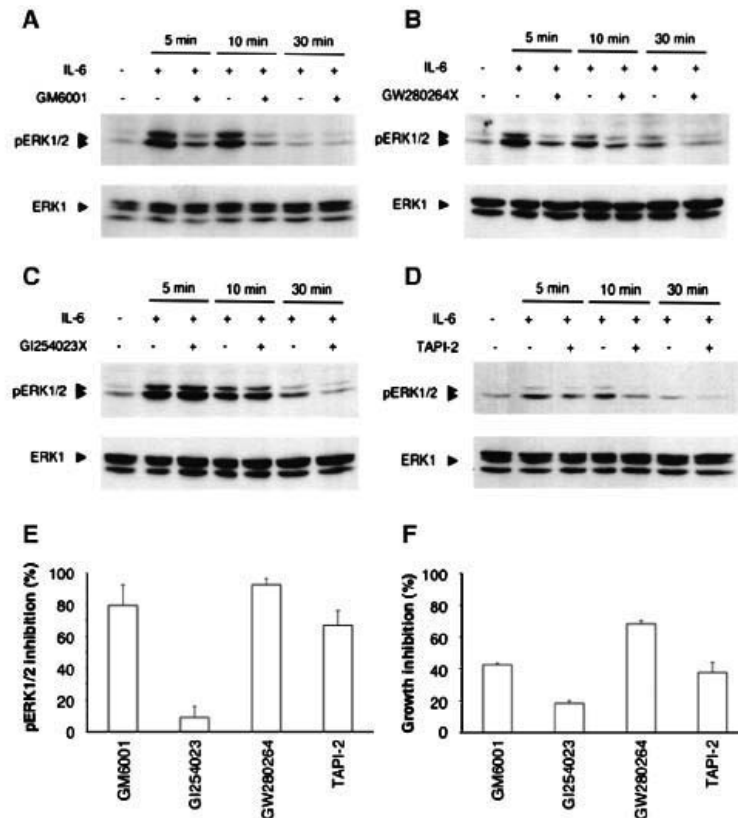
5

starved RWPE-1 cells were stimulated with 10 ng/ml IL-6 for 5, 10 or 30 min in the presence or absence of 10  $\mu$ M GM6001. As shown in Fig. 4A, we observed strong inhibition of ERK1/2 phosphorylation in the presence of GM6001, whereas the inhibitor had no effect on EGF induced ERK1/2 phosphorylation (data not shown). Thus, activation of ERK1/2 in response to IL-6 is dependent on both EGF-R activity and proteolytic activity in RWPE-1 cells. Next, we sought to identify which metalloproteases could be implicated in IL-6-induced transactivation of EGF-R. GM6001 has a broad specificity, targeting both matrix metalloproteases and members of ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family. ADAM proteases have been implicated in EGF-R ligand shedding, in particular ADAM10 and ADAM17 [9,41]. So, we used 2 molecules that differed in their capacity to block ADAM10 and ADAM17 activities to further characterize IL-6-mediated ERK1/2 phosphorylation in RWPE-1 cells. GW280264X has been shown to preferentially block ADAM17 and to a lesser extent ADAM10, while GI254023X preferentially blocked ADAM10 [42]. Here, using the same protocol as for GM6001, we could observe that GW280264X, but not GI254023X, could strongly impair ERK1/2 phosphorylation upon

IL-6 stimulation of RWPE-1 cells, pointing to a role of ADAM17 in this process (Fig. 4B and C, respectively). Consistent with this possibility, the ADAM17-specific inhibitor TAPI-2 was also able to inhibit IL-6-induced ERK1/2 phosphorylation under the same conditions (Fig. 4D). However, TAPI-2 effects were weaker than those of GM6001 or GW280264X, suggesting that ADAM17 might not be the sole protease involved in EGF-R transactivation (Fig. 4E). Finally, the 3 compounds that inhibited IL-6 stimulation of ERK1/2 activation also inhibited IL-6 dependent proliferation, with most prominent effect of GW280264X (Fig. 4F).

## 4. Discussion

In primary cultures of normal human prostate epithelial cells, IL-6 stimulates proliferation [20], which we confirmed here using RWPE-1 cell line as a model of non-transformed prostate epithelial cells. Proliferation of RWPE-1 cells in response to IL-6 was lower than in response to EGF, correlating with the capabilities of these cytokines to stimulate transient and sustained ERK1/2 phosphorylation in starved



**Fig. 4.** IL-6-induced pERK1/2 activation and proliferation mainly involves ADAM17. Cells were growth factor-deprived for 3 h then stimulated with IL-6 (10 ng/ml) for indicated times in the presence or not of (A) the general MMP inhibitor GM6001, (B) the ADAM10/17 inhibitor GW280264X, (C) the ADAM10 inhibitor GI254023X or (D) the ADAM 17 inhibitor TAPI-2. Inhibitors were used at 10  $\mu$ M final concentrations. (A)–(D) Blots were probed with anti-pERK1/2 antibody, then stripped and reprobed with anti-ERK1 antibody for loading controls. (E) ERK1/2 phosphorylation levels were normalized relative to total ERK1/2 levels then used to calculate pERK1/2 inhibition at 10 min of IL-6 stimulation for each inhibitor. Results are given as mean  $\pm$  S.E.M. for 3 independent experiments. (F) Cells were cultivated for 5 days in 96-well plates in the presence of IL-6 (10 ng/ml) and inhibitors as indicated. Proliferation was measured with WST-1 reagent. Growth inhibition is expressed as the difference of O.D. (450 nm) between untreated and inhibitor-treated culture relative to O.D. (450 nm) of untreated cultures. Results are given as mean  $\pm$  S.E.M. for 3 independent experiments.

Please cite this article as: N. Poncet, et al., Cell. Signal. (2010), doi:10.1016/j.cellsig.2010.11.009



## ARTICLE IN PRESS

6

N. Poncet et al. / Cellular Signalling xxx (2010) xxx–xxx

cells, respectively. In contrast, IL-6 induces sustained ERK1/2 phosphorylation in vitro or in vivo in advanced prostate cancer cells [34,43]. Therefore, IL-6 stimulation of prostate epithelial cells may result in different outcomes under physiological or pathological conditions. Transactivation of ErbB family receptors has been implicated in both situations, yet distinct mechanisms have been described. Indeed, we have reported here EGF-R transactivation by IL-6 in non-transformed prostate epithelial cells whereas Qiu et al. have previously shown that IL-6 could induce ErbB2 transactivation in advanced prostate cancer cell lines [34]. It is thus possible that ErbB2 overexpression in prostate cancer cells could be responsible for sustained ERK1/2 activation in response to IL-6 [36,44].

Here, we have shown that the effects of IL-6 on proliferation and ERK1/2 activation in RWPE-1 cells required kinase activity of EGF-R, based on the effects of PD153035. The rapidity at which IL-6 stimulates ERK1/2 phosphorylation was not compatible with transcriptional regulation of EGF-R ligand expression. Having also excluded direct crosstalk between IL-6-R and EGF-R, we then focused our study on possible implication of EGF-R ligand shedding from the cell surface following IL-6 stimulation of RWPE-1 cells. Experiments with the general inhibitor of metalloproteases GM6001 confirmed our hypothesis that IL-6 could induce the release of EGF-R ligands from the cell surface, resulting in autocrine/paracrine stimulation of ERK1/2 activity and subsequent cell proliferation. In line with this finding, it was recently shown in endothelial cells that IL-6 causes rapid cleavage of the membrane-anchored pro-form of neuregulin-1 and subsequent ERK1/2 activation through ErbB family members other than EGF-R [45]. Nevertheless, to our knowledge, our study is the first to describe metalloprotease-dependent EGF-R activation induced by IL-6 in non-transformed epithelial cells.

Members of the ADAM family of membrane proteases are responsible for transactivation of EGF-R by proteolytic cleavage of pro-forms of receptor ligands [40]. Depending on cell type, several ADAM proteases share EGF-R ligands and vice versa, yet ADAM10 and ADAM17 are most often implicated in the cleavage of TGF- $\alpha$ , HB-EGF and amphiregulin [41,46]. Our experiments indicated that GW280264X was as potent inhibitor of IL-6-induced ERK1/2 phosphorylation as GM6001, pointing to possible role of ADAM10 and ADAM17. However, the ADAM10 specific compound GI254023 had no significant effect in our model, ruling out a role of ADAM10, and the ADAM17 inhibitor TAPI-2 had only a mild inhibitory effect on both IL-6-induced proliferation and ERK1/2 phosphorylation. This suggested that other metalloproteases might act together with ADAM17 upon IL-6 stimulation. Consistent with this possibility, GW280264X also target matrix metalloproteases (A. Ludwig, personal communication).

Transcriptome analysis of RWPE-1 cells indicated that amphiregulin transcripts are much more abundant than those encoding TGF- $\alpha$  or HB-EGF [47]. Amphiregulin is a key factor in epithelial development and may play a role in prostate epithelium proliferation [48,49]. However, although amphiregulin could stimulate EGF-R signaling, anti-amphiregulin neutralizing antibody did not inhibit IL-6-induced ERK1/2 phosphorylation in RWPE-1 cells (data not shown). This indicated that either amphiregulin is not implicated in EGF-R transactivation by IL-6 or additional EGF-R ligands are released in response to IL-6. The latter possibility would be consistent with our conclusion that multiple metalloproteases might be activated by IL-6 in RWPE-1 cells.

## 5. Conclusions

Our data show that IL-6 can stimulate proliferation in non-transformed prostate epithelial cells through metalloprotease activation and subsequent EGF-R transactivation, yet mechanisms underlying this cross-talk remain to be detailed. Nevertheless, importance of IL-6 in prostate epithelial homeostasis remains to be determined. Inflammatory microenvironment may result in hyperplastic prostate epithelium,

which is now considered to be an early step in prostate cancer progression [50]. Sharp increase in IL-6 expression has been described in hyperplastic prostate, correlating with strong ERK1/2 activation [23,24,51]. Therefore, EGF-R transactivation by IL-6 described here may contribute to excessive epithelial cell proliferation in inflammatory prostate.

## Acknowledgements

This investigation was supported by a grant from Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Rhône). N.P. was supported by fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Authors thank Nathalie Allioli for providing RWPE-1 cells, Andreas Ludwig for ADAM inhibitors, Amandine Hurbini (Institut Albert Bonniot, Grenoble, France) for her help with the preliminary studies on amphiregulin, and Laurent Morel (UMR CNRS 6247, Clermont-Ferrand, France) for the helpful discussions and advice.

## References

- [1] M. Mimeault, S.K. Batra, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1.
- [2] G. Giamas, Y.L. Man, H. Himer, J. Bischof, K. Kramer, K. Khan, S.S. Ahmed, J. Stebbing, U. Knippschild, *Cell. Signal.* 22 (2010) 984.
- [3] D. Djakiew, *Prostate* 42 (2000) 150.
- [4] Z. Culig, H. Steiner, G. Bartsch, A. Hobisch, *J. Cell. Biochem.* 95 (2005) 497.
- [5] L.M. Coussens, Z. Werb, *Nature* 420 (2002) 860.
- [6] D. Gioeli, *Clin. Sci. (Lond.)* 108 (2005) 293.
- [7] D.J. Leahy, *Adv. Protein Chem.* 68 (2004) 1.
- [8] T. Mitsudomi, Y. Yatabe, *FEBS J.* 277 (2010) 301.
- [9] S. Higashiyama, H. Iwabuki, C. Morimoto, M. Hieda, H. Inoue, N. Matsushita, *Cancer Sci.* 99 (2008) 214.
- [10] Y. Zhu, F.E. Jones, *Prostate* 60 (2004) 68.
- [11] R.M. Adam, J.G. Borer, J. Williams, J.A. Eastham, K.R. Loughlin, M.R. Freeman, *Endocrinology* 140 (1999) 5866.
- [12] K. Nasu, N. Tanji, R. Nishioka, J. Wang, Y. Yanagihara, A. Ozawa, M. Yokoyama, K. Sakayama, *Arch. Androl.* 52 (2006) 185.
- [13] E.R. Sherwood, C. Lee, *World J. Urol.* 13 (1995) 290.
- [14] P. De Miguel, R. Royuela, R. Bethencourt, A. Ruiz, B. Fraile, R. Paniagua, *Cytokine* 11 (1999) 722.
- [15] I. Leav, J.E. McNeal, J. Ziar, J. Alroy, *Hum. Pathol.* 29 (1998) 668.
- [16] G. Letellier, M.J. Perez, M. Yacoub, P. Levillain, O. Cussénot, G. Fromont, *J. Histochem. Cytochem.* 55 (2007) 885.
- [17] B.D. Abbott, T.M. Lin, N.T. Rasmussen, R.M. Albrecht, J.E. Schmid, R.E. Peterson, *Toxicol. Sci.* 76 (2003) 427.
- [18] N. Torring, L.V. Jensen, J.G. Wen, F.B. Sorensen, J.C. Djurhuus, E. Nexø, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 35 (2001) 339.
- [19] P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermans, G. Müller-Newen, F. Schaper, *Biochem. J.* 374 (2003) 1.
- [20] D. Giri, M. Ozen, M. Ittmann, *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 2159.
- [21] A.M. De Marzo, E.A. Platz, S. Sutcliffe, J. Xu, H. Gronberg, C.G. Drake, Y. Nakai, W.B. Isaacs, W.G. Nelson, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 256.
- [22] N.J. Maitland, A.T. Collins, *J. Cell. Biochem.* 105 (2008) 931.
- [23] A. Hobisch, H. Rogatsch, A. Hittmair, D. Fuchs, G. Bartsch Jr., H. Klocker, G. Bartsch, Z. Culig, *J. Pathol.* 191 (2000) 239.
- [24] M. Royuela, M. Ricote, M.S. Parsons, I. Garcia-Tunon, R. Paniagua, M.P. de Miguel, *J. Pathol.* 202 (2004) 41.
- [25] D.L. Hudson, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7 (2004) 188.
- [26] D. Bello, M.M. Webber, H.K. Kleinman, D.D. Wartinger, J.S. Rhim, *Carcinogenesis* 18 (1997) 1215.
- [27] M.M. Webber, D. Bello, H.K. Kleinman, M.P. Hoffman, *Carcinogenesis* 18 (1997) 1225.
- [28] I.V. Litvinov, D.J. Vander Griend, Y. Xu, L. Antony, S.L. Dalrymple, J.T. Isaacs, *Cancer Res.* 66 (2006) 8598.
- [29] V. Harma, J. Virtanen, R. Makela, A. Happonen, J.P. Mpindi, M. Knuutila, P. Kohonen, J. Lotjonen, O. Kallioniemi, M. Nees, *PLoS ONE* 5 (2010) e10431.
- [30] M. Okamoto, M.M. Webber, S. Quader, R. Oyasu, *Prostate* 35 (1998) 255.
- [31] D. Bello-DeOcampo, H.K. Kleinman, M.M. Webber, *Mutat. Res.* 480–481 (2001) 209.
- [32] J. Pouyssegur, V. Volmat, P. Lenormand, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 755.
- [33] T. Yamauchi, K. Ueki, K. Tobe, H. Tamemoto, N. Sekine, M. Wada, M. Honjo, M. Takahashi, T. Takahashi, H. Hirai, T. Tushima, Y. Akanuma, T. Fujita, I. Komuro, Y. Yazaki, T. Kadowaki, *Nature* 390 (1997) 91.
- [34] Y. Qiu, L. Ravi, H.J. Kung, *Nature* 393 (1998) 83.
- [35] M. Egeblad, O.H. Mortensen, L.C. van Kempen, M. Jaattela, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281 (2001) 25.
- [36] S. Sotomayor, M.J. Carmena, A.V. Schally, J.L. Varga, M. Sanchez-Chapado, J.C. Prieto, *Am. J. Oncol. Int. J. Oncol.* 31 (2007) 1223.
- [37] R. Ishizawa, S.J. Parsons, *Cancer Cell* 6 (2004) 209.
- [38] J.S. Biscardi, M.C. Maa, D.A. Tice, M.E. Cox, T.H. Leu, S.J. Parsons, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8335.

Please cite this article as: N. Poncet, et al., *Cell. Signal.* (2010), doi:10.1016/j.celsig.2010.11.009

ARTICLE IN PRESS

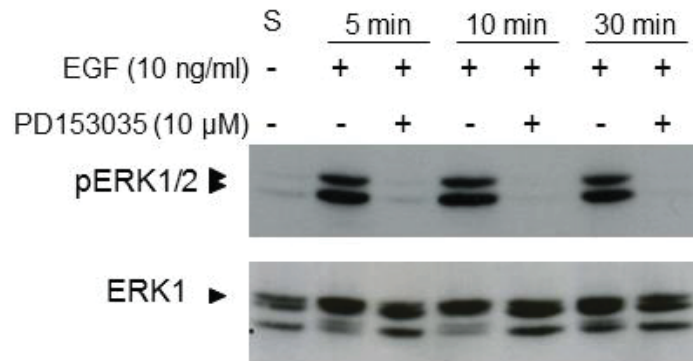
N. Poncet et al. / Cellular Signalling xxx (2010) xxx–xxx

7

- [39] K.D. Rodland, N. Bollinger, D. Ippolito, L.K. Opresko, R.J. Coffey, R. Zangar, H.S. Wiley, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 31477.
- [40] C.P. Blobel, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 32.
- [41] K. Horiuchi, S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig, C.P. Blobel, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 176.
- [42] C. Hundhausen, D. Misztela, T.A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K.J. Kallen, S. Rose-John, A. Ludwig, *Blood* 102 (2003) 1186.
- [43] S.D. Lee, W. Lou, M. Hou, F. de Miguel, L. Gerber, A.C. Gao, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 370.
- [44] A.S. Neto, M. Tobias-Machado, M.L. Wroclawski, F.L. Fonseca, G.K. Teixeira, R.D. Amarante, E.R. Wroclawski, A. Del Giglio, *J. Urol.* 184 (2010) 842.
- [45] A. Kalinowski, N.J. Plowes, Q. Huang, C. Berdejo-Izquierdo, R.R. Russell, K.S. Russell, *FASEB J.* 24 (2010) 2967.
- [46] H. Kataoka, *J. Dermatol. Sci.* 56 (2009) 148.
- [47] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM201762>.
- [48] J. McBryan, J. Howlin, S. Napoletano, F. Martin, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13 (2008) 159.
- [49] S. Kasina, P.A. Scherle, C.L. Hall, J.A. Macoska, *Cell Prolif.* 42 (2009) 799.
- [50] G.S. Palapattu, S. Sutcliffe, P.J. Bastian, E.A. Platz, A.M. De Marzo, W.B. Isaacs, W.G. Nelson, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1170.
- [51] A.R. Uzgare, P.J. Kaplan, N.M. Greenberg, *Prostate* 55 (2003) 128.

Please cite this article as: N. Poncet, et al., *Cell. Signal.* (2010), doi:10.1016/j.cellsig.2010.11.009

### 3.1.3 Résultats supplémentaires

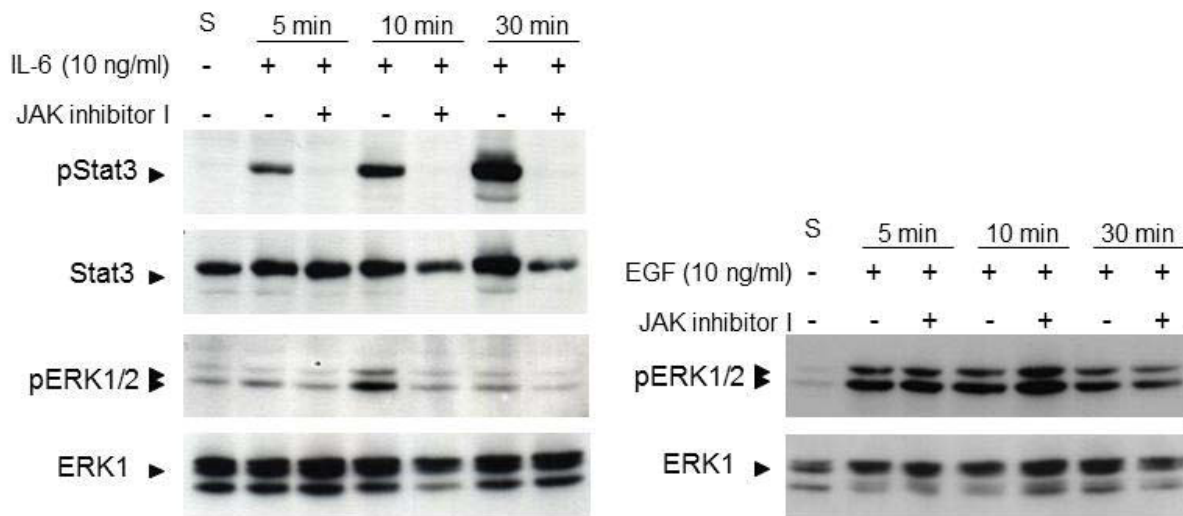


**Fig. M1-S1 : L'activité kinase de l'EGF-R est nécessaire à l'activation de la voie ERK1/2**

Les cellules ont été sevrées pendant 2h30, puis mises en présence de l'inhibiteur de l'EGF-R PD153035 (10  $\mu$ M) pendant 30 min, avant d'ajouter l'EGF à 10 ng/ml pour stimulation pendant les temps indiqués. Les membranes ont été marquées avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les formes phosphorylées d'ERK1/2 (pERK1/2). Après déshybridation, les membranes ont été marquées par les anticorps spécifiques d'ERK 1 pour contrôle de charge.

Après sevrage, les cellules RWPE-1 ont été stimulées par l'EGF en absence ou en présence de l'inhibiteur PD153035, de l'activité kinase de l'EGF-R. Cet inhibiteur réduit drastiquement le niveau d'activation d'ERK1/2, indiquant que l'activité kinase de l'EGF-R est nécessaire à l'activation de la voie ERK1/2 en réponse à l'EGF. Ce résultat est à mettre en parallèle avec les données présentées dans le manuscrit. D'une part la figure 1D montre qu'une inhibition de la voie ERK1/2 réduit la prolifération des cellules aussi bien en réponse à l'EGF qu'en réponse à l'IL-6, indiquant un rôle crucial de cette voie dans la prolifération. Et d'autre part, la figure 2 montre que l'activité kinase de l'EGF-R est nécessaire à la prolifération et à l'activité d'ERK1/2 en réponse à l'IL-6. Ensemble, ces résultats montrent que l'EGF-R et la voie ERK1/2 en aval sont nécessaires à la prolifération des cellules RWPE-1 en réponse à l'EGF et à l'IL-6.

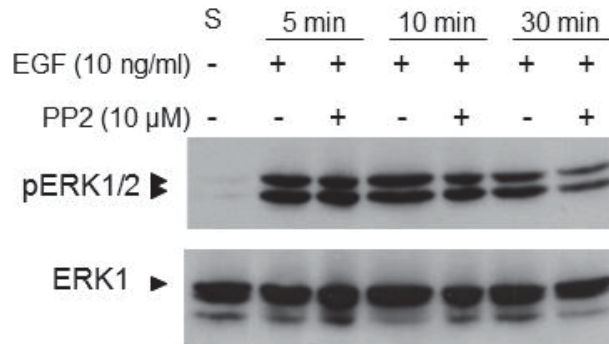




**Fig. MS1-S2 : La kinase JAK2 joue un rôle dans l'activation d'ERK1/2 en réponse à l'IL-6**

Les cellules RWPE-1 ont été sevrées pendant 2h30, puis mises en présence de l'inhibiteur JAK inhibitor I (10  $\mu$ M) pendant 30 min, avant d'ajouter l'IL-6 (à gauche) ou l'EGF (à droite) à 10 ng/ml pour stimulation pendant les temps indiqués. Les membranes ont été marquées avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les formes phosphorylées d'ERK1/2 (pERK1/2) et de Stat3 (pStat3). Après déshybridation, les membranes ont été marquées par les anticorps spécifiques d'ERK 1 et de Stat3 pour contrôle de charge.

Les cellules RWPE-1 ont été sevrées (S), puis stimulées pendant différents temps par l'IL-6 ou l'EGF (10 ng/ml) en absence ou en présence de JAK inhibitor I, qui bloque l'activité kinase de JAK2. En réponse à l'EGF, JAK inhibitor I n'affecte pas le niveau d'activation d'ERK1/2, puisque cette voie ne nécessite pas l'intervention de JAK2. Au contraire, en réponse à l'IL-6, l'inhibiteur réduit de manière drastique le niveau d'activation de Stat3, protéine cible de JAK2, prouvant son efficacité à inhiber JAK2. L'effet de l'inhibiteur sur ERK1/2 est moindre, mais il est significatif après 10 min de stimulation. Cela suggère que la kinase JAK2 joue un rôle dans la transactivation de l'EGF-R par l'IL-6.



**Fig. MS1-S3 : L'inhibiteur de Src n'a pas d'effet sur l'activation d'ERK1/2 en réponse à l'EGF**

Les cellules RWPE-1 ont été sevrées pendant 2h30, puis mises en présence de l'inhibiteur PP2 de l'activité kinase de Src (10  $\mu$ M) pendant 30 min, avant d'ajouter l'EGF à 10 ng/ml pour stimulation pendant les temps indiqués. Les membranes ont été marquées avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les formes phosphorylées d'ERK1/2 (pERK1/2). Après déshybridation, les membranes ont été marquées par les anticorps spécifiques d'ERK 1 pour contrôle de charge.

Les cellules RWPE-1 ont été sevrées (S), puis stimulées pendant différents temps par l'EGF (10 ng/ml) en absence ou en présence de PP2 qui est un inhibiteur des kinases de la famille Src (SFK). L'inhibition de l'activité kinase de Src n'a pas d'effet sur le niveau d'activation d'ERK1/2 en réponse à l'EGF. Cette figure est à mettre en relation avec la figure 3B du manuscrit. En effet, le PP2 réduit significativement la phosphorylation d'ERK1/2 en réponse à l'IL-6. Indiquant un rôle spécifique des SFK dans la transactivation de l'EGF-R par l'IL-6. De plus, la figure 3A du manuscrit montre que le niveau de phosphorylation sur le résidu Tyr<sup>845</sup> de l'EGF-R, cible de Src est augmenté en réponse à l'EGF, mais pas à l'IL-6. Cela indique une action indirecte des SFK sur l'activation d'ERK1/2.

		RWPE-1	RWPE-2			RWPE-1	RWPE-2
Récepteurs	ERBB4	31.246	33.915	Métallo-protéinases	ADAM2	13.752	12.764
	ERBB4	18.471	13.851		ADAM7	49.273	43.577
	ERBB2	53.501	35.801		ADAM7	13.455	10.717
	ERBB2	404.978	309.429		ADAM8	67.736	54.539
	ERBB3	46.293	43.324		ADAM8	151.590	147.244
	ERBB3	91.840	69.573		ADAM9	44.274	312.335
	EGFR	400.580	479.981		ADAM10	38.317	93.315
	EGFR	294.747	366.946		ADAM10	18.701	64.232
	EGFR	83.507	69.153		ADAM11	148.031	121.061
	EGFR	111.203	88.111		ADAM12	18.652	19.406
	EGFR	275.615	373.121		ADAM12	134.652	96.796
Ligands	AREG	647.207	1153.843		ADAM12	20.040	16.683
	BTC	9.713	10.324		ADAM12	31.780	29.205
	EREG	80.382	172.833		ADAM15	675.606	348.119
	NRG1	44.272	49.267		ADAM17	45.714	70.383
	NRG1	31.358	54.858		ADAM17	37.877	46.127
	NRG1	99.585	107.800		ADAM18	26.695	24.000
	NRG1	14.492	15.273		ADAM19	90.949	128.791
	NRG1	145.470	108.686		ADAM19	88.901	74.818
	NRG1	28.736	37.192		ADAM20	45.290	41.407
	NRG2	23.718	21.578		ADAM20	55.356	48.240
	TGFA	124.912	109.774		ADAM21	32.602	28.568
	TGFA	286.697	413.636		ADAM22	10.765	10.657
	TGFA	178.815	167.145		ADAM22	16.455	16.880
					ADAM22	96.697	82.792
			ADAM22		76.020	71.677	
			ADAM22	68.579	72.298		
			ADAM23	91.253	68.759		
			ADAM28	21.730	17.067		
			ADAM28	11.448	11.646		
			ADAM28	191.661	165.845		
			ADAM29	43.194	39.262		
			ADAM30	100.782	94.353		
			ADAM3A	11.448	10.498		
			ADAM3A	13.577	13.253		
			ADAM3B	11.010	8.923		
			ADAM5P	41.339	32.383		
			ADAM5P	14.997	14.044		
			ADAMDEC1	12.875	13.344		
			ADAMTS1	77.762	81.534		
			ADAMTS12	126.076	120.025		
			ADAMTS2	62.226	63.328		
			ADAMTS2	37.799	31.309		
			ADAMTS20	10.739	10.873		
			ADAMTS3	12.543	11.163		
			ADAMTS5	16.239	16.504		
			ADAMTS6	33.834	32.347		
			ADAMTS7	88.867	80.138		
			ADAMTS7	80.426	74.313		
			ADAMTS8	22.760	21.334		
			ADAMTS8	34.120	28.491		
			ADAMTSL2	37.086	27.355		
			ADAMTSL3	12.143	12.151		
			ADAMTSL4	124.939	92.290		

Fig. M1-S4 : Profil d'expression des récepteurs de la famille EGF-R, et de ses ligands, ainsi que les métallo-protéinases dans les cellules RWPE-1 et RWPE-2.

Ces tableaux ont été générés à partir des données de transcriptome concernant les lignées cellulaires RWPE-1 et RWPE-2, disponibles sur le site : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM201762> Les transcrits présents en plusieurs exemplaires ont été obtenus à l'aide de plusieurs oligonucléotides différents. Les résultats sont indiqués en unités arbitraires.

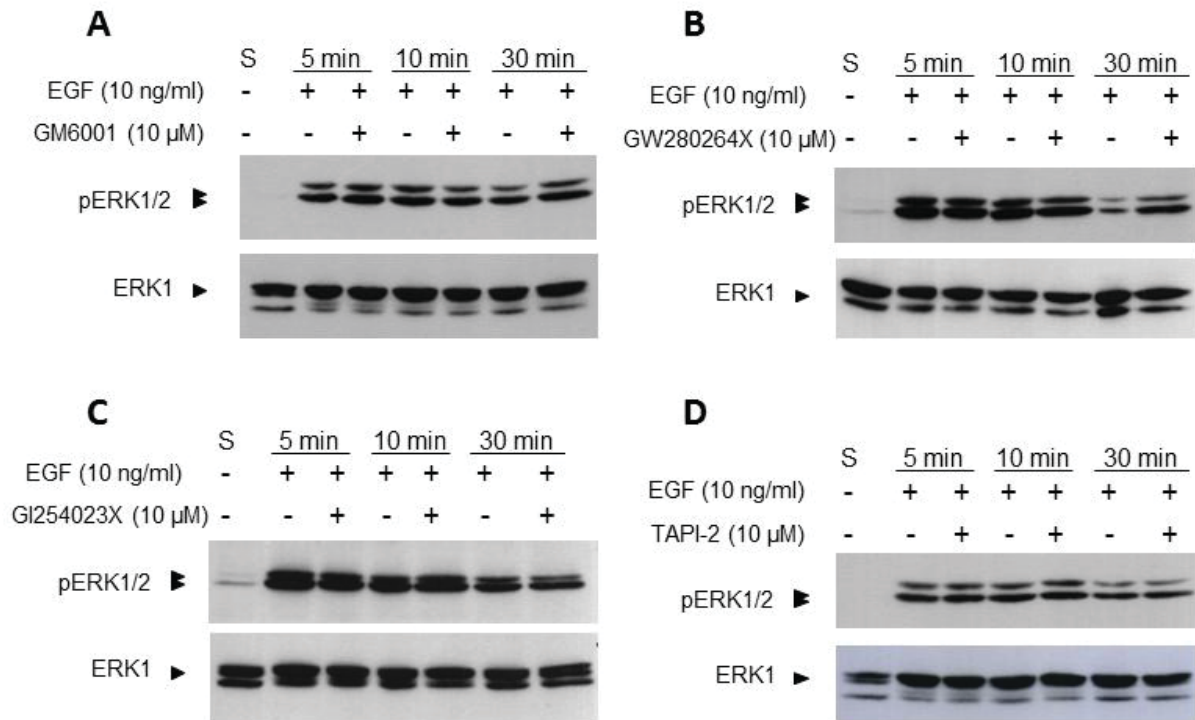
Il s'agit d'un tableau récapitulatif construit à partir des données de transcriptome disponibles sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM201762>. Ces données concernent les transcrits de la lignée RWPE-1, ainsi que celles de son dérivé tumoral : la lignée RWPE-2.

Les puces à ADN ont permis de quantifier l'expression :

- ✓ des quatre récepteurs de la famille de l'EGF-R,
- ✓ des différents ligands de l'EGF-R
- ✓ des métallo-protéinases impliquées dans le clivage d'un pro-ligand de l'EGF-R.

Ces données de transcriptome nous ont permis de savoir que l'EGF-R est le plus exprimé des récepteurs de la famille ERBB dans les cellules RWPE-1. Au niveau des ligands, c'est l'amphiréguline (AREG) et le TGF- $\alpha$  (TGFA) qui sont les plus représentés. Pour les métallo-protéinases, il y a beaucoup d'information, et ce qu'il faut retenir, c'est qu'elles sont toutes exprimées dans les cellules RWPE-1.

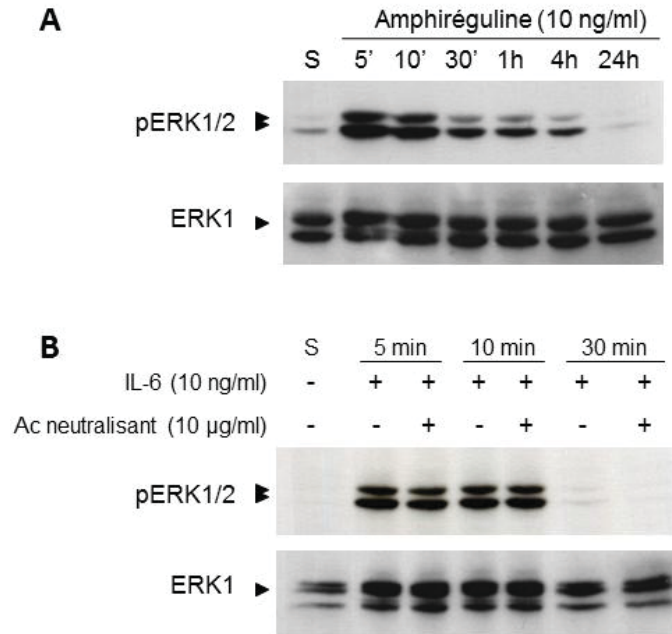




**Fig. M1-S5 : Les inhibiteurs des métallo-protéinases n'ont pas d'effet sur la signalisation d'ERK1/2 en réponse à l'EGF.**

Les cellules RWPE-1 ont été sevrées en facteurs de croissance pendant 2h30, puis mises en présence des différents inhibiteurs (10  $\mu$ M) : l'inhibiteur général des métallo-protéinases GM6001 (A), l'inhibiteur d'ADAM10 et 17 GW280264X (B), l'inhibiteur spécifique d'ADAM10 GI254023X (C) ou l'inhibiteur spécifique d'ADAM17 TAPI-2 (D). Les cellules ont ensuite été stimulées par l'EGF à 10 ng/ml, pendant les temps indiqués. Les membranes ont été marquées avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les formes phosphorylées d'ERK1/2 (pERK1/2). Après déshybridation, les membranes ont été marquées par l'anticorps spécifique d'ERK 1 pour contrôle de charge.

Les cellules RWPE-1 ont été sevrées (S), puis stimulées pendant différents temps par l'EGF (10 ng/ml) en absence ou en présence de différents inhibiteurs de métallo-protéinases. Aucun de ces inhibiteurs n'influence l'activité de la voie ERK1/2 en réponse à l'EGF. Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux de la figure 4 du manuscrit, et ils soulignent la spécificité de l'inhibition observée en réponse à l'IL-6. Ensemble, ces données indiquent l'implication des métallo-protéinases ADAM10 et ADAM17 dans le mécanisme de transactivation de l'EGF-R en réponse à l'IL-6.



**Fig. M1-S6 : L'amphiréguline ne semble pas être le pro-ligand de l'EGF-R clivé en réponse à l'IL-6.**

(A) Les cellules RWPE-1 ont été sevrées en facteurs de croissance pendant 3 h, avant d'être stimulées par l'amphiréguline à 10 ng/ml, pendant les temps indiqués. (B) les cellules ont été sevrées pendant 2h30, puis mises en présence de l'anticorps neutralisant à 10 µg/ml pendant 30 min avant d'ajouter l'IL-6 pour stimulation pendant les temps indiqués. Dans les deux cas, les membranes ont été marquées avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les formes phosphorylées d'ERK1/2 (pERK1/2). Après déshybridation, les membranes ont été marquées par l'anticorps anti-ERK 1 pour contrôle de charge.

A : Après sevrage, l'amphiréguline stimule l'activation de la voie ERK1/2 dans les cellules RWPE-1. La cinétique d'activation d'ERK1/2 en réponse à l'amphiréguline est transitoire. La durée de phosphorylation d'ERK1/2 est intermédiaire entre la cinétique d'activation par l'EGF qui est persistante jusqu'à 24h, et la cinétique d'activation par l'IL-6 qui est transitoire, puisqu'elle ne dure pas au-delà de 10 min.

B : L'utilisation d'un anticorps neutralisant l'action de l'amphiréguline sur son récepteur n'a aucun effet sur l'activation de la voie ERK1/2 en réponse à l'IL-6. Cela suggère que l'amphiréguline ne soit pas le pro-ligand clivé par les ADAM en réponse à une stimulation par l'IL-6.

## 3.2 Article 2

### 3.2.1 Résumé

Les androgènes sont essentiels au développement de la prostate. Ils favorisent la survie, la différenciation et la prolifération des cellules épithéliales et stimulent la production de cytokines par le stroma, en direction de l'épithélium. Le récepteur aux androgènes (RA) est doué de deux modes de signalisation : la signalisation génomique, qui permet l'expression de ses gènes cibles impliqués dans la différenciation ; et la signalisation non génomique, décrite dans un contexte tumoral, et qui permet au RA d'activer des molécules de signalisation comme la PI3K ou Src, favorisant la survie et la prolifération.

Afin de mieux comprendre ces interactions et leur mode de régulation, nous avons choisi de travailler sur un modèle de cellules normales : la lignée RWPE-1 dérivée de la couche basale de l'épithélium de la prostate humaine normale. Comme la voie de l'EGF est indispensable à la prolifération de cette lignée, nous avons cherché à savoir si les voies du RA et du récepteur à l'EGF (EGF-R) interagissent de manière fonctionnelle dans les cellules épithéliales normales.

Une inhibition du RA par le flutamide réduit la prolifération des cellules RWPE-1 en réponse à l'EGF, (voir figure 1). Etant donné que la prolifération dépendante de l'EGF nécessite l'activation de la voie ERK1/2, nous avons cherché à savoir si une inhibition du RA altérerait l'activité de la voie ERK1/2.

Le flutamide et le bicalutamide, qui sont tous deux des inhibiteurs non-stéroïdiens, réduisent effectivement le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 en réponse à l'EGF. Au contraire, le Cyprotérone Acetate, inhibiteur stéroïdien, n'affecte pas du tout la voie ERK1/2 (voir figure 2). La diversité des effets observés peut être liée au mode d'action des inhibiteurs et à la localisation qu'ils imposent au RA. Le flutamide et le bicalutamide induisent en effet une translocation du RA vers le noyau, alors que le CPA l'adresse plutôt à la membrane plasmique.

La réduction significative de l'activité de la voie ERK1/2 par les inhibiteurs du RA suggère une interaction fonctionnelle entre les deux voies. Cela nous a incités à rechercher une interaction moléculaire entre les acteurs des deux voies. A l'aide d'un clone RWPE-1-AR2-2 surexprimant le RA, et en menant parallèlement des approches d'immunoprécipitation et de capture par GST, nous avons pu montrer pour la première fois une association entre le RA et la kinase Raf-1 activatrice de la voie ERK1/2 dans les cellules épithéliales de prostate normale.

Finalement, la mise en évidence d'une interaction fonctionnelle entre le RA et la voie de l'EGF-R, nous a permis de dévoiler une interaction moléculaire entre le RA et la kinase Raf-1 en amont de la voie ERK1/2. Le rôle de cette interaction reste à définir, mais il semblerait que la localisation du récepteur aux androgènes ait un rôle à jouer dans ce contexte.

Ce manuscrit a été soumis à John T. Isaacs, éditeur en chef du journal « *The Prostate* », le 15.11.10.

## 3.2.2 Manuscrit

The Prostate



**Androgen receptor associates with Raf-1 kinase in non-transformed prostate epithelial cells to promote ERK1/2 activation and cell proliferation**

Journal:	<i>The Prostate</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Poncet, Nadège; Université Lyon 1, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire Mouchiroud, Guy; Université Lyon 1, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire
Key Words:	androgen receptor, EGF receptor, ERK1/2, Raf-1, prolifération

SCHOLARONE™  
Manuscripts

ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Androgen receptor associates with Raf-1 kinase in non-transformed prostate epithelial cells to promote ERK1/2 activation and cell proliferation**

Nadège Poncet and Guy Mouchiroud<sup>¶</sup>

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5534, CNRS, Université Lyon 1, 43  
boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne

<sup>¶</sup>: corresponding author

Tel: +33 472 448 372

Fax: +33 472 432 685

E-mail address: [guy.mouchiroud@univ-lyon1.fr](mailto:guy.mouchiroud@univ-lyon1.fr)

**Short title:** Raf-1 associates with androgen receptor

**Keywords:** EGF receptor, androgen receptor, ERK1/2, Raf-1, proliferation

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## ABSTRACT

**BACKGROUND.** Androgen receptor (AR) action as hormone-dependent transcription factor is essential to development and function of normal prostate epithelial cells. AR is also deeply implicated in prostate cancer progression. Moreover, AR can evoke non-genomic signaling pathways in cancer cells through binding to various cytoplasm signal transducers. In that way, AR signaling can interact with EGF-R signaling in prostate cancer.

**METHODS.** We asked whether crosstalk between AR and EGF-R signaling pathways occurs in normal epithelial progenitor cells that might be cell of origin in prostate cancer. The RWPE-1 cell line was used here as a model of non-transformed prostate epithelial progenitor cells. Various anti-androgens were tested for their effects on EGF-dependent cell proliferation (WST-1 reagent) and ERK1/2 activation (western blotting). Next, AR association with signaling molecules was assessed by immunoprecipitation and GST pull-down experiments.

**RESULTS.** EGF-dependent RWPE-1 cell proliferation could be inhibited by non-steroidal anti-androgens. This effect is mediated through rapid and strong inhibition of ERK1/2 phosphorylation, suggesting non-genomic AR effects on ERK1/2 activation pathway. Next we showed by immunoprecipitation experiments that AR can associate with the serine/threonine kinase Raf-1, a critical regulator of ERK1/2 activation. This association was confirmed by GST pull down experiments, yet we could not map protein domains specifically implicated in AR association with Raf-1, which suggests several modes of interaction.

**CONCLUSION.** We show for the first time AR association with Raf-1. Experiments with anti-androgen provide evidence that this interaction may be important for ERK1/2 activation and subsequent epithelial cell proliferation.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## INTRODUCTION

Androgens are key regulators of prostate development that promote cell survival, proliferation or differentiation of the various epithelial cell types. They can also stimulate production by stroma cells of cytokines that act in a paracrine mode on epithelium (1). The androgen receptor (AR) is a member of the steroid hormone receptor family of nuclear receptors and plays essential roles in coordinating gene expression in male reproductive tissues. Unliganded AR is inactive and retained in the cytoplasm within a complex that contains heat shock proteins (Hsp), in particular Hsp90 and Hsp70. Androgen binding results in AR conformational change and dissociation from Hsp complexes. Subsequently, AR is translocated to the nucleus where it interacts with androgen response elements to induce its target genes (2,3).

AR can also mediate a non-genomic signaling, which does not require nuclear translocation nor DNA binding (3-5). Thus, androgens can activate phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3-K) signaling in transcription-independent fashion, which is associated with direct interaction between AR and the p85 regulatory subunit of PI3-K (6). Similarly, androgens trigger AR association with Src, rapidly stimulating Src kinase activity and ERK activation (7).

Interestingly, these non-genomic pathways can be abolished by anti-androgens (6,7).

AR plays a key role in prostate cancer progression, stimulating proliferation and survival of tumor cells. Therefore, androgen ablation is a standard treatment for advanced prostate cancer, but tumors often progress into the so-called androgen-independent state. Various mechanisms have been implicated in the escape from androgen ablation therapy, among which AR phosphorylation by upregulated signaling pathways, leading to "outlaw" AR activation (8-11). Therefore, this mechanism renders AR hypersensitive to low levels of androgens and even enables AR to function in ligand-independent manner.

Recent studies have thus unveiled several ways how AR crosstalks with various signaling cascades at all steps during progression of prostate cancer, in particular with EGF/EGFR signaling (12). Further characterization of the complex molecular interactions between these signaling pathways in normal epithelial cells should help identify what regulatory mechanisms might be altered during prostate carcinogenesis. However, the nature of prostate cancer-initiating cells is still a matter of debate (13,14). Recently, ON Witte and his collaborators have shown that basal epithelium progenitor/stem cells from mouse and human prostate are capable to initiate prostate carcinomas following various genetic alterations (15,16). Here, we asked if AR and EGF-R signaling pathways could functionally interact in



1  
2  
3 normal prostate basal epithelial cells by using the immortalized human prostate cell line  
4 RWPE-1 (17). RWPE-1 cells express progenitor cell markers, differentiate into luminal cells  
5 in response to androgens and do not form tumors when injected into nude mice (18-20).  
6  
7 Optimal RWPE-1 cell proliferation requires EGF in the culture medium and strictly depends  
8 on ERK1/2 activation (17,21). Although its expression is barely detectable in basal epithelial  
9 cells, AR plays an essential role in the maintenance of prostatic epithelium progenitor cells  
10 (22). Similarly, RWPE-1 cells express low levels of AR, and siRNA-mediated silencing of  
11 AR expression results in apoptotic death in RWPE-1 cells (23). In order to unveil possible  
12 interactions between EGF-R and AR signaling pathways in RWPE-1 cells, we first asked if  
13 AR inhibitors could alter RWPE-1 cell responsiveness to EGF, which finally led us to show  
14 for the first time an association between AR and Raf-1, the kinase initiating the ERK1/2  
15 activation cascade.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## 26 MATERIALS AND METHODS

### 27 Reagents

28  
29 EGF used for cell signaling studies (Peprotech) was dissolved to a concentration of 10 mg/ml  
30 in Keratinocyte-Serum Free Medium (K-SFM, Invitrogen) and stored in aliquots at -20° C.  
31  
32 WST-1 cell proliferation reagent was obtained from Roche Diagnostics. Stock solutions of  
33 flutamide (Sigma-Aldrich) and bicalutamide or cyproterone acetate (LKT Laboratories) were  
34 prepared in ethanol and acetone, respectively.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

### 42 Cell culture and proliferation assays

43  
44 RWPE-1 cell line (17) and clone AR2.2, a derivative of RWPE-1 cells overexpressing AR  
45 (24), were respectively provided by Dr. N. Alloli and Dr. V. Vlaeminck-Guilhem, from the  
46 Institute of Functional Genomics, Lyon, France. Both cell lines were maintained in K-SFM  
47 supplemented with 5 ng/ml EGF and 50 ng/ml bovine pituitary extract (complete K-SFM,  
48 Invitrogen). Dose-response tests of flutamide were performed in miniaturised proliferation  
49 assay as follows: 5000 cells were seeded in 96-well culture plates in complete K-SFM (200 µl  
50 per well). After 5 days of culture, WST-1 reagent was added into each well for a 4-hour  
51 incubation at 37° C according to manufacturer's instructions and optical density at 450 nm  
52 was measured using a Victor X5 plate reader (Perkin-Elmer). All cultures were performed in a  
53 humidified incubator at 37° in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Alternately, direct cell counting was  
54 performed in a hemocytometer after staining with trypan blue.  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Cell stimulation and signaling studies

For EGF stimulation experiments, cells were washed free of growth factors then incubated in K-SFM. After 3 hours of starvation, medium was replaced by fresh K-SFM supplemented by EGF (10 ng/ml) and AR inhibitor as specified. For other inhibitor tests, cells were grown at 70-80% confluence in complete K-SFM, then culture medium was replaced by fresh culture medium 30 min before inhibitor addition. Control cultures were performed in the presence of inhibitor diluents at final concentrations (0.1%) equal to those in corresponding experimental points. Other conditions are specified in the text. To stop incubations, medium was removed and changed with cold PBS supplemented by 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Sigma-Aldrich).

### Cell lysis and immunoprecipitation

Cells were removed from culture surface by using a cell scraper, centrifuged and lysed in cold radio immunoprecipitation assay buffer (1% deoxycholic acid, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, pH 7.4) containing protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) and 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Insoluble material was removed by centrifugation, and protein concentration was determined (Protein Assay solution, Bio-Rad). Equalized cell lysates (400  $\mu\text{g}$ ) were incubated with antibodies, according to manufacturers' instructions, and protein G-Sepharose beads (40  $\mu\text{l}$  of 50% suspension, GE Healthcare) for overnight incubation at 4°C with gentle rotation. Immune complexes were washed 3 times in lysis buffer, and bound proteins eluted by boiling for 5 min in Laemmli sample buffer. Immunoprecipitating antibodies were: anti-AR (2  $\mu\text{g}$ ; sc-7305, Santa Cruz) and anti-Raf-1 (8  $\mu\text{g}$ ; #610151, BD Transduction Laboratories). Normal mouse IgG (10  $\mu\text{g}$ , Santa Cruz) were used for control immunoprecipitations.

### GST fusion proteins and pull-down assays

pGEX plasmids encoding full length or domains of AR fused to GST (6) were provided by C. Beaudoin and L. Morel (Laboratory of Genetics, Reproduction and Development, University of Clermont-Ferrand, France). Plasmids containing full length or domains of Raf-1 were PCR amplified from pcDNA3/HA1-c-Raf-1 plasmid (A. Eychène, Curie Institute, Orsay, France), with primers containing Sma-1 restriction sites (underlined nucleotides in primer sequences, see below), then inserted into the unique Sma-1 site of pGEX-3X expression vector (GE Healthcare). Full-length (FL) human Raf-1 cDNA was amplified with FL-forward primer: 5'-

1  
2  
3 GAGAGCCCGGGGATGGAGCACATACAGGGAGC-3', and FL-reverse primer: 5'-  
4 GAGAGCCCGGGGAAGACAGGCAGCCTCGG-3'; N-ter fragment with FL-forward  
5 primer and CR1-reverse primer: 5'-  
6 GAGAGCCCGGGGTACTCCAGTCCACACACATAGT-3'; mid-fragment with the  
7 CR2-forward primer: 5'-GAGAGCCCGGGTGTGTGGACTGGAGTAACATCAG-3' and  
8 CR2-reverse primer: 5'-GAGAGCCCGGGCTTCACTGGCTTCTATTTCCCA-3'; and C-  
9 ter fragment with CR3-forward primer: 5'-  
10 GAGAGCCCGGGGCCAGTGAAGTGATGCTGTCC-3' and FL-reverse primer. The  
11 production and purification of GST proteins on Gluthiatone-Sepharose beads (GE Healthcare)  
12 were performed as previously described (6). Amounts of bound GST-fusion proteins were  
13 equalized after SDS-PAGE, staining with Coomassie Blue and band quantification with  
14 Quantity One software (Biorad). For pull-down experiments, cell lysates (400 µg) were  
15 incubated overnight at 4° C with GST-fusion proteins with gentle rotation. Then, beads were  
16 washed 3 times in affinity buffer and bound proteins eluted by boiling for 5 min in Laemmli  
17 sample buffer.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

### 32 Immunoblotting

33 Proteins from equalized cell lysates or precipitated materials were separated on a SDS-  
34 polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membrane, and blotted with specific primary  
35 antibodies against phospho-ERK (sc-7383, Santa Cruz), ERK1 (sc-93, Santa Cruz), AR  
36 (PG21, Upstate), Raf-1 (sc-227, Santa Cruz), p85 (#610045, BD Transduction Laboratories)  
37 or c-Src (anti-SRC-2, sc-18, Santa Cruz). Antibody binding was visualized using HRP-  
38 conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich) and ECL<sup>+</sup> reagent (GE Healthcare).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

### 46 Statistical analysis

47 Statistical significance was determined by Student's t-test (paired-data analysis). P values <  
48 0.05 were considered as statistically significant.  
49  
50

## 51 RESULTS

### 52 Flutamide inhibits EGF-dependent proliferation

53 Flutamide, a pure non-steroidal anti-androgen that can inhibit AR binding of androgen at high  
54 concentrations (25), was used to test implication of AR in EGF-dependent proliferation of  
55 RWPE-1 cells. For that purpose, RWPE-1 cells were cultured in 96-well plates in complete  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

K-SFM medium for 5 days in the presence of increasing concentrations of flutamide, then viable cell amounts were quantified by colorimetry using WST-1 reagent. Optical density (OD) values were significantly decreased by flutamide in a dose-dependent manner, with strong cytotoxic effects at highest concentrations (Fig. 1A). To confirm inhibitory effects of flutamide, cells were cultivated for 3, 5 or 7 days in culture flasks in the presence or not of 5  $\mu\text{g/ml}$  flutamide, which caused half-maximal inhibition in WST-1 assay. Experiments clearly confirmed inhibitory effects of flutamide on RWPE-1 cell proliferation (Fig. 1B, left panel), suggesting that androgen receptor is implicated in EGF-dependent proliferation of RWPE-1 cells. The effects of flutamide were observed in cultures without added androgens, but it was reported that BPE used as a supplement in K-SFM medium, might be a source of steroid hormones (26,27). Therefore, flutamide effects on RWPE-1 cell proliferation were tested in parallel in cultures performed in K-SFM supplemented only with EGF, *i.e.* in androgen-free and chemically defined medium. Under these conditions, growth rate was lower than in complete culture medium (Fig. 1B, right panel), confirming that BPE provides factors favoring cell proliferation and survival (26). Interestingly, flutamide still exerted significant inhibitory effects on cell production although the magnitude of these effects was smaller than in BPE-supplemented cultures (Fig. 1B). Therefore, androgen receptor might control EGF-dependent proliferation in the absence of its ligand.

#### Androgen receptor inhibition rapidly blocks ERK1/2 phosphorylation

We have previously shown that EGF stimulation of RWPE-1 cell proliferation depends on ERK-1/2 activation (21). Consequently, we first asked if flutamide effects on RWPE-1 cell proliferation might be mediated through alterations in pathways leading to ERK1/2 activation. For that, exponentially growing RWPE-1 cells were starved of EGF and BPE for 3 hours, then stimulated with 10 ng/ml EGF for various times in the presence or the absence of 25  $\mu\text{g/ml}$  flutamide. This concentration was determined as optimal in preliminary experiments that also confirmed the absence of increased cell death 24 h after flutamide addition (not shown). Western blotting analysis of cell lysates showed that EGF stimulated long-term ERK-1/2 phosphorylation irrespective of the presence of flutamide, but flutamide addition resulted in decreased levels of ERK1/2 phosphorylation throughout the duration of EGF stimulation (Fig. 2A). Androgen receptor functions as a transcriptional regulator, but it can also act more rapidly through non-genomic pathways (4). Results in Figure 2A show flutamide effects as soon as 30 min after the beginning of cell stimulation, which is compatible with both modes of action. Non-genomic control of ERK1/2 activation by androgen receptor would imply that

1  
2  
3 the effects of flutamide could be observed within minutes after its addition to cultures. In  
4 order to test this possibility, cell protocol was modified in several ways. First, flutamide was  
5 introduced in standard RWPE-1 cell cultures rather than in cultures re-stimulated by EGF  
6 after growth factor starvation. The rationale in doing so was to test flutamide effects without  
7 interference with the kinetics of EGF stimulation. Second, flutamide was added to cultures for  
8 times ranging from 5 min to 24 h. Figure 2B shows that ERK1/2 phosphorylation was  
9 strongly decreased as soon as 5 min after flutamide addition and was partly restored after 4 h.  
10 Two other AR inhibitors were tested following the same protocol: bicalutamide, that, like  
11 flutamide, induces rapid and reversible AR translocation to the nucleus and cyproterone  
12 acetate, that causes non reversible AR sequestration in the cytoplasm (28). Interestingly,  
13 bicalutamide had similar effect to that of flutamide whereas cyproterone acetate did not alter  
14 ERK1/2 phosphorylation, suggesting that inhibitory effects of anti-androgens on ERK1/2  
15 activation are linked to their ability to modulate subcellular AR localization (Fig. 2B).  
16 Collectively, data indicate that unbound androgen receptor control ERK1/2 activation  
17 downstream of EGF receptor through non-genomic mechanisms.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

#### 32 **Androgen receptor association with Raf-1**

33 The inhibitory effects of flutamide (or bicalutamide) on ERK1/2 phosphorylation could  
34 implicate either positive or negative regulators of the ERK pathway. Since flutamide or  
35 bicalutamide induce androgen receptor translocation to the nucleus (28), we reasoned that  
36 positive ERK1/2 regulators might associate with androgen receptor and become mislocalized  
37 following inhibitor addition. Therefore, we first sought for possible association between AR  
38 and the kinase Raf-1 that acts upstream of the MAP kinase cascade leading to ERK1/2  
39 activation (29). Since AR protein is not detectable in RWPE-1 cells, we used AR2.2 cells, a  
40 clone of RWPE-1 cells overexpressing AR, for immunoprecipitation studies (24). Similar to  
41 RWPE-1 cells, proliferation of AR2.2 cells depends on EGF and is inhibited by flutamide  
42 (Fig. S1). Moreover, flutamide rapidly and strongly inhibits ERK1/2 activation in AR2.2 cells  
43 (Fig. S2). AR2.2 cells were grown in standard culture medium to 70-80% confluence then cell  
44 lysates were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific to androgen receptor  
45 or Raf-1. Figure 3A shows that anti-AR antibody efficiently precipitated AR and also  
46 significant amounts of Raf-1, as compared to control IgG immunoprecipitation. Reciprocally,  
47 anti-Raf-1 antibodies could co-immunoprecipitate AR. Thus, immunoprecipitation  
48 experiments demonstrated *in vivo* association of Raf-1 and AR in non-transformed prostate  
49 epithelial cells. Next, GST pull-down experiments were performed to confirm this association  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 using GST-fusion proteins containing full-length (FL) or various fragments of AR and Raf-1  
4 (Fig. 3B and 3C, upper panels). First, full length GST-Raf-1 and GST-AR could pull down  
5 endogenous AR and Raf-1 from RWPE-1 cell lysates, respectively (Fig. 3B and 3C, lower  
6 panel, lanes FL). Moreover, GST-AR could pull-down Raf-1 with similar efficacy as Src or  
7 the p85 subunit of PI3-kinase, already known to be AR partners (6,7). Finally, N-ter  
8 fragments of AR or Raf-1 were as efficient as FL proteins in pull down experiments, but  
9 significant binding was also observed with other fragments (Fig. 3B and 3C, lower panels,  
10 lanes N-ter, mid and C-ter). In conclusion, we have shown for the first time association of AR  
11 with Raf-1 kinase. Furthermore, GST pull down studies with AR or Raf-1 fragments  
12 suggested multiple modes of interaction.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

## 21 DISCUSSION

22  
23  
24  
25  
26 RWPE-1 cells express AR at the transcript level, but AR protein is not detectable although  
27 cells are able to differentiate into luminal-type cells in response to androgens (18-20). Here,  
28 we observed that non-steroidal pure anti-androgens (flutamide and bicalutamide) significantly  
29 decreased RWPE-1 cell proliferation in a chemically defined medium, i.e. in the absence of  
30 any steroid hormone. Thus, AR can stimulate cell proliferation in the absence of its ligand and  
31 trigger differentiation in the presence of androgens in RWPE-1 cells. In normal human  
32 prostate epithelium, the transient amplifying (TA) progenitor cells express AR mRNA and  
33 AR protein can only be detected in the presence of proteasome inhibitors. Androgen treatment  
34 upregulates AR expression and promotes terminal differentiation in TA cells, which is  
35 inhibited by anti-androgens (22). In contrast, TA cell proliferation appears to be androgen-  
36 independent (22,30). Therefore, in light of our findings with RWPE-1 cells, it would be  
37 interesting to assess the effects of AR inhibition on TA cell proliferation to learn if unliganded  
38 AR might play a role in normal prostate epithelium.  
39

40 ERK1/2 phosphorylation is essential to proliferation of RWPE-1 cells in response to EGF  
41 (21). We have shown here that ERK1/2 phosphorylation was strongly decreased within 5 min  
42 of addition of flutamide or bicalutamide to culture medium, which is consistent with non-  
43 genomic AR signaling. Accordingly, further experiments showed association between AR and  
44 Raf-1, opening the question of whether inhibition of ERK1/2 phosphorylation by these anti-  
45 androgens might be mediated through alteration of Raf-1 function. Indeed, Raf-1 is critically  
46 involved in linking activated growth factor receptors to the ERK1/2 activation cascade at the  
47 cell membrane (31). Flutamide and bicalutamide induce AR translocation from cytoplasm to  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 nucleus where it reversibly associates to nuclear matrix components (28). Thus, complexes of  
5 Raf-1 and AR would be targeted to the nucleus by anti-androgens, preventing Raf-1 to  
6 activate the MEK/ERK cascade at the cell membrane. In contrast, cyproterone acetate was  
7 shown to induce AR association with membranes and sequestration in the cytoplasm (28),  
8 which is consistent with its absence of effects on ERK1/2 phosphorylation in RWPE-1 cells.  
9 Therefore, AR could modulate ERK1/2 activation downstream of EGF receptor through its  
10 association with Raf-1.  
11  
12  
13  
14  
15

### 16 17 CONCLUSION

18  
19  
20 Here we demonstrate for the first time AR association with Raf-1 by co-immunoprecipitation  
21 and GST-pull down experiments. However, using various fragments fused to GST did not  
22 enable us to identify specific domains mediating interaction between these two proteins. Thus,  
23 several modes of interaction are likely involved in AR association with Raf-1, which is  
24 corroborated by the literature. Thus, both proteins can be found in Hsp-containing complexes  
25 (2,32,33). Preliminary experiments showed meaningful association of Hsp70, not Hsp90, with  
26 AR and Raf-1 (data not shown). Interestingly, both AR and Raf-1 interact with Bag1, a  
27 partner protein for Hsp70 (34) that also modulates their activity (35,36). Similar to  
28 glucocorticoid receptor, another member of the nuclear receptor superfamily, AR could  
29 interact with Raf-1 via 14-3-3 protein since 14-3-3 proteins can interact with AR and increase  
30 its transcriptional activity, even in the absence of androgens (37-39). Finally, GST pull down  
31 data also raise the possibility of both indirect and direct interactions between AR and Raf-1.  
32 In conclusion, we describe here a novel interaction between AR and Raf-1, a critical regulator  
33 of ERK1/2 activation. Studies with anti-androgens strongly suggest that this interaction is  
34 positively implicated in ERK1/2 activation downstream of EGF-R, thereby regulating  
35 proliferation in RWPE-1 cells, a well-recognized model of normal prostate epithelial  
36 progenitor cells. Moreover, AR modulation of ERK1/2 activation occurs in the absence of  
37 androgen. This mechanism may be of clinical importance for androgen-independent state of  
38 prostate cancer.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

### 56 57 ACKNOWLEDGEMENTS

58  
59  
60 This investigation was supported by grant for Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du  
Rhône). N.P. was supported by fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de

1  
2  
3 la Recherche. Authors thank Nathalie Allioli and Virginie Vlaeminck-Guilhem for providing  
4 cells and advice, Claude Beaudoin for help with GST-AR, Boris Guyot and Alain Eychène for  
5 help with GST-Raf-1, Laurent Morel and Muriel Le Romancer for helpful discussions and  
6 advice.  
7  
8  
9

## 10 REFERENCES

- 11 1. Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y. Stromal-epithelial interactions and  
12 heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem Cell Biol*  
13 1986;64(6):608-614.
- 14 2. Veldscholte J, Berrevoets CA, Mulder E. Studies on the human prostatic cancer cell  
15 line LNCaP. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;49(4-6):341-346.
- 16 3. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell  
17 biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(6):813-  
18 827.
- 19 4. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K,  
20 DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK,  
21 Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling  
22 through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional  
23 activity. *Cell* 2001;104(5):719-730.
- 24 5. Bonaccorsi L, Nosi D, Quercioli F, Formigli L, Zecchi S, Maggi M, Forti G, Baldi E.  
25 Prostate cancer: a model of integration of genomic and non-genomic effects of the  
26 androgen receptor in cell lines model. *Steroids* 2008;73(9-10):1030-1037.
- 27 6. Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veyssiere G, Morel L.  
28 Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-  
29 OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem*  
30 2004;279(15):14579-14586.
- 31 7. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M,  
32 Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced  
33 androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer  
34 cell proliferation. *EMBO J* 2000;19(20):5406-5417.
- 35 8. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate  
36 cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(1):34-45.
- 37 9. Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM,  
38 Christian RE, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ. Androgen receptor  
39 phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol*  
40 *Chem* 2002;277(32):29304-29314.
- 41 10. Gregory CW, Fei X, Ponguta LA, He B, Bill HM, French FS, Wilson EM. Epidermal  
42 growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent  
43 prostate cancer. *J Biol Chem* 2004;279(8):7119-7130.
- 44 11. Ponguta LA, Gregory CW, French FS, Wilson EM. Site-specific androgen receptor  
45 serine phosphorylation linked to epidermal growth factor-dependent growth of  
46 castration-recurrent prostate cancer. *J Biol Chem* 2008;283(30):20989-21001.
- 47 12. Mimeault M, Batra SK. Recent advances on multiple tumorigenic cascades  
48 involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis*  
49 2006;27(1):1-22.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

13. Taylor RA, Toivanen R, Risbridger GP. Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem. *Endocr Relat Cancer* 2010;17(4):R273-285.
14. Goldstein AS, Stoyanova T, Witte ON. Primitive origins of prostate cancer: in vivo evidence for prostate-regenerating cells and prostate cancer-initiating cells. *Mol Oncol* 2010;4(5):385-396.
15. Goldstein AS, Huang J, Guo C, Garraway IP, Witte ON. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* 2010;329(5991):568-571.
16. Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, Xin L, Huang J, Witte ON. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(6):2610-2615.
17. Bello D, Webber MM, Kleinman HK, Wartinger DD, Rhim JS. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* 1997;18(6):1215-1223.
18. Webber MM, Bello D, Kleinman HK, Hoffman MP. Acinar differentiation by non-malignant immortalized human prostatic epithelial cells and its loss by malignant cells. *Carcinogenesis* 1997;18(6):1225-1231.
19. Harma V, Virtanen J, Makela R, Happonen A, Mpindi JP, Knuutila M, Kohonen P, Lotjonen J, Kallioniemi O, Nees M. A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS One* 2010;5(5):e10431.
20. Litvinov IV, Vander Griend DJ, Xu Y, Antony L, Dalrymple SL, Isaacs JT. Low-calcium serum-free defined medium selects for growth of normal prostatic epithelial stem cells. *Cancer Res* 2006;66(17):8598-8607.
21. Poncet N, Guillaume J, Mouchiroud G. Epidermal growth factor receptor transactivation is implicated in IL-6-induced proliferation and ERK1/2 activation in non-transformed prostate epithelial cells. submitted 2010.
22. Heer R, Robson CN, Shenton BK, Leung HY. The role of androgen in determining differentiation and regulation of androgen receptor expression in the human prostatic epithelium transient amplifying population. *J Cell Physiol* 2007;212(3):572-578.
23. Liao X, Tang S, Thrasher JB, Griebeling TL, Li B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2005;4(4):505-515.
24. Altintas D, Vlaeminck-Guillem V, Angelov D, Dimitrov S, Samarut J. Cell cycle regulated expression of NCoR might control cycle expression of androgen responsive genes in an immortalized prostate cell line. *Mol Cell Endocrinol* 2010;in press.
25. Simard J, Luthy I, Guay J, Belanger A, Labrie F. Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1986;44(3):261-270.
26. Kent KD, Bomser JA. Bovine pituitary extract provides remarkable protection against oxidative stress in human prostate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003;39(8-9):388-394.
27. Benbrahim-Tallaa L, Webber MM, Waalkes MP. Acquisition of androgen independence by human prostate epithelial cells during arsenic-induced malignant transformation. *Environ Health Perspect* 2005;113(9):1134-1139.
28. Whitaker HC, Hanrahan S, Totty N, Gamble SC, Waxman J, Cato AC, Hurst HC, Bevan CL. Androgen receptor is targeted to distinct subcellular compartments in



- 1  
2  
3  
4 response to different therapeutic antiandrogens. *Clin Cancer Res* 2004;10(21):7392-7401.  
5  
6 29. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK  
7 pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351 Pt 2:289-305.  
8 30. Uzgare AR, Xu Y, Isaacs JT. In vitro culturing and characteristics of transit  
9 amplifying epithelial cells from human prostate tissue. *J Cell Biochem*  
10 2004;91(1):196-205.  
11 31. Wartmann M, Davis RJ. The native structure of the activated Raf protein kinase is  
12 a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* 1994;269(9):6695-6701.  
13 32. Pratt WB. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction  
14 by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev*  
15 *Pharmacol Toxicol* 1997;37:297-326.  
16 33. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular  
17 mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(6):670-684.  
18 34. Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z,  
19 Morimoto RI, Reed JC. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70.  
20 *EMBO J* 1997;16(16):4887-4896.  
21 35. Froesch BA, Takayama S, Reed JC. BAG-1L protein enhances androgen receptor  
22 function. *J Biol Chem* 1998;273(19):11660-11666.  
23 36. Song J, Takeda M, Morimoto RI. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress  
24 signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol*  
25 2001;3(3):276-282.  
26 37. Widen C, Zilliacus J, Gustafsson JA, Wikstrom AC. Glucocorticoid receptor  
27 interaction with 14-3-3 and Raf-1, a proposed mechanism for cross-talk of two  
28 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2000;275(50):39296-39301.  
29 38. Quayle SN, Sadar MD. 14-3-3 sigma increases the transcriptional activity of the  
30 androgen receptor in the absence of androgens. *Cancer Lett* 2007;254(1):137-  
31 145.  
32 39. Titus MA, Tan JA, Gregory CW, Ford OH, Subramanian RR, Fu H, Wilson EM,  
33 Mohler JL, French FS. 14-3-3{eta} Amplifies Androgen Receptor Actions in  
34 Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7571-7581.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

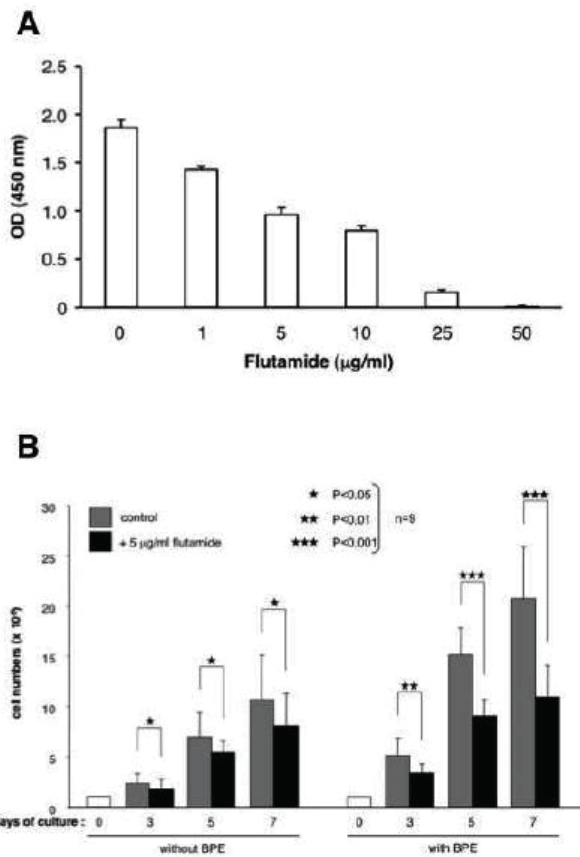
## FIGURE LEGENDS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8 **Fig. 1.** Inhibition of RWPE-1 cell proliferation by flutamide. (A) RWPE-1 cells were  
9 cultivated for 5 days in 96-well plates in the presence of various concentrations of flutamide  
10 and proliferation was measured with WST-1 reagent as described in Materials and methods.  
11 O.D. (450 nm): optical density measured at 450 nm. (B) Cells were cultivated in culture flasks  
12 in the presence of flutamide or not for indicated times. Proliferation data are given as total cell  
13 numbers  $\pm$  standard error of mean in 9 independent experiments.  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 **Fig. 2.** Inhibition of ERK1/2 phosphorylation by non-steroidal anti-androgens. (A) Cells were  
21 EGF- and BPE-deprived for 3 h then stimulated with EGF in the presence of flutamide or not  
22 for indicated times. Blots were probed with antibodies that specifically recognize  
23 phosphorylated forms of ERK1/2 (pERK1/2). Membranes were stripped and reprobed with  
24 anti-ERK1 antibody for loading controls. (B) Cells were cultivated in complete culture  
25 medium and anti-androgens were added for incubation times as indicated. Western blotting  
26 was performed as in (A).  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

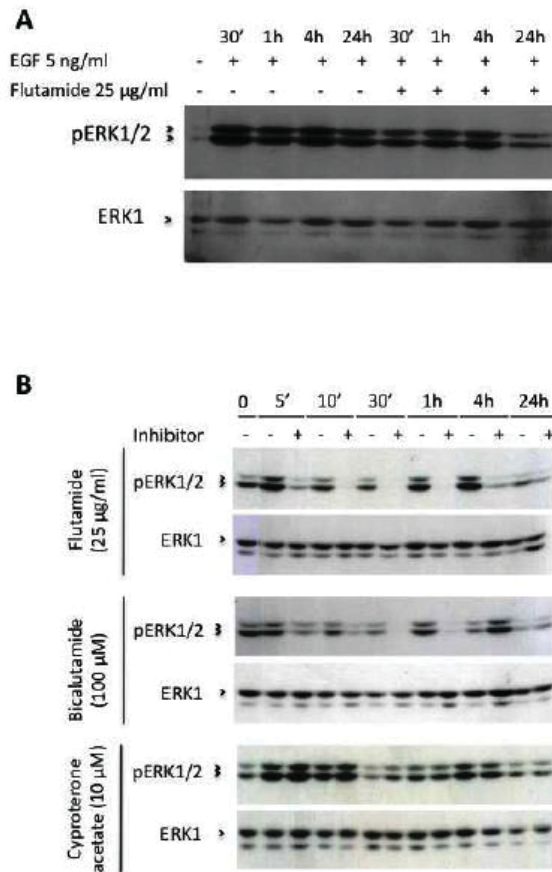
34 **Fig. 3.** AR associates with Raf-1. (A) AR2.2 cells were grown in complete culture medium  
35 and harvested from subconfluent cultures. Whole cell lysates (WCL) were subjected to  
36 immunoprecipitation with specified antibodies then precipitated material was probed for AR  
37 or Raf-1 by western blotting. (B) Lysates from RWPE-1 cells grown in complete culture  
38 medium were used for in vitro pull down of AR with GST fused to full-length Raf-1 protein  
39 (FL) or fragments as specified in upper panel. (C) The same for in vitro pull down of Raf-  
40 1with GST fused to full-length AR protein (FL) or fragments as specified in upper panel. Pull  
41 down of p85 and Src were performed with GST fused to full length AR for positive controls.  
42 (A-C) Data shown here have reproduced at least 3 times in independent experiments. WCL  
43 lane corresponds to 1:10 of input material.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Effects of (A) increasing doses of flutamide on cell proliferation and (B) flutamide on cell proliferation in the presence or the absence of BPE  
179x243mm (72 x 72 DPI)

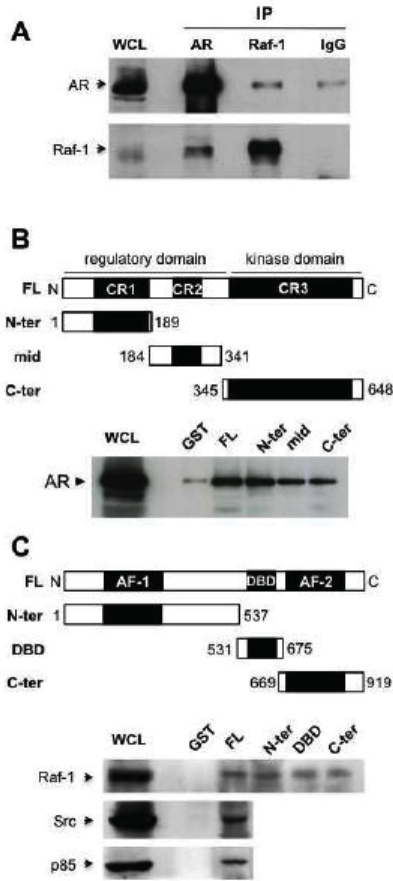
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Western blots showing ERK1/2 phosphorylation in (A) starved cells stimulated by EGF in the presence or not of flutamide and (B) cells maintained in EGF and treated for various durations by different anti-androgens  
175x264mm (72 x 72 DPI)

The Prostate

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Raf-1 association with androgen receptor shown in (A) immunoprecipitation or (B,C) GST-pull down experiments  
139x287mm (72 x 72 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

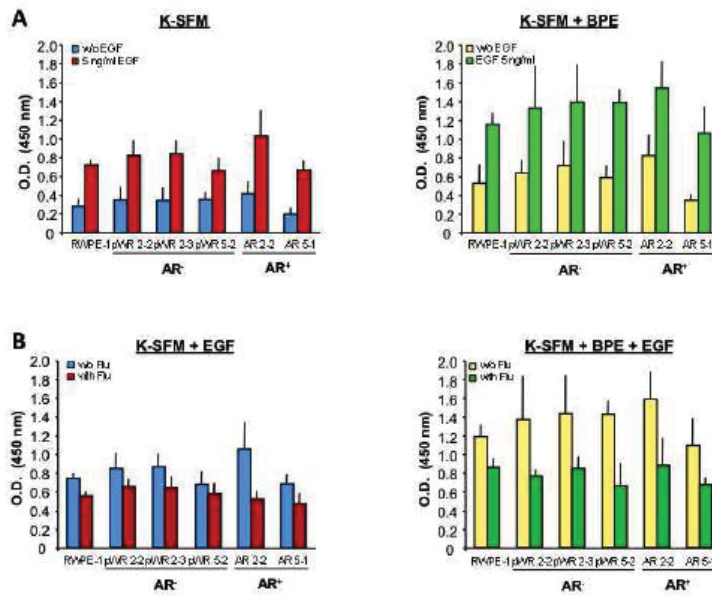
### Legends to supplementary figures

**Fig. S1.** Response to EGF and flutamide of different clones derived from RWPE-1 cell lines. Briefly, RWPE-1 cells were infected with lentiviral AR expression vector (AR+) or corresponding control vector (AR-). Stable clones were obtained after GFP+ cell sorting [Altintas et al. (2010) Cell cycle regulated expression of NCoR might control cycle expression of androgen responsive genes in an immortalized prostate cell line, *Mol Cell Endocrinol, in press*]. RWPE-1 cells and derivatives were cultivated for 5 days in 96-well plates in the presence of various concentrations of flutamide (Flu) and proliferation was measured with WST-1 reagent as described in Materials and methods. O.D. (450 nm): optical density measured at 450 nm. (A) Cells were tested for proliferative response to EGF in the presence (right) or absence (left) of BPE. (B) Cells were treated or not with flutamide in the presence (right) or absence (left) of BPE.

**Fig. S2.** Inhibition of ERK1/2 phosphorylation by flutamide in AR2.2 cells. Cells were cultivated in complete K-SFM and flutamide was added for incubation times as indicated. Blots were probed with antibodies that specifically recognize phosphorylated forms of ERK1/2 (pERK1/2). Membranes were stripped and reprobred with anti-ERK1 antibody for loading controls. Results are representative of 3 independent experiments.

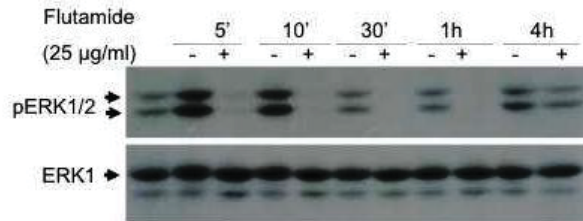


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Effects of flutamide on proliferation of various RWPE-1 cell line subclones  
257x208mm (72 x 72 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Western blot showing the effects of flutamide on ERK1/2 phosphorylation in AR2.2 cells maintained in EGF-supplemented culture medium  
147x68mm (72 x 72 DPI)

Peer Review



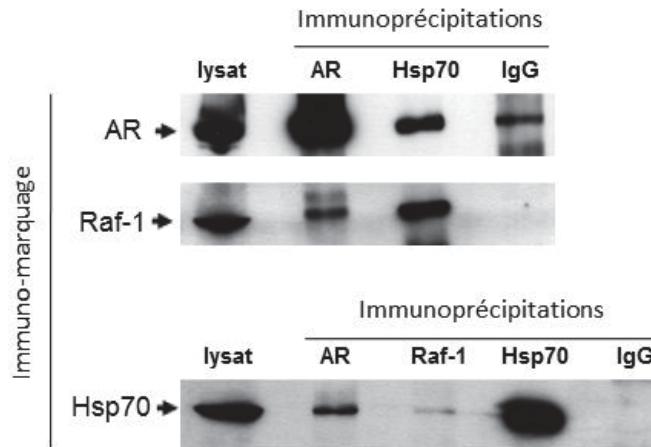
### 3.2.3 Résultats supplémentaires

**Fig.M2- S1. Response to EGF and flutamide of different clones derived from RWPE-1 cell lines.**

L'étude de la réponse proliférative des clones pWR (AR<sup>-</sup>) et AR (AR<sup>+</sup>) a montré que l'EGF induit une croissance équivalente entre les différents clones et la lignée d'origine (A). La présence de BPE n'a pas d'impact sur la réponse proliférative des clones AR<sup>+</sup>, par rapport aux clones AR<sup>-</sup> (A, à droite). Une inhibition du récepteur aux androgènes par le flutamide réduit la réponse proliférative des cellules à l'EGF, avec une amplitude plus marquée pour le clone AR2-2 en absence de BPE (B, à gauche). L'effet du flutamide sur la baisse de prolifération est plus significatif en présence de BPE (B, à droite). Finalement tous les clones ont le même comportement en réponse à l'EGF et au flutamide que la lignée d'origine.

**Fig. M2-S2. Inhibition of ERK1/2 phosphorylation by flutamide in AR2-2 cells.**

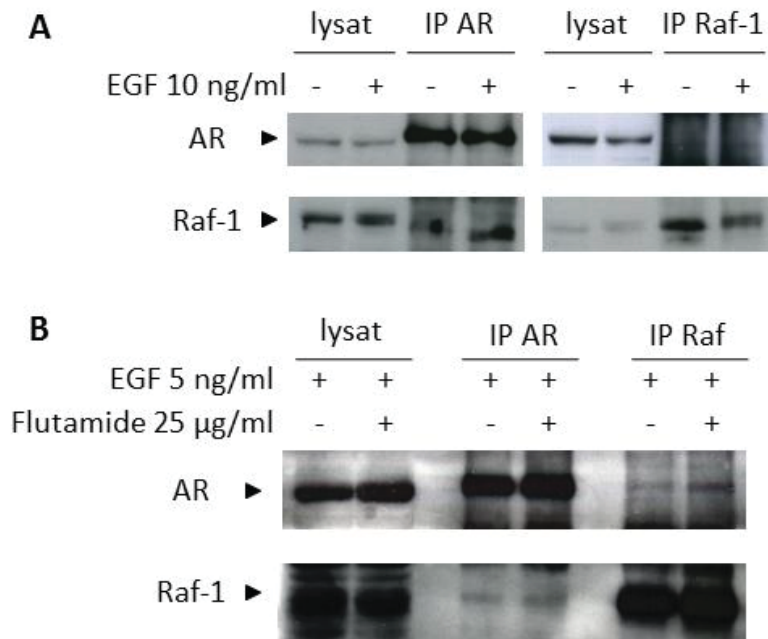
D'après la figure précédente, les clones AR<sup>+</sup> se comportent de la même manière que les cellules RWPE-1 en termes de réponse proliférative. Afin de savoir si les effets observés sur la prolifération sont corrélés à l'activité d'ERK1/2, le même protocole que la figure 2B a été appliqué aux cellules RWPE-1-AR2-2. Dans ce clone, comme dans la lignée d'origine, le flutamide réduit le niveau d'activité de la voie ERK1/2. Les bandes visibles sur l'immunoblot ont été quantifiées et l'histogramme montre que l'inhibition de la voie ERK1/2 par le flutamide est drastique jusqu'à 4h de traitement.



**Fig. M2-S3 : Le récepteur aux androgènes (AR) et Raf-1 interagissent avec Hsp70**

Les cellules RWPE-1-AR2-2 ont été traitées 30 min en entretien. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps spécifique du récepteur aux androgènes (Santa Cruz), de Raf-1 (BD Biosciences) ou d'Hsp70 (Stressgen). Les membranes ont été marquées avec les anticorps qui reconnaissent spécifiquement le récepteur aux androgènes, Raf-1 et Hsp70.

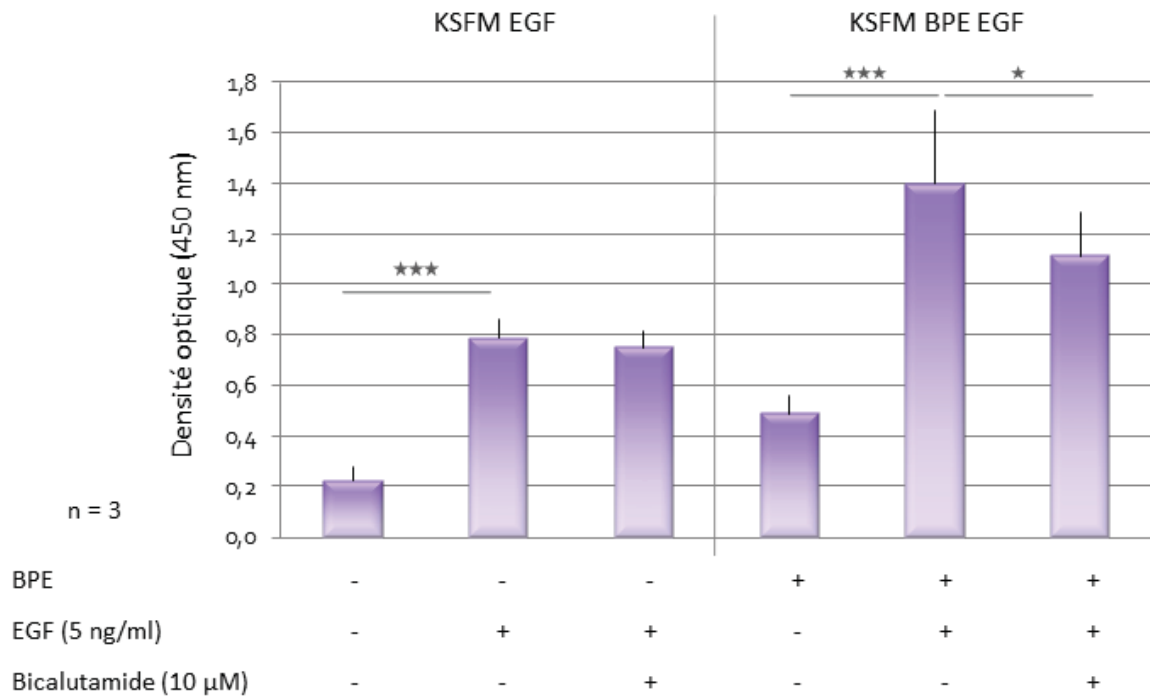
Des expériences d'immuno-précipitation du récepteur aux androgènes (AR), d'Hsp70 ou de Raf-1 ont été menées sur les lysats des cellules RWPE-1-AR2-2 maintenues en entretien. Cette approche indique que récepteur aux androgènes co-précipite Raf-1 et Hsp70, et que la protéine chaperonne Hsp 70 co-précipite AR et Raf-1. Ces données supportent l'hypothèse d'une interaction indirecte entre le récepteur aux androgènes et la kinase Raf-1, avec Hsp70 comme intermédiaire. Cependant, seules, ces données d'immuno-précipitation ne permettent pas de déterminer si les trois molécules sont présentes dans le même complexe.



**Fig. M2-S4 : L'interaction entre le récepteur aux androgènes (AR) et Raf-1 semble être constitutive**

(A) Les cellules RWPE-1-AR2-2 ont été sevrées pendant 3h, puis stimulées pendant 10 min par l'EGF à 10 ng/ml. (B) Les cellules en entretien ont été traitées 30 min par 25 µg/ml de flutamide. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps spécifique du récepteur aux androgènes (Upstate) ou de Raf-1 (Santa Cruz). Les membranes ont été marquées avec les anticorps qui reconnaissent spécifiquement le récepteur aux androgènes et Raf-1

Les immuno-précipitations du récepteur aux androgènes (AR) et de Raf-1 ont été menées sur les cellules RWPE-1-AR2-2 maintenues dans différents contextes environnementaux, afin de déterminer s'il existe une régulation de l'interaction RA-Raf-1 dépendante des stimuli extracellulaires. Les résultats de ces expériences n'indiquent aucune différence de taux d'association des deux protéines en fonction des conditions environnementales, suggérant que l'interaction entre RA et Raf-1 est constitutive. Cependant ces expériences ont été réalisées sans le contrôle IgG permettant d'exclure l'éventuelle fixation des protéines ciblées sur les billes.

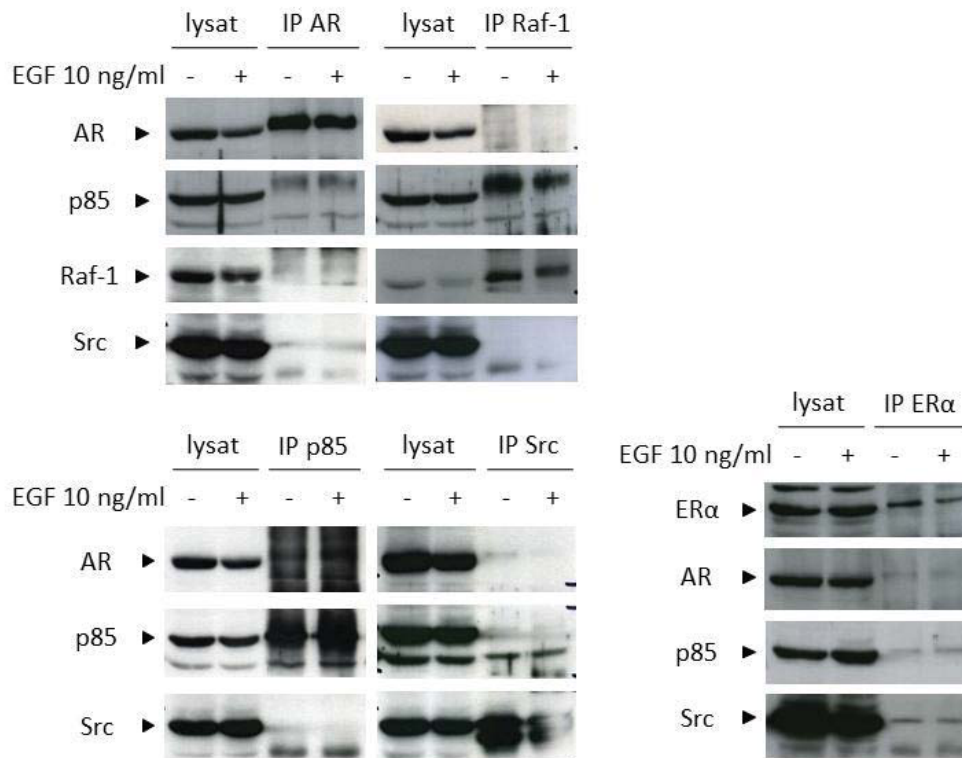


**Fig.M2-S5 : Le bicalutamide inhibe la prolifération des cellules RWPE-1 en réponse à l'EGF**

Les cellules RWPE-1 ont été cultivées pendant 5 jours en plaques 96 puits afin d'étudier leur réponse proliférative à l'EGF (5 ng/ml) en absence (à gauche) ou en présence (à droite) de BPE, et en absence ou en présence de bicalutamide (10  $\mu$ M). La prolifération a été mesurée grâce au WST-1 comme dans la figure 1A du manuscrit.

Les cellules RWPE-1 ont été cultivées pendant 5 jours dans les conditions de culture décrites dans le tableau, puis elles ont été quantifiées par test colorimétrique, donnant une indication sur leur niveau de prolifération pendant ces 5 jours de culture. Les résultats obtenus indiquent que dans les deux conditions, les cellules prolifèrent significativement en réponse à l'EGF par rapport au contrôle. Par contre le bicalutamide réduit la prolifération d'une manière plus probante en présence de BPE qu'en son absence. Cela indique tout de même que le bicalutamide exerce le même type d'effet que le flutamide sur la prolifération des cellules RWPE-1 en réponse à l'EGF.

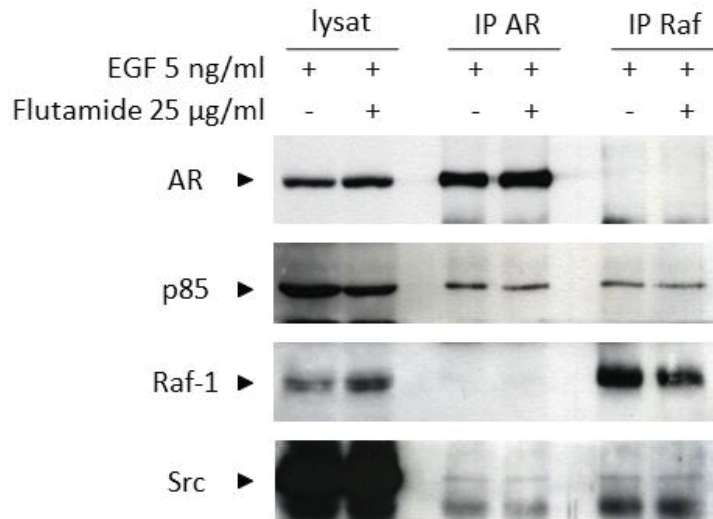
## Résultats



**Fig. M2-S6 : Le récepteur aux androgènes (AR) et Raf-1 interagissent avec diverses molécules de signalisation**

Les cellules RWPE-1-AR2-2 ont été sevrées pendant 3h, puis stimulées pendant 10 min par l'EGF à 10 ng/ml. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide d'anticorps spécifiques du récepteur aux androgènes (Upstate), de Raf-1 (Santa Cruz), de p85 (Upstate), de Src (Santa-Cruz) et de l'ERα (Santa Cruz). Les membranes ont été marquées avec les anticorps qui reconnaissent spécifiquement ces mêmes protéines.

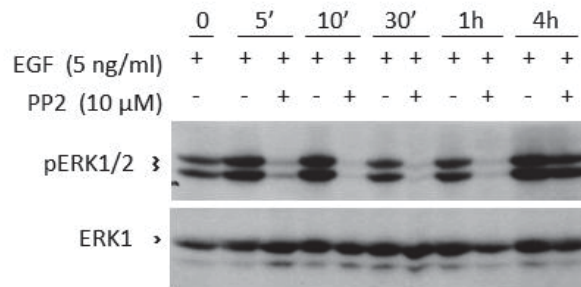
Dans la littérature, diverses expérimentations menées sur des cellules tumorales montrent une association entre le récepteur aux androgènes et diverses molécules de signalisation, comme Src ou p85, mais aussi avec d'autres récepteurs stéroïdiens, notamment le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  (Baron et al., 2004; Migliaccio et al., 2000). Nous avons donc regardé si le récepteur aux androgènes a les mêmes partenaires dans les cellules RWPE-1. Les résultats de ces expériences de co-immunoprécipitation ne montrent aucune différence entre les cellules sevrées et les cellules stimulées. Le récepteur aux androgènes co-précipite p85, Raf-1 et Src ; de même, Raf-1 co-précipite AR, p85 et Src. Réciproquement p85 co-précipite AR et Src ; et Src co-précipite AR et p85. Par ailleurs, le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  co-précipite à la fois AR, p85 et Src. Cela indique que le récepteur aux androgènes interagit avec toutes ces molécules de signalisation dans les cellules normales. Il faut néanmoins rester prudent dans les interprétations de ces résultats, car ces expériences ont été réalisées sans le contrôle IgG permettant d'exclure l'éventuelle fixation des protéines ciblées sur les billes.



**Fig. M2-S7 : L'interaction entre le récepteur aux androgènes et les autres molécules de signalisation semble constitutive**

Les cellules RWPE-1-AR2-2 en entretien, ont été traitées 30 min par 25 µg/ml de flutamide. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps spécifique du récepteur aux androgènes (Upstate) et de Raf-1 (Santa Cruz). Les membranes ont été marquées avec les anticorps qui reconnaissent spécifiquement le récepteur aux androgènes, Raf-1, p85 et Src .

Ces expériences de co-immuno-précipitation complètent celles de la figure précédente. Les lysats de cellules RWPE-1-AR2-2 maintenues en entretien et traitées 30 min par le Flutamide, ont été immunoprécipités avec les anticorps correspondants (AR et Raf-1). AR co-précipite p85, Raf-1 et Src, et Raf-1 co-précipite AR, p85 et Src. L'inhibition du récepteur aux androgènes par le flutamide n'influence pas l'association entre ces diverses molécules de signalisation, suggérant une association constitutive entre le récepteur aux androgènes et les protéines de signalisation étudiées. Cependant ces expériences ont été réalisées sans le contrôle IgG permettant d'exclure l'éventuelle fixation des protéines ciblées sur les billes.



**Fig. M2-S8 : La kinase Src intervient dans la même voie que le récepteur aux androgènes pour moduler l'activité d'ERK1/2**

Les cellules RWPE-1 en entretien ont été traitées par 10  $\mu$ M de PP2 pendant les temps indiqués. Les membranes ont été marquées avec les anticorps qui reconnaissent spécifiquement les formes phosphorylées d'ERK1/2 (pERK1/2). Après déshybridation, les membranes ont été marquées par les anticorps spécifiques d'ERK 1 pour contrôle de charge.

Étant donné que la kinase Src s'associe au récepteur aux androgènes dans les cellules RWPE-1 (voir figures M2-S6-7), nous avons cherché à savoir si elle jouait un rôle dans la signalisation non génomique du récepteur aux androgènes. Nous avons observé qu'une inhibition de Src, dans les mêmes conditions que l'inhibition du RA par le flutamide (voir figure 2), réduit le niveau de phosphorylation d'ERK1/2. Ce résultat indique que la kinase Src est impliquée dans le même mécanisme que le récepteur aux androgènes pour moduler l'activité de la voie ERK1/2 en réponse à l'EGF.



---

## **4 DISCUSSION**

---

## 4.1 Bilan et discussion des résultats

Les objectifs de ma thèse étaient d'étudier l'existence de relations potentielles entre les voies de signalisation nécessaires au maintien de l'intégrité de l'épithélium prostatique. Le travail effectué au cours de mon doctorat m'a ainsi permis de mettre en évidence de nouvelles interactions entre des voies de signalisation essentielles à la survie et à la prolifération de la lignée cellulaire RWPE-1. Cette lignée a été utilisée car elle constitue un bon modèle de cellules progénitrices (T/A) de l'épithélium prostatique.

Les voies de signalisations impliquées dans ces interactions, sont d'une part, la voie de l'Interleukine-6, cytokine inflammatoire favorisant la survie des cellules épithéliales en cas de stress ; et d'autre part la voie des androgènes, hormones mâles nécessaires au développement et au fonctionnement de la prostate. Toutes deux convergent vers la voie ERK1/2 qui est indispensable à la prolifération de la lignée RWPE-1, et par extrapolation, à la couche basale de l'épithélium prostatique normal.

### 4.1.1 L'IL-6 active la voie ERK en induisant le clivage d'un pro-ligand de l'EGF-R

Dans les cellules RWPE-1, l'IL-6 induit une activation transitoire de la voie ERK1/2, qui s'accompagne d'une prolifération sub-optimale (voir figure M1-1). La voie ERK1/2 est en effet le principal chemin emprunté par les molécules de signalisation pour induire un signal prolifératif dans ces cellules. De manière générale, une activité soutenue d'ERK1/2 est corrélée avec une forte prolifération (Pouyssegur et al., 2002), ce que j'ai observé dans les cellules RWPE-1 stimulées par l'EGF. A l'inverse, une activation transitoire de la voie ERK1/2 induit un signal mitogénique plus faible, comme celui déclenché par l'IL-6 (voir figure M1-1) ou le VEGF (Clubbs and Bomser, 2007), dans les cellules RWPE-1. Ainsi l'intensité d'activation d'ERK1/2 influence le degré de prolifération.

L'IL-6 induit à la fois une activation persistante de STAT3, et une activation transitoire d'ERK1/2. Cela indique l'existence d'une régulation négative d'ERK1/2 en aval de la kinase JAK, ou bien la stimulation d'une voie alternative pour activer ERK1/2. Comme les récepteurs des cytokines transactivent le récepteur à l'EGF, notamment en induisant le clivage d'un ligand membranaire par les métallo-protéinases (Higashiyama et al., 2008), je me suis demandé en priorité si l'EGF-R était impliqué dans l'activation de la voie ERK1/2 par l'IL-6. Effectivement, l'activité kinase de l'EGF-R est nécessaire dans ce mécanisme de signalisation (voir figure M1-2). Ensuite l'utilisation d'un inhibiteur général des métallo-protéinases m'a permis de confirmer leur implication dans la transactivation de l'EGF-R par l'IL-6 (voir figure M1-4).

#### 4.1.1.1 Ligand

Le récepteur à l'EGF étant impliqué dans l'activation de la voie ERK1/2 en réponse à l'IL-6, je me suis intéressée aux ligands de l'EGF-R, et en particulier à l'amphiréguline, qui m'a paru être un bon candidat pour deux raisons : d'une part, ses transcrits sont les plus abondants parmi les ligands de l'EGF-R dans les cellules RWPE-1 (voir figure M1-S4) ; et d'autre part, elle induit une activation transitoire d'ERK1/2 (voir figure M1-S6A). En fait, la durée de phosphorylation d'ERK1/2 en réponse à l'amphiréguline dans les cellules RWPE-1 est intermédiaire entre celle de l'IL-6 (moins de 30 min) et celle de l'EGF (persistante) (voir figure M1-1).

Pour tester cette hypothèse, des tests ELISA ont été menés, grâce à une collaboration avec A. Hurbin (Institut Albert Bonniot - Inserm U823 – Grenoble) pour détecter la présence d'amphiréguline dans des cultures de cellules RWPE-1 stimulées par l'IL6. Ils n'ont pas permis de mettre en évidence une libération d'amphiréguline dans le milieu des cellules stimulées par l'IL-6. Cependant, ces expériences préliminaires n'ont pas été effectuées dans les meilleures conditions, puisque seuls des surnageants de cellules traitées 30 min par l'IL-6 ont été testés, or cette durée peut ne pas être suffisante pour observer une accumulation de ligand clivé dans l'environnement des cellules. De plus, des expériences basées sur l'utilisation d'un anticorps neutralisant spécifique de l'amphiréguline n'ont montré aucun effet de celui-ci sur le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 (voir figure M1-S6B).

Ces résultats ne laissent que deux interprétations possibles : soit l'amphiréguline n'est pas impliquée dans ce mécanisme, soit elle ne représente pas le seul pro-ligand de l'EGF-R à être clivé suite à une stimulation par l'IL-6.

#### 4.1.1.2 Métallo-protéinases

Pour identifier la ou les métallo-protéinases impliquées dans ce mécanisme de transactivation, je me suis intéressée aux deux principales métallo-protéinases jouant un rôle dans le clivage d'un pro-ligand membranaire de l'EGF-R : ADAM10 et ADAM17. Elles sont essentielles dans le développement, puisque l'inactivation de leur gène est létale au stade embryonnaire pour ADAM10 et au stade périnatal pour ADAM17. Les souris n'exprimant pas ADAM10 ont des défauts prononcés du système nerveux et du système cardiovasculaire (Hartmann et al., 2002). Celles qui n'expriment pas ADAM17 ont des problèmes de maturation et d'organisation de l'épithélium au niveau des systèmes digestif et respiratoire (Black et al., 1997; Peschon et al., 1998). Par ailleurs, ces métallo-protéinases ont leurs cibles spécifiques : ADAM10 clive préférentiellement le pro-HB-EGF (Higashiyama and Nanba, 2005), et ADAM17 clive les précurseurs de l'amphiréguline (Gschwind et al., 2003), du HB-EGF, du TGF- $\alpha$  et de la neuréguline (Zhang et al., 2006a)

Une approche par inhibiteur chimique m'a permis de montrer qu'ADAM17 joue un rôle essentiel dans la libération d'un ligand de l'EGF-R en réponse à l'IL-6 et qu'ADAM10 participe à ce mécanisme (voir figure M1-4). Cela suggère une action conjointe, voire coopérative de ces deux métalloprotéinases qui peut expliquer notamment le clivage de plusieurs pro-ligands.

L'hypothèse de départ supposait que l'IL-6 active une métalloprotéinase capable de libérer l'amphiréguline membranaire, qui active à son tour l'EGF-R, donc la voie ERK1/2 en aval. Les résultats obtenus indiquent que cette hypothèse n'est pas nécessairement fautive, mais le mécanisme mis en jeu en réponse à l'IL-6 semble être plus complexe en réalité.

Pour aller plus loin, il s'agira de préciser le rôle des ADAM dans ce mécanisme de signalisation. D'une part, inhiber leur expression par ARN interférence permettra de confirmer l'identité des ADAM impliquées. D'autre part l'étude de leur niveau d'activité en réponse à l'IL-6, à l'aide d'anticorps spécifiques de la forme active (Kasina et al., 2009), ou de sondes fluorescentes (Moss and Rasmussen, 2007) permettra de connaître leur cinétique d'activation en réponse à l'IL-6. En effet, l'aspect transitoire de l'activation d'ERK1/2 pourrait être dû à une libération transitoire du pro-ligand, donc à une activation limitée dans le temps des métalloprotéinases.

Une explication alternative à cette cinétique d'activation d'ERK1/2, pourrait impliquer la nature du pro-ligand libéré dans le micro-environnement par les métalloprotéinases. En effet, certains ligands de l'EGF-R induisent naturellement une activation transitoire des voies en aval, à cause de leur cinétique d'internalisation (voir paragraphe 2.2.2.2.5. Recyclage ou dégradation des récepteurs, page 57). Or les résultats décrits dans le premier manuscrit (voir figure M1-3) montrent qu'en réponse à l'EGF, le niveau de l'EGF-R dans les cellules diminue de manière significative après 4h, alors qu'en réponse à l'IL-6, la stabilité de l'EGF-R n'est pas affectée. A la lumière de ces données, une nouvelle hypothèse concernant le pro-ligand impliqué dans la réponse à l'IL-6 me semble intéressante. Le TGF- $\alpha$  est un pro-ligand de l'EGF-R, clivé préférentiellement par ADAM17, et dans une moindre mesure par ADAM10 (Le Gall et al., 2009; Myers et al., 2009). De plus, dans des kératinocytes humains non transformés (lignée NHEK), le TGF- $\alpha$  induit une activation transitoire d'ERK1/2 qui diminue après 10 minutes de stimulation (Draper et al., 2003). Cette cinétique rappelle celle induite par l'IL-6 dans les cellules RWPE-1. Par ailleurs, l'EGF-R stimulé par le TGF- $\alpha$  est rapidement recyclé à la membrane plasmique (Roepstorff et al., 2009), il reste donc stable dans les cellules. Cela rappelle ce que j'observe dans les cellules RWPE-1 stimulées par l'IL-6. Ces différents indices m'incitent à penser que le TGF- $\alpha$  pourrait être un bon candidat pour l'identification du pro-ligand libéré en réponse à l'IL-6.

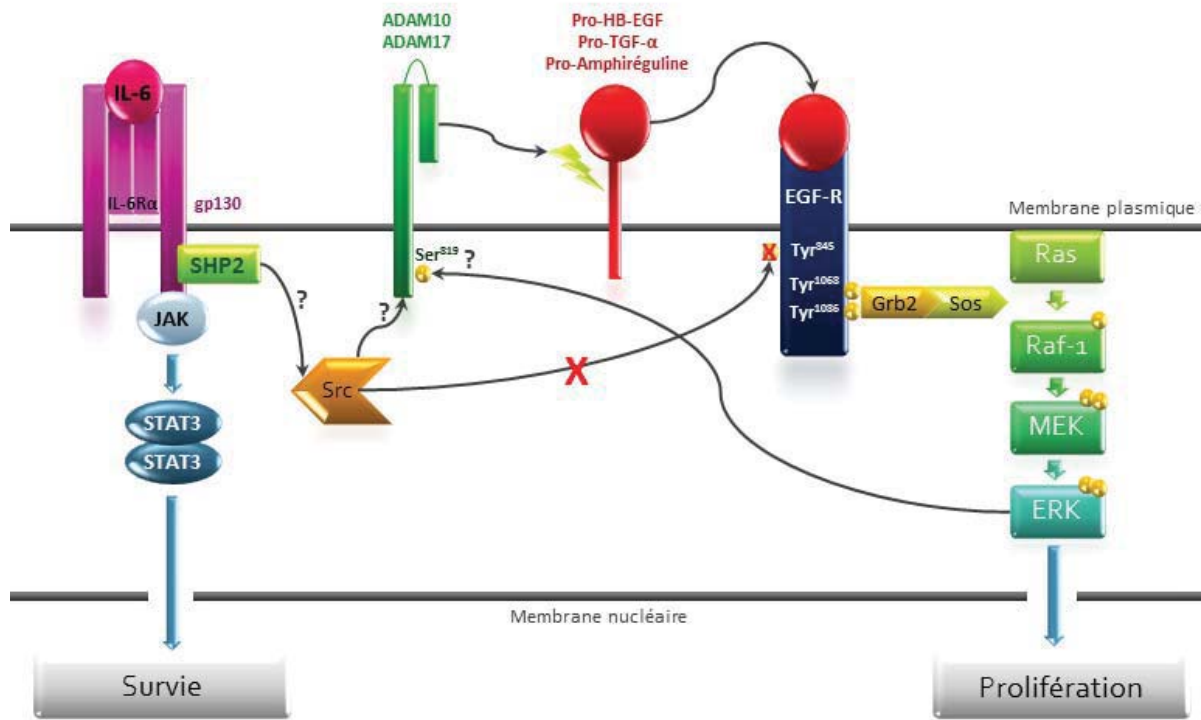


Figure 24 : Schéma récapitulatif du mécanisme de transactivation de l'EGF-R par l'IL-6.

L'IL-6 active directement la voie JAK/STAT, ce qui favorise la survie cellulaire. L'IL-6 active aussi la voie ERK1/2, essentielle à la prolifération cellulaire. Ce mécanisme implique la kinase Src. Elle ne phosphoryle pas directement l'EGF-R, mais pourrait agir sur la régulation de l'activité des métalloprotéinases ADAM10 et ADAM17, en phosphorylant leur domaine cytoplasmique. Le mode d'activation de Src en réponse à l'IL-6 n'est pas connu, mais il pourrait faire intervenir la phosphatase SHP2 activée par la fixation de l'IL-6 sur son récepteur. ADAM10 et/ou ADAM17 permettent le clivage d'un ou plusieurs pro-ligands du récepteur à l'EGF. En se liant à l'EGF-R, ces ligands activent la voie ERK1/2 d'une manière transitoire. Cette cinétique suggère l'implication d'un ligand de l'EGF-R induisant une activation courte d'ERK1/2, ou l'existence de mécanismes de rétrocontrôles négatifs. Les kinases ERK1/2 sont en effet capables de phosphoryler les ADAM sur le résidu Ser<sup>819</sup>, mais le rôle de cette phosphorylation n'est pas encore connu.

#### 4.1.1.3 Activation des protéines ADAM par l'IL-6

Il reste à déterminer ce qui fait le lien entre l'IL-6 et l'activation des ADAM. A ce jour, il existe peu de données disponibles quant à l'activation de ces métallo-protéinases par la signalisation intracellulaire (Kessenbrock et al., 2010).

La kinase Src a déjà été impliquée dans le même type de transactivation de l'EGF-R par les ADAM, mais en réponse aux récepteurs couplés aux protéines G (Kasina et al., 2009). Néanmoins, une approche par inhibiteur chimique (PP2) m'a permis de montrer que Src joue un rôle dans l'activation d'ERK1/2 en réponse à l'IL-6 (voir figure M1-3), donc dans la transactivation de l'EGF-R. Comme j'ai observé que Src ne phosphoryle pas directement le récepteur à l'EGF sur son résidu Tyr<sup>845</sup>, elle doit jouer un rôle plus en amont. Or, les ADAM sont dotées d'un domaine cytoplasmique qui comporte divers sites de phosphorylation, sur des résidus Sérine et Thréonine, mais aussi un motif PxxP, point d'ancrage des protéines ayant un domaine SH3, comme par exemple les kinases de la famille Src (Kessenbrock et al., 2010; Seals and Courtneidge, 2003).

Parmi les membres de la famille Src, il faut noter que Lck interagit avec le domaine cytoplasmique d'ADAM10 (Poghosyan et al., 2002). Or l'inhibiteur PP2 de Src est aussi efficace sur Lck (Hanke et al., 1996). On pourrait donc imaginer qu'ADAM10 soit activée par une kinase de la famille Src et pourrait, à l'instar des MMP (Kessenbrock et al., 2010), cliver ADAM17 pour la rendre active. Cela expliquerait l'effet coopératif d'ADAM10 et ADAM17.

Si une kinase de la famille Src est impliquée dans ce mécanisme, elle doit être activée en réponse à l'IL-6. Or, La phosphatase SHP2, activée par la fixation de l'IL-6 sur son récepteur, joue un rôle essentiel dans l'activation de Src en levant l'inhibition exercée par la kinase Csk (voir Figure 17, page 54) (Ren et al., 2004). Ainsi, Src pourrait être activée suite à la stimulation par l'IL-6 et agir sur les ADAM via leur domaine cytoplasmique dans le but de les activer, même si ce mécanisme n'est pas encore bien défini.

Enfin, il faut noter que les kinases ERK1/2 activées en réponse aux facteurs de croissance EGF et FGF, phosphorylent ADAM17 sur le résidu Ser<sup>819</sup> (Fan et al., 2003). La fonction de cette phosphorylation n'est pas encore connue, mais il pourrait s'agir d'un rétrocontrôle négatif, expliquant la cinétique d'activation courte de la voie ERK1/2 suite à la transactivation de l'EGF-R.

Les principales hypothèses issues de ce travail expérimental sont synthétisées dans la Figure 24.

### 4.1.2 L'interaction RA-Raf-1 et ses conséquences sur la voie ERK

L'ensemble des résultats présentés dans le second manuscrit mettent en évidence deux notions originales dans un contexte de cellules épithéliales normales comme la lignée RWPE-1.

- ✓ Le récepteur aux androgènes induit une signalisation non-génomique en absence de son ligand. Cette signalisation passe par l'intermédiaire de la voie ERK1/2 et favorise la prolifération des cellules RWPE-1.
- ✓ Il existe une interaction moléculaire entre le récepteur aux androgènes et la kinase Raf-1, activatrice de la voie ERK1/2.

#### 4.1.2.1 Caractérisation de l'interaction

Dans un premier temps, j'ai pu observer l'interaction entre le récepteur aux androgènes et la kinase Raf-1 par co-immunoprécipitation. J'ai ensuite mené des expériences de capture par GST afin de confirmer cette interaction, et d'identifier les domaines protéiques impliqués dans l'association. J'ai ainsi pu montrer que chacun des trois domaines des deux protéines sont impliqués dans cette interaction (voir figure M2-3). Ces résultats suggèrent fortement l'existence de plusieurs modes d'association, et il peut exister à la fois des interactions directes et indirectes entre les deux molécules. Dans la littérature, le domaine amino-terminal du récepteur aux androgènes représente le site d'association préférentiel des molécules de signalisation (Baron et al., 2004; Migliaccio et al., 2000). Peut-être les autres domaines sont-ils impliqués dans des interactions indirectes ?

Afin de déterminer si l'association entre le récepteur aux androgènes et Raf-1 est directe ou non, il faudrait mener une approche de transcription-traduction *in vitro*. Cette technique permet de synthétiser les deux molécules afin d'observer si elles sont capables de s'associer en absence de toute autre protéine cellulaire. Ensuite, il sera nécessaire d'identifier précisément les domaines protéiques impliqués dans cette interaction. Pour cela, il serait intéressant de faire exprimer des fragments de chacune des protéines dans les cellules, pour maintenir les modifications post-traductionnelles éventuelles, avant de mener des expériences de co-immunoprécipitation, afin de déterminer quels sont les fragments nécessaires à cette interaction.

Dans l'hypothèse d'une action indirecte, il s'agira d'identifier la ou les molécules intermédiaires. En ce sens, j'ai déjà pu observer une co-immunoprécipitation du récepteur aux androgènes et de Raf-1 avec la protéine chaperonne Hsp70 (voir figure M2-S3). L'existence d'une interaction entre la kinase Raf-1 et Hsp70 est admise (Mayer and Bukau, 2005). Par ailleurs, l'association entre Hsp70 et le récepteur aux androgènes peut faire intervenir la co-chaperonne BAG1. En effet, cette molécule pro-



apoptotique interagit non seulement avec Hsp70 (Song et al., 2001), mais aussi avec le motif Tau-5 du récepteur aux androgènes (Shatkina et al., 2003).

Il faut noter que Raf-1 aussi se lie à BAG1. Les domaines de fixation de Hsp70 et de Raf-1 sur BAG1 sont chevauchants, les deux protéines entrent donc en compétition pour s'associer à BAG1. La kinase Raf-1 semble être préférentiellement associée à BAG1. Mais en condition de stress, le taux d'Hsp70 dans la cellule augmente, et la balance penche alors vers l'interaction BAG1-Hsp70 (Song et al., 2001), BAG1 favorise alors l'ubiquitination, donc la dégradation de Raf-1 (Demand et al., 2001), et régule ainsi négativement l'activité kinase de Raf-1.

Par ailleurs, les données expérimentales obtenues quant à la régulation de l'interaction entre le récepteur aux androgènes et la kinase Raf-1 sont encore préliminaires. En effet, les approches de co-immunoprécipitations à partir de lysats de cellules cultivées dans des conditions différentes (absence de tout facteur, stimulation ou non par l'EGF, présence ou non de Flutamide), ne montrent aucun changement du taux d'association (voir figure M2-S4). Ces résultats vont dans le sens d'une interaction constitutive entre le RA et Raf-1.

Etant donné l'importance de ces deux molécules dans la signalisation cellulaire, il semble évident qu'il existe des mécanismes de régulation. Une interaction constitutive n'est pas synonyme d'absence de régulation. L'état d'activation de la kinase Raf-1 associée au récepteur aux androgènes peut être un bon indicateur de ces contrôles. Un test kinase permettrait de connaître le niveau de l'activité kinase de Raf-1 en fonction des conditions de culture. On peut aussi se demander si les trois molécules (RA, Raf-1 et Hsp70) sont présentes dans la cellule par paires, ou si elles peuvent se trouver associées ensemble avec Bag1 (Frebel and Wiese, 2006; Mayer and Bukau, 2005).

#### **4.1.2.2 Rôle de l'interaction RA/Raf-1**

Comprendre quel est le rôle de cette interaction dans la signalisation de la voie ERK1/2, et dans la prolifération, est une question essentielle.

Les inhibiteurs non-stéroïdiens du récepteur aux androgènes (Flutamide et Bicalutamide) réduisent à la fois la prolifération et le niveau d'activation d'ERK1/2 dans les cellules RWPE-1 (voir figure M2-2). La rapidité de l'effet observé sur ERK1/2 est caractéristique d'une signalisation non-génomique du récepteur aux androgènes, puisque le délai est trop court pour que la machinerie transcriptionnelle entre en action (Kousteni et al., 2001). De plus, la rapidité de cet effet suppose l'action de mécanismes actifs de déphosphorylation d'ERK1/2, probablement par l'activation de phosphatases spécifiques (Farooq and Zhou, 2004)

Les inhibiteurs non-stéroïdiens réduisent la prolifération des cellules RWPE-1, même en absence d'androgènes (voir figure M2-1). Cela montre que cette signalisation non-génomique du récepteur aux androgènes est indépendante de son ligand. Ce qui n'est pas conforme au mode de transactivation du RA dans les cellules tumorales, qui a lieu en présence de ligand, même en infime quantité (voir paragraphe 2.2.1.2.4. Signalisation non-génomique, page 41).

Il faut noter que le Cyproterone Acetate, qui est un anti-androgène stéroïdien, n'a pas le même type d'effet que les inhibiteurs non-stéroïdiens sur la phosphorylation d'ERK1/2 (voir figure M2-2). Cette différence est due à la disparité de leur mode d'action. Les anti-androgènes testés induisent tous un changement de conformation au niveau de la poche de fixation du ligand du récepteur aux androgènes (Gao et al., 2005). Mais les inhibiteurs non-stéroïdiens (Flutamide et Bicalutamide) entraînent une liaison réversible du RA à la matrice nucléaire, tandis que l'inhibiteur stéroïdien (CPA) induit une association irréversible du RA à la membrane plasmique (Whitaker et al., 2004). Ces données suggèrent que la localisation du récepteur aux androgènes est importante pour la fonction de l'interaction entre le RA et Raf-1

Afin de comprendre quel est le rôle de l'interaction entre le récepteur aux androgènes et la kinase Raf-1 dans les cellules RWPE-1, il est nécessaire de mieux connaître les caractéristiques de cette association. En effet, le seul moyen de déterminer l'importance de l'interaction RA-Raf-1 dans la signalisation et la prolifération des cellules RWPE-1 est de l'empêcher. Or l'utilisation d'une approche par ARN interférence ciblant le récepteur aux androgènes est létale pour les cellules RWPE-1 (Liao et al., 2005). De plus, il est impossible de cibler Raf-1 sans affecter la voie ERK1/2. Finalement, le meilleur moyen d'empêcher cette interaction est de générer un dominant négatif pour l'association, ou un peptide inhibiteur (Auricchio et al., 2008), conçu selon les motifs identifiés pour participer à la liaison du récepteur aux androgènes à la kinase Raf-1.

#### **4.1.2.3 Plateforme de signalisation et localisation membranaire**

J'ai pu montrer que le récepteur aux androgènes interagit avec la kinase Src ainsi que la sous-unité p85 de la PI3K dans les cellules RWPE-1 (voir figure M2-S6-7), comme cela avait déjà été montré dans un contexte de cellules tumorales (Baron et al., 2004; Migliaccio et al., 2000).

De plus, une inhibition de l'activité kinase de Src par le PP2 a le même effet que le Flutamide et le Bicalutamide, à savoir une diminution de la phosphorylation d'ERK1/2 (voir figure M2-S8). Cela suggère que le récepteur aux androgènes et Src interviennent dans la même voie pour favoriser l'activation d'ERK1/2 par la kinase Raf-1.

Hormis cet indice, rien ne permet d'affirmer que ces molécules interagissent ensemble dans le même complexe. Le récepteur aux androgènes serait pourtant un bon candidat pour jouer le rôle de plateforme de signalisation, étant donné qu'il centralise les principales voies empruntées dans les cellules épithéliales.

Dans ce contexte, l'hypothèse de la signalisation membranaire du récepteur aux androgènes est attrayante. Dans divers modèles cellulaires, de nombreux indices suggèrent l'existence d'une signalisation péri-membranaire du RA. En réponse à la DHT, le récepteur aux androgènes membranaire réduit la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt à l'inverse de sa forme cytoplasmique dans les cellules gliales C6 (Gatson et al., 2006). Le récepteur aux androgènes interagit aussi avec Akt1 au niveau des radeaux lipidiques des cellules LNCaP (Cinar et al., 2007). Par ailleurs, le RA s'associe avec le récepteur à l'EGF à la membrane plasmique des cellules PC-3-AR (Bonaccorsi et al., 2008). De plus, la kinase Raf-1 doit être proche de la membrane pour y être activée par la GTPase Ras (Wartmann and Davis, 1994). Le Cyproterone Acetate induit la localisation du récepteur aux androgènes à la membrane plasmique (Whitaker et al., 2004), et n'inhibe pas l'activation d'ERK1/2. Au contraire, l'inhibition de la voie ERK1/2 par le Flutamide et le Bicalutamide serait due à la relocalisation du RA au noyau. L'ensemble de ces données indique un lien entre la localisation membranaire du récepteur aux androgènes et sa capacité à moduler la voie ERK1/2.

### 4.1.3 Contexte cellulaire/tissulaire

#### 4.1.3.1 IL-6, inflammation et carcinogénèse

L'IL-6 est une cytokine inflammatoire sécrétée par les cellules du système immunitaire ou les cellules du stroma dans la prostate. Elle induit un signal de survie et maintient ainsi l'intégrité de l'épithélium, lorsque la prostate est en souffrance. En plus de son signal de survie, l'IL-6 favorise la prolifération en induisant la transactivation du récepteur à l'EGF, essentiel au développement de la prostate et à la prolifération des cellules progénitrices T/A. Ainsi ce nouveau mode d'action de l'IL-6 pourrait participer au maintien de l'intégrité de l'épithélium prostatique en condition inflammatoire.

Mais ce rôle de l'IL-6 dans la prolifération des cellules épithéliales prend tout son sens dans le cadre de l'initiation du cancer de la prostate. En effet, l'inflammation qui est déjà associée à l'initiation tumorale à cause des radicaux oxygénés libérés par les cellules immunitaires, pourrait aussi être impliquée dans ce processus en stimulant la prolifération des cellules épithéliales par l'intermédiaire de l'EGF-R. En effet les acteurs de ce nouveau mécanisme : l'IL-6, l'IL-6R $\alpha$ , l'EGF-R et ses ligands sont surexprimés dans les cellules d'adénocarcinome prostatique (Siegsmond et al., 1994; Topping et al., 2000). On peut donc se demander si la surexpression de toutes ces molécules n'est pas susceptible de créer de nouvelles interactions entre les voies de signalisation. En effet, une interaction physique entre le co-récepteur de l'IL-6 gp130 et les récepteurs ERBB2 et ERBB3 de la famille de l'EGF-R a déjà été décrite dans les lignées issues de carcinomes mammaires (Grant et al., 2002). Cette interaction observée par co-immunoprécipitation dans le contexte du récepteur à l'Oncostatine M (cytokine de la famille du récepteur à l'IL-6), favorise une activation d'ERK1/2 aussi bien en réponse à l'EGF qu'à l'OSM (voir paragraphe 2.4.3. Relations entre le récepteur à l'EGF et les autres voies, page 85).

Finalement, l'ensemble de ces données suggère que la transactivation de l'EGF-R par l'IL-6, pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la transformation tumorale des cellules épithéliales de prostate.

#### 4.1.3.2 Androgènes, signalisation non-génomique et échappement hormonal

Les cellules RWPE-1 expriment le récepteur aux androgènes à des niveaux indétectables. Il est néanmoins présent et nécessaire à leur survie, car une inhibition de son expression par ARN interférence induit leur apoptose en 7 jours (Liao et al., 2005). De même, en conditions physiologiques, le récepteur aux androgènes est très faiblement exprimé par les cellules T/A de l'épithélium prostatique (Heer 2007). Il joue cependant un rôle essentiel dans le maintien de cet épithélium.

Le récepteur aux androgènes est capable de deux modes d'action distincts. Le mode d'action génomique lui permet d'induire l'expression de gènes cibles impliquées dans la différenciation de la fonction sécrétrice ou la régulation du cycle cellulaire (Dehm and Tindall, 2006; Kaarbo et al., 2007; Lamont and Tindall, 2010). Le mode d'action non-génomique du récepteur aux androgènes implique son association avec des molécules de signalisation comme la kinase Src, la PI3K ou Raf-1, qui favorisent la survie et la prolifération des cellules épithéliales (Baron et al., 2004; Migliaccio et al., 2000).

Le rôle précis de l'interaction entre le récepteur aux androgènes et la kinase Raf-1 reste à déterminer. Mais elle implique deux molécules essentielles dans deux processus cruciaux pour le développement de l'épithélium de prostate : la différenciation et la prolifération. L'association de ces deux protéines pourrait constituer un censeur déterminant vers lequel de ces deux processus la cellule doit s'engager. De la même manière, le récepteur aux androgènes et le récepteur à l'EGF interagissent fonctionnellement dans les cellules et contrôlent respectivement la différenciation et la prolifération dans les cellules épithéliales de canal déférent (VDEC) murines (Leotoing et al., 2007).

Dans le contexte du cancer de la prostate, le récepteur aux androgènes stimule la prolifération cellulaire. De plus, son interaction avec les molécules de signalisation comme Src, la PI3K et Raf-1 ne peut que favoriser la survie et la prolifération des cellules tumorales. Peut-être que l'absence d'androgènes dans l'environnement à la suite de traitements hormonaux rend le récepteur aux androgènes plus disponible pour la signalisation non génomique ? Cela soulignerait l'importance de cette signalisation non-canonique dans l'échappement des tumeurs vers l'androgéno-indépendance. Reste à identifier les contrôles qui régissent cette signalisation non-génomique du récepteur aux androgènes et évitent une prolifération excessive des cellules normales.

## 4.2 Conclusion

Finalement, ces travaux indiquent que dans les cellules non transformées, les voies de signalisation sont déjà fortement connectées. Cela suggère que les interactions entre cascades de signalisation observées dans les cellules tumorales pré-existent dans les cellules normales, et sont sans doute fortement régulées dans ces dernières. Il serait donc intéressant de connaître la nature moléculaire de ces connexions dans les cellules normales, pour comprendre comment elles échappent à tout contrôle dans les cellules tumorales.

J'ai pu mettre en évidence deux mécanismes distincts dans la même lignée cellulaire, mais en réponse à deux stimuli différents. Ils aboutissent tous deux à l'activation de la voie ERK1/2, essentielle à la prolifération des cellules RWPE-1.

- ✓ En réponse à l'IL-6, une métallo-protéinase est activée pour cliver un pro-ligand du récepteur à l'EGF, ce qui stimule la voie ERK1/2 selon son mode d'activation canonique.
- ✓ En présence d'EGF, la voie ERK1/2 est activée normalement, mais elle est régulée négativement par une inhibition du récepteur aux androgènes.

Ces deux mécanismes moléculaires impliquent la kinase Src. Cette dernière semble en effet jouer un rôle dans l'activation d'ADAM10 et ADAM17 en réponse à l'IL-6. Elle favorise ainsi l'activation de l'EGF-R par le clivage d'un de ses pro-ligands. Src participe donc à la prolifération induite par l'IL-6. De plus, Src, au même titre que le récepteur aux androgènes joue un rôle dans la signalisation de la voie ERK1/2 au sein d'un complexe de signalisation non-génomique présent autour du RA. Finalement, Src est impliquée dans deux systèmes d'interaction entre voies de signalisation dans un même modèle cellulaire. Cela met en avant les différentes fonctions de Src dans la signalisation cellulaire, qui aboutissent à la prolifération.

Ces deux mécanismes impliquent donc des acteurs moléculaires communs, comme la voie ERK ou la kinase Src, et ont été observés dans la même population cellulaire. Ces modes de signalisation peuvent-ils co-exister dans une même cellule, afin d'augmenter son potentiel prolifératif, et ainsi favoriser le processus de transformation ? Sont-ils spécifiques d'une catégorie de cellule, ou d'un contexte environnemental donné ? La question reste ouverte, puisque même s'ils ont été observés dans une même lignée cellulaire, elle n'en est pas moins très hétérogène (Litvinov et al., 2003).

---

## **5 BIBLIOGRAPHIE**

---



- Abbott, B.D., T.M. Lin, N.T. Rasmussen, R.M. Albrecht, J.E. Schmid, and R.E. Peterson. 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.* 76:427-436.
- Abrahamsson, P.A. 1996. Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl.* 6:3-8.
- Acevedo, V.D., R.D. Gangula, K.W. Freeman, R. Li, Y. Zhang, F. Wang, G.E. Ayala, L.E. Peterson, M. Ittmann, and D.M. Spencer. 2007. Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell.* 12:559-571.
- Adler, H.L., M.A. McCurdy, M.W. Kattan, T.L. Timme, P.T. Scardino, and T.C. Thompson. 1999. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J Urol.* 161:182-187.
- Akhurst, R.J., and R. Derynck. 2001. TGF- $\beta$  signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11:S44-51.
- Akimoto, S., A. Okumura, and H. Fuse. 1998. Relationship between serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  and bone turnover markers in prostate cancer patients. *Endocr J.* 45:183-189.
- Andl, C.D., T. Mizushima, K. Oyama, M. Bowser, H. Nakagawa, and A.K. Rustgi. 2004. EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287:G1227-1237.
- Auricchio, F., A. Migliaccio, and G. Castoria. 2008. Sex-steroid hormones and EGF signalling in breast and prostate cancer cells: targeting the association of Src with steroid receptors. *Steroids.* 73:880-884.
- Banham, A.H., J. Boddy, R. Launchbury, C. Han, H. Turley, P.R. Malone, A.L. Harris, and S.B. Fox. 2007. Expression of the forkhead transcription factor FOXO1 is associated both with hypoxia inducible factors (HIFs) and the androgen receptor in prostate cancer but is not directly regulated by androgens or hypoxia. *Prostate.* 67:1091-1098.
- Baron, S., M. Manin, C. Beaudoin, L. Leotoing, Y. Communal, G. Veyssiere, and L. Morel. 2004. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem.* 279:14579-14586.
- Bartlett, J.M., D. Brawley, K. Grigor, A.F. Munro, B. Dunne, and J. Edwards. 2005. Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer. *J Pathol.* 205:522-529.
- Baserga, R., F. Peruzzi, and K. Reiss. 2003. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer.* 107:873-877.
- Batzer, A.G., D. Rotin, J.M. Urena, E.Y. Skolnik, and J. Schlessinger. 1994. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 14:5192-5201.
- Bazan, J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6934-6938.
- Becker, S., B. Groner, and C.W. Muller. 1998. Three-dimensional structure of the Stat3 $\beta$  homodimer bound to DNA. *Nature.* 394:145-151.
- Beckman, J.S., and W.H. Koppenol. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271:C1424-1437.
- Berli, R.R., and N.E. Hynes. 1996. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem.* 271:6071-6076.
- Bello-DeOcampo, D., H.K. Kleinman, and M.M. Webber. 2001. The role of  $\alpha$ 6  $\beta$ 1 integrin and EGF in normal and malignant acinar morphogenesis of human prostatic epithelial cells. *Mutat Res.* 480-481:209-217.
- Bello, D., M.M. Webber, H.K. Kleinman, D.D. Wartinger, and J.S. Rhim. 1997. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis.* 18:1215-1223.

- Bennett, N.C., R.A. Gardiner, J.D. Hooper, D.W. Johnson, and G.C. Gobe. 2010. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:813-827.
- Berger, R., P.G. Febbo, P.K. Majumder, J.J. Zhao, S. Mukherjee, S. Signoretti, K.T. Campbell, W.R. Sellers, T.M. Roberts, M. Loda, T.R. Golub, and W.C. Hahn. 2004. Androgen-induced differentiation and tumorigenicity of human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 64:8867-8875.
- Berger, R., D.I. Lin, M. Nieto, E. Sicinska, L.A. Garraway, H. Adams, S. Signoretti, W.C. Hahn, and M. Loda. 2006. Androgen-dependent regulation of Her-2/neu in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 66:5723-5728.
- Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3:401-410.
- Bernard, D., A. Pourtier-Manzanedo, J. Gil, and D.H. Beach. 2003. Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest.* 112:1724-1731.
- Berry, P.A., N.J. Maitland, and A.T. Collins. 2008. Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 288:30-37.
- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature.* 385:729-733.
- Blasi, F., and P. Carmeliet. 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:932-943.
- Blok, L.J., P.E. de Ruiter, and A.O. Brinkmann. 1998. Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry.* 37:3850-3857.
- Blume-Jensen, P., and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 411:355-365.
- Boddy, J.L., S.B. Fox, C. Han, L. Campo, H. Turley, S. Kanga, P.R. Malone, and A.L. Harris. 2005. The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 11:7658-7663.
- Bonaccorsi, L., V. Carloni, M. Muratori, L. Formigli, S. Zecchi, G. Forti, and E. Baldi. 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., S. Marchiani, M. Muratori, G. Forti, and E. Baldi. 2004b. Gefitinib ('IRESSA', ZD1839) inhibits EGF-induced invasion in prostate cancer cells by suppressing PI3 K/AKT activation. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130:604-614.
- Bonaccorsi, L., M. Muratori, V. Carloni, S. Marchiani, L. Formigli, G. Forti, and E. Baldi. 2004c. The androgen receptor associates with the epidermal growth factor receptor in androgen-sensitive prostate cancer cells. *Steroids.* 69:549-552.
- Bonaccorsi, L., D. Nosi, F. Quercioli, L. Formigli, S. Zecchi, M. Maggi, G. Forti, and E. Baldi. 2008. Prostate cancer: a model of integration of genomic and non-genomic effects of the androgen receptor in cell lines model. *Steroids.* 73:1030-1037.
- Bonkhoff, H. 1998. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Suppl.* 8:18-22.
- Bonkhoff, H., T. Fixemer, and K. Remberger. 1998. Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate.* 34:251-258.
- Bonkhoff, H., and K. Remberger. 1996. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate.* 28:98-106.
- Bonkhoff, H., U. Stein, and K. Remberger. 1994a. Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum Pathol.* 25:42-46.

- Bonkhoff, H., U. Stein, and K. Remberger. 1994b. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate*. 24:114-118.
- Bostwick, D.G., J. Qian, and N.J. Maihle. 2004. Amphiregulin expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 93 cases. *Prostate*. 58:164-168.
- Boudon, C., G. Rodier, E. Lechevallier, N. Mottet, B. Barenton, and C. Sultan. 1996. Secretion of insulin-like growth factors and their binding proteins by human normal and hyperplastic prostatic cells in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:612-617.
- Bruckheimer, E.M., and N. Kyprianou. 2001. Dihydrotestosterone enhances transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hormone-sensitive prostate cancer cells. *Endocrinology*. 142:2419-2426.
- Burfeind, P., C.L. Chernicky, F. Rininsland, and J. Ilan. 1996. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:7263-7268.
- Burgess, A.W., H.S. Cho, C. Eigenbrot, K.M. Ferguson, T.P. Garrett, D.J. Leahy, M.A. Lemmon, M.X. Sliwkowski, C.W. Ward, and S. Yokoyama. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 12:541-552.
- Burova, E., K. Vassilenko, V. Dorosh, I. Gonchar, and N. Nikolsky. 2007. Interferon gamma-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett*. 581:1475-1480.
- Cai, C., D.C. Portnoy, H. Wang, X. Jiang, S. Chen, and S.P. Balk. 2009. Androgen receptor expression in prostate cancer cells is suppressed by activation of epidermal growth factor receptor and ErbB2. *Cancer Res*. 69:5202-5209.
- Callewaert, L., N. Van Tilborgh, and F. Claessens. 2006. Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. *Cancer Res*. 66:543-553.
- Cao, X., J. Qin, Y. Xie, O. Khan, F. Dowd, M. Scofield, M.F. Lin, and Y. Tu. 2006. Regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) inhibits androgen-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene*. 25:3719-3734.
- Cardozo, C.P., C. Michaud, M.C. Ost, A.E. Fliss, E. Yang, C. Patterson, S.J. Hall, and A.J. Caplan. 2003. C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation. *Arch Biochem Biophys*. 410:134-140.
- Carpenter, C.L., K.R. Auger, M. Chanudhuri, M. Yoakim, B. Schaffhausen, S. Shoelson, and L.C. Cantley. 1993. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem*. 268:9478-9483.
- Carpenter, G., L. King, Jr., and S. Cohen. 1978. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*. 276:409-410.
- Carpenter, G., K.J. Lembach, M.M. Morrison, and S. Cohen. 1975. Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem*. 250:4297-4304.
- Carraway, K.L., 3rd, M.X. Sliwkowski, R. Akita, J.V. Platko, P.M. Guy, A. Nuijens, A.J. Diamonti, R.L. Vandlen, L.C. Cantley, and R.A. Cerione. 1994. The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem*. 269:14303-14306.
- Cato, A.C.B., D. Henderson, and H. Ponta. 1987. THE HORMONE RESPONSE ELEMENT OF THE MOUSE MAMMARY-TUMOR VIRUS-DNA MEDIATES THE PROGESTIN AND ANDROGEN INDUCTION OF TRANSCRIPTION IN THE PROVIRAL LONG TERMINAL REPEAT REGION. *Embo J*. 6:363-368.
- Chang, W.Y., L. Birch, C. Woodham, L.I. Gold, and G.S. Prins. 1999. Neonatal estrogen exposure alters the transforming growth factor-beta signaling system in the developing rat prostate and blocks the transient p21(cip1/waf1) expression associated with epithelial differentiation. *Endocrinology*. 140:2801-2813.
- Chantry, A. 1995. The kinase domain and membrane localization determine intracellular interactions between epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*. 270:3068-3073.
- Chemes, H.E. 2001. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int. J. Androl*. 24:2-7.
- Chen, J., S. De, J. Brainard, and T.V. Byzova. 2004. Metastatic properties of prostate cancer cells are controlled by VEGF. *Cell Commun Adhes*. 11:1-11.

- Chen, X., U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, J.E. Darnell, Jr., and J. Kuriyan. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*. 93:827-839.
- Cheng, L., S. Zhang, C.J. Sweeney, C. Kao, T.A. Gardner, and J.N. Eble. 2004. Androgen withdrawal inhibits tumor growth and is associated with decrease in angiogenesis and VEGF expression in androgen-independent CWR22Rv1 human prostate cancer model. *Anticancer Res*. 24:2135-2140.
- Cheung, C.P., S. Yu, K.B. Wong, L.W. Chan, F.M. Lai, X. Wang, M. Suetsugi, S. Chen, and F.L. Chan. 2005. Expression and functional study of estrogen receptor-related receptors in human prostatic cells and tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:1830-1844.
- Chipuk, J.E., S.C. Cornelius, N.J. Pultz, J.S. Jorgensen, M.J. Bonham, S.J. Kim, and D. Danielpour. 2002. The androgen receptor represses transforming growth factor-beta signaling through interaction with Smad3. *J Biol Chem*. 277:1240-1248.
- Cho, H.S., and D.J. Leahy. 2002. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science*. 297:1330-1333.
- Chow, D., X. He, A.L. Snow, S. Rose-John, and K.C. Garcia. 2001. Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science*. 291:2150-2155.
- Christiaens, V., C.L. Bevan, L. Callewaert, A. Haelens, G. Verrijdt, W. Rombauts, and F. Claessens. 2002. Characterization of the two coactivator-interacting surfaces of the androgen receptor and their relative role in transcriptional control. *J. Biol. Chem*. 277:49230-49237.
- Chung, C.D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta, and K. Shuai. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. 278:1803-1805.
- Chung, L.W., A. Baseman, V. Assikis, and H.E. Zhou. 2005. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol*. 173:10-20.
- Chung, L.W., C.L. Hsieh, A. Law, S.Y. Sung, T.A. Gardner, M. Egawa, S. Matsubara, and H.E. Zhou. 2003. New targets for therapy in prostate cancer: modulation of stromal-epithelial interactions. *Urology*. 62:44-54.
- Chung, T.D., J.J. Yu, T.A. Kong, M.T. Spiotto, and J.M. Lin. 2000. Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 42:1-7.
- Chung, T.D., J.J. Yu, M.T. Spiotto, M. Bartkowski, and J.W. Simons. 1999. Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate*. 38:199-207.
- Cinar, B., N.K. Mukhopadhyay, G. Meng, and M.R. Freeman. 2007. Phosphoinositide 3-kinase-independent non-genomic signals transit from the androgen receptor to Akt1 in membrane raft microdomains. *J Biol Chem*. 282:29584-29593.
- Claessens, F., S. Denayer, N. Van Tilborgh, S. Kerckhofs, C. Helsen, and A. Haelens. 2008. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal*. 6:e008.
- Clubbs, E.A., and J.A. Bomser. 2007. Glycetin activates extracellular signal-regulated kinase via vascular endothelial growth factor receptor signaling in nontumorigenic (RWPE-1) prostate epithelial cells. *J Nutr Biochem*. 18:525-532.
- Cohen, P., D.M. Peehl, G. Lamson, and R.G. Rosenfeld. 1991. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 73:401-407.
- Cohen, S. 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 237:1555-1562.
- Cohen, S. 1965. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol*. 12:394-407.
- Collins, A.T., P.A. Berry, C. Hyde, M.J. Stower, and N.J. Maitland. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 65:10946-10951.
- Collins, A.T., F.K. Habib, N.J. Maitland, and D.E. Neal. 2001. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci*. 114:3865-3872.



- Colombel, M., C.A. Olsson, P.Y. Ng, and R. Buttyan. 1992. Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res.* 52:4313-4319.
- Colomiere, M., A.C. Ward, C. Riley, M.K. Trenerry, D. Cameron-Smith, J. Findlay, L. Ackland, and N. Ahmed. 2009. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer.* 100:134-144.
- Cooke, P.S., P. Young, and G.R. Cunha. 1991. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology.* 128:2867-2873.
- Coussens, L.M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420:860-867.
- Culig, Z., G. Bartsch, and A. Hobisch. 2002. Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Mol Cell Endocrinol.* 197:231-238.
- Culig, Z., A. Hobisch, M.V. Cronauer, C. Radmayr, J. Trapman, A. Hittmair, G. Bartsch, and H. Klocker. 1994. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 54:5474-5478.
- Culig, Z., H. Steiner, G. Bartsch, and A. Hobisch. 2005. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem.* 95:497-505.
- Cunha, G.R. 1972. Epithelio-mesenchymal interactions in primordial gland structures which become responsive to androgenic stimulation. *Anat Rec.* 172:179-195.
- Cunha, G.R., A.A. Donjacour, P.S. Cooke, S. Mee, R.M. Bigsby, S.J. Higgins, and Y. Sugimura. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev.* 8:338-362.
- Cunha, G.R., W. Ricke, A. Thomson, P.C. Marker, G. Risbridger, S.W. Hayward, Y.Z. Wang, A.A. Donjacour, and T. Kurita. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92:221-236.
- Cutress, M.L., H.C. Whitaker, I.G. Mills, M. Stewart, and D.E. Neal. 2008. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci.* 121:957-968.
- Danielpour, D. 2005. Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate. *Eur J Cancer.* 41:846-857.
- Darnell, J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science.* 277:1630-1635.
- David, M., L. Wong, R. Flavell, S.A. Thompson, A. Wells, A.C. Lerner, and G.R. Johnson. 1996. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem.* 271:9185-9188.
- De Luca, A., A. Carotenuto, A. Rachiglio, M. Gallo, M.R. Maiello, D. Aldinucci, A. Pinto, and N. Normanno. 2008. The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J Cell Physiol.* 214:559-567.
- De Marzo, A.M., A.K. Meeker, J.I. Epstein, and D.S. Coffey. 1998. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol.* 153:911-919.
- De Marzo, A.M., E.A. Platz, S. Sutcliffe, J. Xu, H. Gronberg, C.G. Drake, Y. Nakai, W.B. Isaacs, and W.G. Nelson. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 7:256-269.
- De Miguel, P., Royuela, R. Bethencourt, A. Ruiz, B. Fraile, and R. Paniagua. 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.* 11:722-727.
- De, S., J. Chen, N.V. Narizhneva, W. Heston, J. Brainard, E.H. Sage, and T.V. Byzova. 2003. Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem.* 278:39044-39050.
- De Sepulveda, P., S. Ilangumaran, and R. Rottapel. 2000. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *J Biol Chem.* 275:14005-14008.
- De Souza, D., L.J. Fabri, A. Nash, D.J. Hilton, N.A. Nicola, and M. Baca. 2002. SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities. *Biochemistry.* 41:9229-9236.

- Deftos, L.J., I. Barken, D.W. Burton, R.M. Hoffman, and J. Geller. 2005. Direct evidence that PTHrP expression promotes prostate cancer progression in bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:468-472.
- Degeorges, A., R. Tatoud, F. Fauvel-Lafeve, M.P. Podgorniak, G. Millot, P. de Cremoux, and F. Calvo. 1996. Stromal cells from human benign prostate hyperplasia produce a growth-inhibitory factor for LNCaP prostate cancer cells, identified as interleukin-6. *Int J Cancer.* 68:207-214.
- Dehm, S.M., and D.J. Tindall. 2006. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 99:333-344.
- Demand, J., S. Alberti, C. Patterson, and J. Hohfeld. 2001. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol.* 11:1569-1577.
- den Hartigh, J.C., P.M. van Bergen en Henegouwen, A.J. Verkleij, and J. Boonstra. 1992. The EGF receptor is an actin-binding protein. *J Cell Biol.* 119:349-355.
- Denmeade, S.R., X.S. Lin, and J.T. Isaacs. 1996. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate.* 28:251-265.
- Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29:117-129.
- Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 425:577-584.
- Devens, B.H., R.S. Weeks, M.R. Burns, C.L. Carlson, and M.K. Brawer. 2000. Polyamine depletion therapy in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 3:275-279.
- Di Lorenzo, G., G. Tortora, F.P. D'Armiento, G. De Rosa, S. Staibano, R. Autorino, M. D'Armiento, M. De Laurentiis, S. De Placido, G. Catalano, A.R. Bianco, and F. Ciardiello. 2002. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 8:3438-3444.
- Dittrich, E., C.R. Haft, L. Muys, P.C. Heinrich, and L. Graeve. 1996. A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem.* 271:5487-5494.
- Domagala, T., N. Konstantopoulos, F. Smyth, R.N. Jorissen, L. Fabri, D. Geleick, I. Lax, J. Schlessinger, W. Sawyer, G.J. Howlett, A.W. Burgess, and E.C. Nice. 2000. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors.* 18:11-29.
- Donjacour, A.A., A.A. Thomson, and G.R. Cunha. 2003. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol.* 261:39-54.
- Dorkin, T.J., M.C. Robinson, C. Marsh, A. Bjartell, D.E. Neal, and H.Y. Leung. 1999. FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene.* 18:2755-2761.
- Douglas, A.M., S.L. Grant, G.A. Goss, D.R. Clouston, R.L. Sutherland, and C.G. Begley. 1998. Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer.* 75:64-73.
- Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, and M.D. Waterfield. 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature.* 307:521-527.
- Drachenberg, D.E., A.A. Elgamal, R. Rowbotham, M. Peterson, and G.P. Murphy. 1999. Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 41:127-133.
- Draper, B.K., T. Komurasaki, M.K. Davidson, and L.B. Nanney. 2003. Epiregulin is more potent than EGF or TGFalpha in promoting in vitro wound closure due to enhanced ERK/MAPK activation. *J Cell Biochem.* 89:1126-1137.
- Dubbink, H.J., R. Hersmus, C.S. Verma, H.A. van der Korput, C.A. Berrevoets, J. van Tol, A.C. Ziel-van der Made, A.O. Brinkmann, A.C. Pike, and J. Trapman. 2004. Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 18:2132-2150.

- Ebi, M., H. Kataoka, T. Shimura, E. Kubota, Y. Hirata, T. Mizushima, T. Mizoshita, M. Tanaka, M. Mabuchi, H. Tsukamoto, S. Tanida, T. Kamiya, S. Higashiyama, and T. Joh. 2010. TGFbeta induces proHB-EGF shedding and EGFR transactivation through ADAM activation in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Edwards, D.R., M.M. Handsley, and C.J. Pennington. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 29:258-289.
- Elkahwaji, J.E., W. Zhong, W.J. Hopkins, and W. Bushman. 2007. Chronic bacterial infection and inflammation incite reactive hyperplasia in a mouse model of chronic prostatitis. *Prostate*. 67:14-21.
- Ellem, S.J., J.F. Schmitt, J.S. Pedersen, M. Frydenberg, and G.P. Risbridger. 2004. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:2434-2441.
- Elleman, T.C., T. Domagala, N.M. McKern, M. Nerrie, B. Lonqvist, T.E. Adams, J. Lewis, G.O. Lovrecz, P.A. Hoyne, K.M. Richards, G.J. Howlett, J. Rothacker, R.N. Jorissen, M. Lou, T.P. Garrett, A.W. Burgess, E.C. Nice, and C.W. Ward. 2001. Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain. *Biochemistry*. 40:8930-8939.
- Ellwood-Yen, K., T.G. Graeber, J. Wongvipat, M.L. Iruela-Arispe, J. Zhang, R. Matusik, G.V. Thomas, and C.L. Sawyers. 2003. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell*. 4:223-238.
- Elo, J.P., L. Kvist, K. Leinonen, V. Isomaa, P. Henttu, O. Lukkarinen, and P. Vihko. 1995. Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab*. 80:3494-3500.
- Ernst, P.B., and B.D. Gold. 2000. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*. 54:615-640.
- Eskens, F.A. 2004. Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br J Cancer*. 90:1-7.
- Espey, M.G., K.M. Miranda, D.D. Thomas, S. Xavier, D. Citrin, M.P. Vitek, and D.A. Wink. 2002. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann N Y Acad Sci*. 962:195-206.
- Eto, M., J. Bennouna, O.C. Hunter, P.A. Hershberger, T. Kanto, C.S. Johnson, M.T. Lotze, and A.A. Amoscato. 2003. C16 ceramide accumulates following androgen ablation in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate*. 57:66-79.
- Fan, H., C.W. Turck, and R. Derynck. 2003. Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *J Biol Chem*. 278:18617-18627.
- Fan, W., T. Yanase, H. Morinaga, T. Okabe, M. Nomura, H. Daitoku, A. Fukamizu, S. Kato, R. Takayanagi, and H. Nawata. 2007. Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J Biol Chem*. 282:7329-7338.
- Farooq, A., and M.M. Zhou. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal*. 16:769-779.
- Feldman, B.J., and D. Feldman. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 1:34-45.
- Feng, S., F. Wang, A. Matsubara, M. Kan, and W.L. McKeenan. 1997. Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 57:5369-5378.
- Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 9:669-676.



- Festuccia, C., A. Angelucci, G.L. Gravina, L. Biordi, D. Millimaggi, P. Muzi, C. Vicentini, and M. Bologna. 2005. Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. EGF-receptor inhibition may prevent tumor cell dissemination. *Thromb Haemost.* 93:964-975.
- Festuccia, C., M. Bologna, G.L. Gravina, F. Guerra, A. Angelucci, I. Villanova, D. Millimaggi, and A. Teti. 1999. Osteoblast conditioned media contain TGF-beta1 and modulate the migration of prostate tumor cells and their interactions with extracellular matrix components. *Int J Cancer.* 81:395-403.
- Finch, P.W., G.R. Cunha, J.S. Rubin, J. Wong, and D. Ron. 1995. Pattern of keratinocyte growth factor and keratinocyte growth factor receptor expression during mouse fetal development suggests a role in mediating morphogenetic mesenchymal-epithelial interactions. *Dev Dyn.* 203:223-240.
- Fiorelli, G., A. De Bellis, A. Longo, P. Pioli, A. Costantini, S. Giannini, G. Forti, and M. Serio. 1991. Growth factors in the human prostate. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40:199-205.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285:1182-1186.
- Foradori, C.D., M.J. Weiser, and R.J. Handa. 2008. Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol.* 29:169-181.
- Franck-Lissbrant, I., S. Haggstrom, J.E. Damber, and A. Bergh. 1998. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology.* 139:451-456.
- Frantsve, J., J. Schwaller, D.W. Sternberg, J. Kutok, and D.G. Gilliland. 2001. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* 21:3547-3557.
- Frebel, K., and S. Wiese. 2006. Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans.* 34:1287-1290.
- Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima, and T. Hirano. 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity.* 5:449-460.
- Gaddipati, J.P., D.G. McLeod, H.B. Heidenberg, I.A. Sesterhenn, M.J. Finger, J.W. Moul, and S. Srivastava. 1994. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res.* 54:2861-2864.
- Gadella, T.W., Jr., and T.M. Jovin. 1995. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol.* 129:1543-1558.
- Gao, W., C.E. Bohl, and J.T. Dalton. 2005. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev.* 105:3352-3370.
- Garrett, T.P., N.M. McKern, M. Lou, T.C. Elleman, T.E. Adams, G.O. Lovrecz, H.J. Zhu, F. Walker, M.J. Frenkel, P.A. Hoyne, R.N. Jorissen, E.C. Nice, A.W. Burgess, and C.W. Ward. 2002. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell.* 110:763-773.
- Gatson, J.W., P. Kaur, and M. Singh. 2006. Dihydrotestosterone differentially modulates the mitogen-activated protein kinase and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathways through the nuclear and novel membrane androgen receptor in C6 cells. *Endocrinology.* 147:2028-2034.
- Ge, G., J. Wu, Y. Wang, and Q. Lin. 2002. Activation mechanism of solubilized epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:914-920.
- Gelmann, E.P. 2002. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* 20:3001-3015.
- George, D.J., S. Halabi, T.F. Shepard, B. Sanford, N.J. Vogelzang, E.J. Small, and P.W. Kantoff. 2005. The prognostic significance of plasma interleukin-6 levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 9480. *Clin Cancer Res.* 11:1815-1820.

- Gerdes, M.J., T.D. Dang, M. Larsen, and D.R. Rowley. 1998. Transforming growth factor-beta1 induces nuclear to cytoplasmic distribution of androgen receptor and inhibits androgen response in prostate smooth muscle cells. *Endocrinology*. 139:3569-3577.
- Gerdes, M.J., M. Larsen, T.D. Dang, S.J. Ressler, J.A. Tuxhorn, and D.R. Rowley. 2004. Regulation of rat prostate stromal cell myodifferentiation by androgen and TGF-beta1. *Prostate*. 58:299-307.
- Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P.C. Heinrich, and L. Graeve. 1996. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem*. 271:12991-12998.
- Giese, B., C.K. Au-Yeung, A. Herrmann, S. Diefenbach, C. Haan, A. Kuster, S.B. Wortmann, C. Roderburg, P.C. Heinrich, I. Behrmann, and G. Muller-Newen. 2003. Long term association of the cytokine receptor gp130 and the Janus kinase Jak1 revealed by FRAP analysis. *J Biol Chem*. 278:39205-39213.
- Gioeli, D., B.E. Black, V. Gordon, A. Spencer, C.T. Kesler, S.T. Eblen, B.M. Paschal, and M.J. Weber. 2006. Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol Endocrinol*. 20:503-515.
- Gioeli, D., S.B. Ficarro, J.J. Kwiek, D. Aaronson, M. Hancock, A.D. Catling, F.M. White, R.E. Christian, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and M.J. Weber. 2002. Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*. 277:29304-29314.
- Giri, D., and M. Ittmann. 1999. Inactivation of the PTEN tumor suppressor gene is associated with increased angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma. *Hum Pathol*. 30:419-424.
- Giri, D., M. Ozen, and M. Ittmann. 2001. Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *Am J Pathol*. 159:2159-2165.
- Gmyrek, G.A., M. Walburg, C.P. Webb, H.M. Yu, X. You, E.D. Vaughan, G.F. Vande Woude, and B.S. Knudsen. 2001. Normal and malignant prostate epithelial cells differ in their response to hepatocyte growth factor/scatter factor. *Am J Pathol*. 159:579-590.
- Gonzalez-Herrera, I.G., L. Prado-Lourenco, F. Pileur, C. Conte, A. Morin, F. Cabon, H. Prats, S. Vagner, F. Bayard, S. Audigier, and A.C. Prats. 2006. Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J*. 20:476-478.
- Gottlieb, B., H. Lehvaslaiho, L.K. Beitel, R. Lumbroso, L. Pinsky, and M. Trifiro. 1998. The Androgen Receptor Gene Mutations Database. *Nucleic Acids Res*. 26:234-238.
- Grant, S.L., A. Hammacher, A.M. Douglas, G.A. Goss, R.K. Mansfield, J.K. Heath, and C.G. Begley. 2002. An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells. *Oncogene*. 21:460-474.
- Graus-Porta, D., R.R. Beerli, J.M. Daly, and N.E. Hynes. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 16:1647-1655.
- Gregory, C.W., B. He, R.T. Johnson, O.H. Ford, J.L. Mohler, F.S. French, and E.M. Wilson. 2001a. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*. 61:4315-4319.
- Gregory, C.W., R.T. Johnson, Jr., J.L. Mohler, F.S. French, and E.M. Wilson. 2001b. Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res*. 61:2892-2898.
- Grotzinger, J., G. Kurapkat, A. Wollmer, M. Kalai, and S. Rose-John. 1997. The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins*. 27:96-109.
- Gschwind, A., S. Hart, O.M. Fischer, and A. Ullrich. 2003. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J*. 22:2411-2421.

- Gu, H., J.C. Pratt, S.J. Burakoff, and B.G. Neel. 1998. Cloning of p97/Gab2, the major SHP2-binding protein in hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation. *Mol Cell.* 2:729-740.
- Gunaje, J.J., and G.J. Bhat. 2001. Involvement of tyrosine phosphatase PTP1D in the inhibition of interleukin-6-induced Stat3 signaling by alpha-thrombin. *Biochem Biophys Res Commun.* 288:252-257.
- Guy, P.M., J.V. Platko, L.C. Cantley, R.A. Cerione, and K.L. Carraway, 3rd. 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8132-8136.
- Haan, C., P.C. Heinrich, and I. Behrmann. 2002. Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem J.* 361:105-111.
- Haan, C., H.M. Hermanns, P.C. Heinrich, and I. Behrmann. 2000. A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem J.* 349:261-266.
- Haan, C., H. Is'harc, H.M. Hermanns, H. Schmitz-Van De Leur, I.M. Kerr, P.C. Heinrich, J. Grotzinger, and I. Behrmann. 2001. Mapping of a region within the N terminus of Jak1 involved in cytokine receptor interaction. *J Biol Chem.* 276:37451-37458.
- Haelens, A., T. Tanner, S. Denayer, L. Callewaert, and F. Claessens. 2007. The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 67:4514-4523.
- Hallberg, B., S.I. Rayter, and J. Downward. 1994. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem.* 269:3913-3916.
- Hammacher, A., R.T. Richardson, J.E. Layton, D.K. Smith, L.J. Angus, D.J. Hilton, N.A. Nicola, J. Wijdenes, and R.J. Simpson. 1998. The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem.* 273:22701-22707.
- Hanke, J.H., J.P. Gardner, R.L. Dow, P.S. Changelian, W.H. Brissette, E.J. Weringer, B.A. Pollok, and P.A. Connelly. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem.* 271:695-701.
- Harma, V., J. Virtanen, R. Makela, A. Happonen, J.P. Mpindi, M. Knuutila, P. Kohonen, J. Lotjonen, O. Kallioniemi, and M. Nees. 2010. A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS One.* 5:e10431.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 11:2615-2624.
- Hayashi, N., Y. Sugimura, J. Kawamura, A.A. Donjacour, and G.R. Cunha. 1991. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod.* 45:308-321.
- Hayes, S.A., M. Zarnegar, M. Sharma, F. Yang, D.M. Peehl, P. ten Dijke, and Z. Sun. 2001. SMAD3 represses androgen receptor-mediated transcription. *Cancer Res.* 61:2112-2118.
- Hayward, S.W., R. Del Buono, N. Deshpande, and P.A. Hall. 1992. A functional model of adult human prostate epithelium. The role of androgens and stroma in architectural organisation and the maintenance of differentiated secretory function. *J Cell Sci.* 102 ( Pt 2):361-372.
- Hayward, S.W., M.A. Rosen, and G.R. Cunha. 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol.* 79 Suppl 2:18-26.
- He, B., J.A. Kemppainen, J.J. Voegel, H. Gronemeyer, and E.M. Wilson. 1999. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *J Biol Chem.* 274:37219-37225.

- He, B., J.A. Kempainen, and E.M. Wilson. 2000. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH<sub>2</sub>-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem.* 275:22986-22994.
- He, B., L.W. Lee, J.T. Minges, and E.M. Wilson. 2002a. Dependence of selective gene activation on the androgen receptor NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal interaction. *J Biol Chem.* 277:25631-25639.
- He, C., M. Hobert, L. Friend, and C. Carlin. 2002b. The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J Biol Chem.* 277:38284-38293.
- Heer, R., C.N. Robson, B.K. Shenton, and H.Y. Leung. 2007. The role of androgen in determining differentiation and regulation of androgen receptor expression in the human prostatic epithelium transient amplifying population. *J Cell Physiol.* 212:572-578.
- Heery, D.M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M.G. Parker. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 387:733-736.
- Heim, M.H., I.M. Kerr, G.R. Stark, and J.E. Darnell, Jr. 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science.* 267:1347-1349.
- Heinlein, C.A., and C. Chang. 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.* 23:175-200.
- Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 374:1-20.
- Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 334 ( Pt 2):297-314.
- Hemann, U., C. Gerhartz, B. Heesel, J. Sasse, G. Kurapat, J. Grotzinger, A. Wollmer, Z. Zhong, J.E. Darnell, Jr., L. Graeve, P.C. Heinrich, and F. Horn. 1996. Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem.* 271:12999-13007.
- Hemming, A.W., N.L. Davis, A. Klufftinger, B. Robinson, N.F. Quenville, B. Liseman, and J. LeRiche. 1992. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol.* 51:147-152.
- Hernes, E., S.D. Fossa, A. Berner, B. Otnes, and J.M. Nesland. 2004. Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen-independence. *Br J Cancer.* 90:449-454.
- Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell.* 63:1149-1157.
- Higashiyama, S., J.A. Abraham, J. Miller, J.C. Fiddes, and M. Klagsbrun. 1991. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science.* 251:936-939.
- Higashiyama, S., H. Iwabuki, C. Morimoto, M. Hieda, H. Inoue, and N. Matsushita. 2008. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci.* 99:214-220.
- Higashiyama, S., and D. Nanba. 2005. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta.* 1751:110-117.
- Ho, S.M. 2004. Estrogens and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J Cell Biochem.* 91:491-503.
- Hobisch, A., H. Rogatsch, A. Hittmair, D. Fuchs, G. Bartsch, Jr., H. Klocker, G. Bartsch, and Z. Culig. 2000. Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *J Pathol.* 191:239-244.
- Hofseth, L.J., S. Saito, S.P. Hussain, M.G. Espey, K.M. Miranda, Y. Araki, C. Jhappan, Y. Higashimoto, P. He, S.P. Linke, M.M. Quezado, I. Zurer, V. Rotter, D.A. Wink, E. Appella, and C.C. Harris. 2003. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:143-148.

- Holgado-Madruga, M., D.R. Emlet, D.K. Moscatello, A.K. Godwin, and A.J. Wong. 1996. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*. 379:560-564.
- Horn, D., W.C. Fitzpatrick, P.T. Gompper, V. Ochs, M. Bolton-Hansen, J. Zarling, N. Malik, G.J. Todaro, and P.S. Linsley. 1990. Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors*. 2:157-165.
- Horoszewicz, J.S., S.S. Leong, E. Kawinski, J.P. Karr, H. Rosenthal, T.M. Chu, E.A. Mirand, and G.P. Murphy. 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 43:1809-1818.
- Huang, L., Y. Pu, S. Alam, L. Birch, and G.S. Prins. 2005. The role of Fgf10 signaling in branching morphogenesis and gene expression of the rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens. *Dev Biol*. 278:396-414.
- Huang, Y., S.O. Kim, J. Jiang, and S.J. Frank. 2003. Growth hormone-induced phosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor in 3T3-F442A cells. Modulation of EGF-induced trafficking and signaling. *J Biol Chem*. 278:18902-18913.
- Hubbard, S.R., M. Mohammadi, and J. Schlessinger. 1998. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 273:11987-11990.
- Hudson, D.L. 2004. Epithelial stem cells in human prostate growth and disease. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 7:188-194.
- Hudson, D.L., M. O'Hare, F.M. Watt, and J.R. Masters. 2000. Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Lab Invest*. 80:1243-1250.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 350:2335-2342.
- Hussain, S.P., L.J. Hofseth, and C.C. Harris. 2003. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 3:276-285.
- Hynes, N.E., and H.A. Lane. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 5:341-354.
- Ihle, J.N., T. Nosaka, W. Thierfelder, F.W. Quelle, and K. Shimoda. 1997. Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells*. 15 Suppl 1:105-111; discussion 112.
- Isaacs, J.T., and D.S. Coffey. 1989. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl*. 2:33-50.
- Itoh, N., U. Patel, A.S. Cupp, and M.K. Skinner. 1998. Developmental and hormonal regulation of transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1), -2, and -3 gene expression in isolated prostatic epithelial and stromal cells: epidermal growth factor and TGFbeta interactions. *Endocrinology*. 139:1378-1388.
- Iwata, T., D. Schultz, J. Hicks, G.K. Hubbard, L.N. Mutton, T.L. Lotan, C. Bethel, M.T. Lotz, S. Yegnasubramanian, W.G. Nelson, C.V. Dang, M. Xu, U. Anele, C.M. Koh, C.J. Bieberich, and A.M. De Marzo. 2010. MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells. *PLoS One*. 5:e9427.
- Jain, A., A. Lam, I. Vivanco, M.F. Carey, and R.E. Reiter. 2002. Identification of an androgen-dependent enhancer within the prostate stem cell antigen gene. *Mol Endocrinol*. 16:2323-2337.
- Jaiswal, M., N.F. LaRusso, N. Nishioka, Y. Nakabeppu, and G.J. Gores. 2001. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res*. 61:6388-6393.
- Jennbacken, K., C. Vallbo, W. Wang, and J.E. Damber. 2005. Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate*. 65:110-116.
- Jo, M., K.S. Thomas, S. Takimoto, A. Gaultier, E.H. Hsieh, R.D. Lester, and S.L. Gonias. 2007. Urokinase receptor primes cells to proliferate in response to epidermal growth factor. *Oncogene*. 26:2585-2594.
- Jorissen, R.N., F. Walker, N. Pouliot, T.P. Garrett, C.W. Ward, and A.W. Burgess. 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 284:31-53.



- Joseph, I.B., J.B. Nelson, S.R. Denmeade, and J.T. Isaacs. 1997. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res.* 3:2507-2511.
- Kaarbo, M., T.I. Klokk, and F. Saatcioglu. 2007. Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *Bioessays.* 29:1227-1238.
- Kalai, M., F.A. Montero-Julian, J. Grotzinger, V. Fontaine, P. Vandebussche, R. Deschuyteneer, A. Wollmer, H. Brailly, and J. Content. 1997. Analysis of the human interleukin-6/human interleukin-6 receptor binding interface at the amino acid level: proposed mechanism of interaction. *Blood.* 89:1319-1333.
- Kalai, M., F.A. Montero-Julian, J. Grotzinger, A. Wollmer, D. Morelle, J. Brochier, S. Rose-John, P.C. Heinrich, H. Brailly, and J. Content. 1996. Participation of two Ser-Ser-Phe-Tyr repeats in interleukin-6 (IL-6)-binding sites of the human IL-6 receptor. *Eur J Biochem.* 238:714-723.
- Kalinowski, A., N.J. Plowes, Q. Huang, C. Berdejo-Izquierdo, R.R. Russell, and K.S. Russell. 2010. Metalloproteinase-dependent cleavage of neuregulin and autocrine stimulation of vascular endothelial cells. *FASEB J.* 24:2567-2575.
- Kambhampati, S., G. Ray, K. Sengupta, V.P. Reddy, S.K. Banerjee, and P.J. Van Veldhuizen. 2005. Growth factors involved in prostate carcinogenesis. *Front Biosci.* 10:1355-1367.
- Kamizono, S., T. Hanada, H. Yasukawa, S. Minoguchi, R. Kato, M. Minoguchi, K. Hattori, S. Hatakeyama, M. Yada, S. Morita, T. Kitamura, H. Kato, K. Nakayama, and A. Yoshimura. 2001. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem.* 276:12530-12538.
- Kamura, T., S. Sato, D. Haque, L. Liu, W.G. Kaelin, Jr., R.C. Conaway, and J.W. Conaway. 1998. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* 12:3872-3881.
- Kang, H.Y., K.E. Huang, S.Y. Chang, W.L. Ma, W.J. Lin, and C. Chang. 2002. Differential modulation of androgen receptor-mediated transactivation by Smad3 and tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem.* 277:43749-43756.
- Kaptein, A., V. Paillard, and M. Saunders. 1996. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J Biol Chem.* 271:5961-5964.
- Karunagaran, D., E. Tzahar, R.R. Beerli, X. Chen, D. Graus-Porta, B.J. Ratzkin, R. Seger, N.E. Hynes, and Y. Yarden. 1996. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 15:254-264.
- Kasina, S., P.A. Scherle, C.L. Hall, and J.A. Macoska. 2009. ADAM-mediated amphiregulin shedding and EGFR transactivation. *Cell Prolif.* 42:799-812.
- Keller, E.T., C. Chang, and W.B. Ershler. 1996. Inhibition of NFkappaB activity through maintenance of I kappa B alpha levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. *J Biol Chem.* 271:26267-26275.
- Kellokumpu-Lehtinen, P. 1989. Correlation of embryonic development and adult neoplastic changes of human prostate. *Eur Urol.* 16:386-390.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 141:52-67.
- Kil, S.J., and C. Carlin. 2000. EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments. *J Cell Physiol.* 185:47-60.
- Kim, H., and H. Baumann. 1999. Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol Cell Biol.* 19:5326-5338.
- Kim, S.J., H. Uehara, T. Karashima, D.L. Shepherd, J.J. Killion, and I.J. Fidler. 2003. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res.* 9:1200-1210.

- Kimbro, K.S., and J.W. Simons. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 13:739-749.
- Kimura, G., J. Kasuya, S. Giannini, Y. Honda, S. Mohan, M. Kawachi, M. Akimoto, and Y. Fujita-Yamaguchi. 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.
- Kimura, K., M. Markowski, C. Bowen, and E.P. Gelmann. 2001. Androgen blocks apoptosis of hormone-dependent prostate cancer cells. *Cancer Res*. 61:5611-5618.
- Kinbara, H., and G.R. Cunha. 1996. Ductal heterogeneity in rat dorsal-lateral prostate. *Prostate*. 28:58-64.
- Kloth, M.T., K.K. Laughlin, J.S. Biscardi, J.L. Boerner, S.J. Parsons, and C.M. Silva. 2003. STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem*. 278:1671-1679.
- Knowlden, J.M., I.R. Hutcheson, D. Barrow, J.M. Gee, and R.I. Nicholson. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology*. 146:4609-4618.
- Koivisto, P., J. Kononen, C. Palmberg, T. Tammela, E. Hyytinen, J. Isola, J. Trapman, K. Cleutjens, A. Noordzij, T. Visakorpi, and O.P. Kallioniemi. 1997. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res*. 57:314-319.
- Kostenuik, P.J., G. Singh, and F.W. Orr. 1997. Transforming growth factor beta upregulates the integrin-mediated adhesion of human prostatic carcinoma cells to type I collagen. *Clin Exp Metastasis*. 15:41-52.
- Kousteni, S., T. Bellido, L.I. Plotkin, C.A. O'Brien, D.L. Bodenner, L. Han, K. Han, G.B. DiGregorio, J.A. Katzenellenbogen, B.S. Katzenellenbogen, P.K. Roberson, R.S. Weinstein, R.L. Jilka, and S.C. Manolagas. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 104:719-730.
- Krieger, J.N., D.E. Riley, R.L. Vesella, D.C. Miner, S.O. Ross, and P.H. Lange. 2000. Bacterial dna sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer and chronic prostatitis. *J Urol*. 164:1221-1228.
- Kung, H.J., and C.P. Evans. 2009. Oncogenic activation of androgen receptor. *Urol Oncol*. 27:48-52.
- Kurita, T., Y.Z. Wang, A.A. Donjacour, C. Zhao, J.P. Lydon, B.W. O'Malley, J.T. Isaacs, R. Dahiya, and G.R. Cunha. 2001. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. *Cell Death Differ*. 8:192-200.
- Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, H. Dahmen, A. Kuster, J. Grotzinger, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 1999. Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J Immunol*. 162:1480-1487.
- Kuslak, S.L., and P.C. Marker. 2007. Fibroblast growth factor receptor signaling through MEK-ERK is required for prostate bud induction. *Differentiation*. 75:638-651.
- Kwabi-Addo, B., D. Giri, K. Schmidt, K. Podsypanina, R. Parsons, N. Greenberg, and M. Ittmann. 2001. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11563-11568.
- Kwabi-Addo, B., M. Ozen, and M. Ittmann. 2004. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 11:709-724.
- Labrie, F., A. Dupont, A. Belanger, R. St-Arnaud, M. Giguere, Y. Lacourciere, J. Emond, and G. Monfette. 1986. Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Endocr Rev*. 7:67-74.
- Lamont, K.R., and D.J. Tindall. 2010. Androgen regulation of gene expression. *Adv Cancer Res*. 107:137-162.
- Lau, K.M., M. LaSpina, J. Long, and S.M. Ho. 2000. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res*. 60:3175-3182.



- Lawson, D.A., L. Xin, R.U. Lukacs, D. Cheng, and O.N. Witte. 2007. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:181-186.
- Lawson, D.A., Y. Zong, S. Memarzadeh, L. Xin, J. Huang, and O.N. Witte. 2010. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:2610-2615.
- Le Gall, S.M., P. Bobe, K. Reiss, K. Horiuchi, X.D. Niu, D. Lundell, D.R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C.P. Blobel. 2009. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell.* 20:1785-1794.
- Leaman, D.W., S. Pisharody, T.W. Flickinger, M.A. Commane, J. Schlessinger, I.M. Kerr, D.E. Levy, and G.R. Stark. 1996. Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 16:369-375.
- Leav, I., J.E. McNeal, J. Ziar, and J. Alroy. 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.* 29:668-675.
- Lechleider, R.J., S. Sugimoto, A.M. Bennett, A.S. Kashishian, J.A. Cooper, S.E. Shoelson, C.T. Walsh, and B.G. Neel. 1993. Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem.* 268:21478-21481.
- Lee, S.H., Y.J. Lee, and H.J. Han. 2010. Effect of arachidonic acid on hypoxia-induced IL-6 production in mouse ES cells: Involvement of MAPKs, NF-kappaB, and HIF-1alpha. *J Cell Physiol.* 222:574-585.
- Lee, S.O., J.Y. Chun, N. Nadiminty, W. Lou, and A.C. Gao. 2007. Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression. *Prostate.* 67:764-773.
- Lee, Y.F., C.R. Shyr, T.H. Thin, W.J. Lin, and C. Chang. 1999. Convergence of two repressors through heterodimer formation of androgen receptor and testicular orphan receptor-4: a unique signaling pathway in the steroid receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:14724-14729.
- Lehmann, U., J. Schmitz, M. Weissenbach, R.M. Sobota, M. Hortner, K. Friederichs, I. Behrmann, W. Tsiaris, A. Sasaki, J. Schneider-Mergener, A. Yoshimura, B.G. Neel, P.C. Heinrich, and F. Schaper. 2003. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem.* 278:661-671.
- Lemmon, M.A., Z. Bu, J.E. Ladbury, M. Zhou, D. Pinchasi, I. Lax, D.M. Engelman, and J. Schlessinger. 1997. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* 16:281-294.
- Lenferink, A.E., R. Pinkas-Kramarski, M.L. van de Poll, M.J. van Vugt, L.N. Klapper, E. Tzahar, H. Waterman, M. Sela, E.J. van Zoelen, and Y. Yarden. 1998. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.* 17:3385-3397.
- Leonard, W.J. 2001. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol.* 73:271-277.
- Leong, K.G., B.E. Wang, L. Johnson, and W.Q. Gao. 2008. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature.* 456:804-808.
- Leotoing, L., M. Manin, D. Monte, S. Baron, Y. Communal, C. Lours, G. Veyssiere, L. Morel, and C. Beaudoin. 2007. Crosstalk between androgen receptor and epidermal growth factor receptor-signalling pathways: a molecular switch for epithelial cell differentiation. *J Mol Endocrinol.* 39:151-162.

- Leu, T.H., and M.C. Maa. 2003. Functional implication of the interaction between EGF receptor and c-Src. *Front Biosci.* 8:s28-38.
- Levine, A.C., X.H. Liu, P.D. Greenberg, M. Eliashvili, J.D. Schiff, S.A. Aaronson, J.F. Holland, and A. Kirschenbaum. 1998. Androgens induce the expression of vascular endothelial growth factor in human fetal prostatic fibroblasts. *Endocrinology.* 139:4672-4678.
- Li, H., and A. Villalobo. 2002. Evidence for the direct interaction between calmodulin and the human epidermal growth factor receptor. *Biochem J.* 362:499-505.
- Li, J., and F. Al-Azzawi. 2009. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* 63:142-148.
- Li, L., G. Yang, S. Ebara, T. Satoh, Y. Nasu, T.L. Timme, C. Ren, J. Wang, S.A. Tahir, and T.C. Thompson. 2001. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 61:4386-4392.
- Li, W., C.L. Wu, P.G. Febbo, and A.F. Olumi. 2007. Stromally expressed c-Jun regulates proliferation of prostate epithelial cells. *Am J Pathol.* 171:1189-1198.
- Li, X., Y. Wang, A.R. Sharif-Afshar, C. Uwamariya, A. Yi, K. Ishii, S.W. Hayward, R.J. Matusik, and N.A. Bhowmick. 2009. Urothelial transdifferentiation to prostate epithelia is mediated by paracrine TGF-beta signaling. *Differentiation.* 77:95-102.
- Liao, G., L.Y. Chen, A. Zhang, A. Godavathy, F. Xia, J.C. Ghosh, H. Li, and J.D. Chen. 2003. Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem.* 278:5052-5061.
- Liao, X., S. Tang, J.B. Thrasher, T.L. Griebing, and B. Li. 2005. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 4:505-515.
- Liebmann, C. 2001. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal.* 13:777-785.
- Lin, Y., and F. Wang. 2010. FGF signalling in prostate development, tissue homeostasis and tumorigenesis. *Biosci Rep.* 30:285-291.
- Litvinov, I.V., A.M. De Marzo, and J.T. Isaacs. 2003. Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J Clin Endocrinol Metab.* 88:2972-2982.
- Litvinov, I.V., D.J. Vander Griend, Y. Xu, L. Antony, S.L. Dalrymple, and J.T. Isaacs. 2006. Low-calcium serum-free defined medium selects for growth of normal prostatic epithelial stem cells. *Cancer Res.* 66:8598-8607.
- Liu, B., J. Liao, X. Rao, S.A. Kushner, C.D. Chung, D.D. Chang, and K. Shuai. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10626-10631.
- Liu, H., P. Moy, S. Kim, Y. Xia, A. Rajasekaran, V. Navarro, B. Knudsen, and N.H. Bander. 1997. Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. *Cancer Res.* 57:3629-3634.
- Liu, Y., and L.R. Rohrschneider. 2002. The gift of Gab. *FEBS Lett.* 515:1-7.
- Loy, C.J., K.S. Sim, and E.L. Yong. 2003. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4562-4567.
- Lu, T., L.G. Burdelya, S.M. Swiatkowski, A.D. Boiko, P.H. Howe, G.R. Stark, and A.V. Gudkov. 2004. Secreted transforming growth factor beta2 activates NF-kappaB, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7112-7117.
- Lu, W., D. Gong, D. Bar-Sagi, and P.A. Cole. 2001a. Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol Cell.* 8:759-769.
- Lu, W., Y. Luo, M. Kan, and W.L. McKeehan. 1999. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem.* 274:12827-12834.
- Lu, X., and Y. Kang. 2010. Epidermal growth factor signalling and bone metastasis. *Br J Cancer.* 102:457-461.

- Lu, Z., G. Jiang, P. Blume-Jensen, and T. Hunter. 2001b. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol.* 21:4016-4031.
- Ma, X., A.C. Ziel-van der Made, B. Autar, H.A. van der Korput, M. Vermeij, P. van Duijn, K.B. Cleutjens, R. de Krijger, P. Krimpenfort, A. Berns, T.H. van der Kwast, and J. Trapman. 2005. Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res.* 65:5730-5739.
- Maeda, A., K. Nakashiro, S. Hara, T. Sasaki, Y. Miwa, N. Tanji, M. Yokoyama, H. Hamakawa, and R. Oyasu. 2006. Inactivation of AR activates HGF/c-Met system in human prostatic carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 347:1158-1165.
- Maggiolini, M., A.G. Recchia, A. Carpino, A. Vivacqua, G. Fasanella, V. Rago, V. Pezzi, P.A. Briand, D. Picard, and S. Ando. 2004. Oestrogen receptor beta is required for androgen-stimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. *J Mol Endocrinol.* 32:777-791.
- Manin, M., S. Baron, K. Goossens, C. Beaudoin, C. Jean, G. Veyssiere, G. Verhoeven, and L. Morel. 2002. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J.* 366:729-736.
- Marcelli, M., M. Ittmann, S. Mariani, R. Sutherland, R. Nigam, L. Murthy, Y. Zhao, D. DiConcini, E. Puxeddu, A. Esen, J. Eastham, N.L. Weigel, and D.J. Lamb. 2000. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.* 60:944-949.
- Marker, P.C., A.A. Donjacour, R. Dahiya, and G.R. Cunha. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 253:165-174.
- Martin-Nieto, J., and A. Villalobo. 1998. The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry.* 37:227-236.
- Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 103:295-309.
- Massague, J., and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19:1745-1754.
- Matias, P.M., P. Donner, R. Coelho, M. Thomaz, C. Peixoto, S. Macedo, N. Otto, S. Joschko, P. Scholz, A. Wegg, S. Basler, M. Schafer, U. Egner, and M.A. Carrondo. 2000. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem.* 275:26164-26171.
- Matsubara, A., M. Kan, S. Feng, and W.L. McKeegan. 1998. Inhibition of growth of malignant rat prostate tumor cells by restoration of fibroblast growth factor receptor 2. *Cancer Res.* 58:1509-1514.
- Mattoon, D.R., B. Lamothe, I. Lax, and J. Schlessinger. 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.
- Mayer, M.P., and B. Bukau. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 62:670-684.
- McDonnell, T.J., P. Troncoso, S.M. Brisbay, C. Logothetis, L.W. Chung, J.T. Hsieh, S.M. Tu, and M.L. Campbell. 1992. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 52:6940-6944.
- McGuire, W.L., G.C. Chamness, and S.A. Fuqua. 1991. Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol Endocrinol.* 5:1571-1577.
- Melino, G., F. Bernassola, R.A. Knight, M.T. Corasaniti, G. Nistico, and A. Finazzi-Agro. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature.* 388:432-433.
- Mellinghoff, I.K., C. Tran, and C.L. Sawyers. 2002. Growth inhibitory effects of the dual ErbB1/ErbB2 tyrosine kinase inhibitor PKI-166 on human prostate cancer xenografts. *Cancer Res.* 62:5254-5259.

- Mellinghoff, I.K., I. Vivanco, A. Kwon, C. Tran, J. Wongvipat, and C.L. Sawyers. 2004. HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer Cell*. 6:517-527.
- Memarzadeh, S., L. Xin, D.J. Mulholland, A. Mansukhani, H. Wu, M.A. Teitell, and O.N. Witte. 2007. Enhanced paracrine FGF10 expression promotes formation of multifocal prostate adenocarcinoma and an increase in epithelial androgen receptor. *Cancer Cell*. 12:572-585.
- Michalaki, V., K. Syrigos, P. Charles, and J. Waxman. 2004. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*. 90:2312-2316.
- Micke, P., and A. Ostman. 2004. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*. 45 Suppl 2:S163-175.
- Migliaccio, A., G. Castoria, M. Di Domenico, A. de Falco, A. Bilancio, M. Lombardi, M.V. Barone, D. Ametrano, M.S. Zannini, C. Abbondanza, and F. Auricchio. 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J*. 19:5406-5417.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, G. Castoria, M. Nanayakkara, M. Lombardi, A. de Falco, A. Bilancio, L. Varricchio, A. Ciociola, and F. Auricchio. 2005. Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through *Src* in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer Res*. 65:10585-10593.
- Mimeault, M., and S.K. Batra. 2006. Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis*. 27:1-22.
- Mimeault, M., E. Moore, N. Moniaux, J.P. Henichart, P. Depreux, M.F. Lin, and S.K. Batra. 2006. Cytotoxic effects induced by a combination of cyclopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 118:1022-1031.
- Mimeault, M., N. Pommery, and J.P. Henichart. 2003. New advances on prostate carcinogenesis and therapies: involvement of EGF-EGFR transduction system. *Growth Factors*. 21:1-14.
- Mitchell, S.H., P.E. Murtha, S. Zhang, W. Zhu, and C.Y. Young. 2000. An androgen response element mediates LNCaP cell dependent androgen induction of the hK2 gene. *Mol Cell Endocrinol*. 168:89-99.
- Mitsudomi, T., and Y. Yatabe. 2010. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J*. 277:301-308.
- Moras, D., and H. Gronemeyer. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*. 10:384-391.
- Mori, S., K. Murakami-Mori, and B. Bonavida. 1999. Interleukin-6 induces G1 arrest through induction of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, and neuron-like morphology in LNCaP prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 257:609-614.
- Moriki, T., H. Maruyama, and I.N. Maruyama. 2001. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol*. 311:1011-1026.
- Moss, M.L., and F.H. Rasmussen. 2007. Fluorescent substrates for the proteinases ADAM17, ADAM10, ADAM8, and ADAM12 useful for high-throughput inhibitor screening. *Anal Biochem*. 366:144-148.
- Muir, C., L.W. Chung, D.D. Carson, and M.C. Farach-Carson. 2006. Hypoxia increases VEGF-A production by prostate cancer and bone marrow stromal cells and initiates paracrine activation of bone marrow endothelial cells. *Clin Exp Metastasis*. 23:75-86.
- Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:11349-11353.
- Murphy, G. 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 8:929-941.

- Myers, T.J., L.H. Brennaman, M. Stevenson, S. Higashiyama, W.E. Russell, D.C. Lee, and S.W. Sunnarborg. 2009. Mitochondrial reactive oxygen species mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent transforming growth factor-alpha shedding. *Mol Biol Cell*. 20:5236-5249.
- Naimi, B., A. Latil, G. Fournier, P. Mangin, O. Cussenot, and P. Berthon. 2002. Down-regulation of (IIIb) and (IIIc) isoforms of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is associated with malignant progression in human prostate. *Prostate*. 52:245-252.
- Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira, and T. Kishimoto. 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*. 387:924-929.
- Nakai, Y., W.G. Nelson, and A.M. De Marzo. 2007. The dietary charred meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine acts as both a tumor initiator and promoter in the rat ventral prostate. *Cancer Res*. 67:1378-1384.
- Nakano, K., Y. Fukabori, N. Itoh, W. Lu, M. Kan, W.L. McKeehan, and H. Yamanaka. 1999. Androgen-stimulated human prostate epithelial growth mediated by stromal-derived fibroblast growth factor-10. *Endocr J*. 46:405-413.
- Nakashima, J., M. Tachibana, Y. Horiguchi, M. Oya, T. Ohigashi, H. Asakura, and M. Murai. 2000. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 6:2702-2706.
- Nicholson, S.E., D. De Souza, L.J. Fabri, J. Corbin, T.A. Willson, J.G. Zhang, A. Silva, M. Asimakis, A. Farley, A.D. Nash, D. Metcalf, D.J. Hilton, N.A. Nicola, and M. Baca. 2000. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:6493-6498.
- Nishi, N., H. Oya, K. Matsumoto, T. Nakamura, H. Miyanaka, and F. Wada. 1996. Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostates. *Prostate*. 28:139-152.
- Niu, Y.N., and S.J. Xia. 2009. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian J Androl*. 11:28-35.
- Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M.R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, and D.S. Salomon. 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 366:2-16.
- O'Shea, J.J., M. Gadina, and R.D. Schreiber. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 109 Suppl:S121-131.
- Odaka, M., D. Kohda, I. Lax, J. Schlessinger, and F. Inagaki. 1997. Ligand-binding enhances the affinity of dimerization of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *J Biochem*. 122:116-121.
- Ogiso, H., R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J.H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu, and S. Yokoyama. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. 110:775-787.
- Ohlson, N., A. Bergh, P. Stattin, and P. Wikstrom. 2007. Castration-induced epithelial cell death in human prostate tissue is related to locally reduced IGF-1 levels. *Prostate*. 67:32-40.
- Okamoto, M., C. Lee, and R. Oyasu. 1997. Autocrine effect of androgen on proliferation of an androgen responsive prostatic carcinoma cell line, LNCaP: role of interleukin-6. *Endocrinology*. 138:5071-5074.
- Oosterhoff, J.K., J.A. Grootegoed, and L.J. Blok. 2005. Expression profiling of androgen-dependent and -independent LNCaP cells: EGF versus androgen signalling. *Endocr Relat Cancer*. 12:135-148.
- Orio, F., Jr., B. Terouanne, V. Georget, S. Lumbroso, C. Avances, C. Siatka, and C. Sultan. 2002. Potential action of IGF-1 and EGF on androgen receptor nuclear transfer and transactivation in normal and cancer human prostate cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 198:105-114.
- Ornitz, D.M., and N. Itoh. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2:REVIEWS3005.



- Ornstein, D.K., M. Cinquanta, S. Weiler, P.H. Duray, M.R. Emmert-Buck, C.D. Vocke, W.M. Linehan, and J.A. Ferretti. 2001. Expression studies and mutational analysis of the androgen regulated homeobox gene NKX3.1 in benign and malignant prostate epithelium. *J Urol.* 165:1329-1334.
- Owczarek, C.M., Y. Zhang, M.J. Layton, D. Metcalf, B. Roberts, and N.A. Nicola. 1997. The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *J Biol Chem.* 272:23976-23985.
- Ozanne, D.M., M.E. Brady, S. Cook, L. Gaughan, D.E. Neal, and C.N. Robson. 2000. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol.* 14:1618-1626.
- Palapattu, G.S., S. Sutcliffe, P.J. Bastian, E.A. Platz, A.M. De Marzo, W.B. Isaacs, and W.G. Nelson. 2005. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis.* 26:1170-1181.
- Palmer, J., M. Ernst, A. Hammacher, and P.J. Hertzog. 2005. Constitutive activation of gp130 leads to neuroendocrine differentiation in vitro and in vivo. *Prostate.* 62:282-289.
- Park, J.I., M.G. Lee, K. Cho, B.J. Park, K.S. Chae, D.S. Byun, B.K. Ryu, Y.K. Park, and S.G. Chi. 2003. Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene.* 22:4314-4332.
- Park, O.K., T.S. Schaefer, and D. Nathans. 1996. In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13704-13708.
- Peles, E., and Y. Yarden. 1993. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays.* 15:815-824.
- Penson, D.F., and J.M. Chan. 2007. Prostate cancer. *J Urol.* 177:2020-2029.
- Pervin, S., R. Singh, and G. Chaudhuri. 2001. Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3583-3588.
- Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March, and R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* 282:1281-1284.
- Pflanz, S., I. Kurth, J. Grotzinger, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2000. Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation. *J Immunol.* 165:7042-7049.
- Pietrzkowski, Z., G. Mulholland, L. Gomella, B.A. Jameson, D. Wernicke, and R. Baserga. 1993. Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. *Cancer Res.* 53:1102-1106.
- Plowman, G.D., J.M. Green, J.M. Culouscou, G.W. Carlton, V.M. Rothwell, and S. Buckley. 1993. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature.* 366:473-475.
- Pluskey, S., T.J. Wandless, C.T. Walsh, and S.E. Shoelson. 1995. Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J Biol Chem.* 270:2897-2900.
- Poghosyan, Z., S.M. Robbins, M.D. Houslay, A. Webster, G. Murphy, and D.R. Edwards. 2002. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 277:4999-5007.
- Pollak, M., W. Beamer, and J.C. Zhang. 1998. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 17:383-390.
- Pollak, M.N., E.S. Schernhammer, and S.E. Hankinson. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 4:505-518.
- Pouyssegur, J., V. Volmat, and P. Lenormand. 2002. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 64:755-763.

- Price, D. 1963. Comparative Aspects of Development and Structure in the Prostate. *Natl Cancer Inst Monogr.* 12:1-27.
- Prins, G.S., and O. Putz. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation.* 76:641-659.
- Pu, Y., L. Huang, L. Birch, and G.S. Prins. 2007. Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: Fgf10-dependent and -independent pathways. *Endocrinology.* 148:1697-1706.
- Qiu, Y., L. Ravi, and H.J. Kung. 1998. Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature.* 393:83-85.
- Radtke, S., H.M. Hermanns, C. Haan, H. Schmitz-Van De Leur, H. Gascan, P.C. Heinrich, and I. Behrmann. 2002. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J Biol Chem.* 277:11297-11305.
- Rahman, M., H. Miyamoto, and C.S. Chang. 2004. Androgen receptor coregulators in prostate cancer: Mechanisms and clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 10:2208-2219.
- Raman, R., G. Venkataraman, S. Ernst, V. Sasisekharan, and R. Sasisekharan. 2003. Structural specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2357-2362.
- Reebye, V., C.L. Bevan, M. Nohadani, A. Hajitou, N.A. Habib, and P.J. Mintz. 2010. Interaction between AR signalling and CRKL bypasses casodex inhibition in prostate cancer. *Cell Signal.* 22:1874-1881.
- Ren, Y., S. Meng, L. Mei, Z.J. Zhao, R. Jove, and J. Wu. 2004. Roles of Gab1 and SHP2 in paxillin tyrosine dephosphorylation and Src activation in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 279:8497-8505.
- Richardson, G.D., C.N. Robson, S.H. Lang, D.E. Neal, N.J. Maitland, and A.T. Collins. 2004. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* 117:3539-3545.
- Riese, D.J., 2nd, Y. Bermingham, T.M. van Raaij, S. Buckley, G.D. Plowman, and D.F. Stern. 1996. Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene.* 12:345-353.
- Rigby, A.C., C.W. Grant, and G.S. Shaw. 1998. Solution and solid state conformation of the human EGF receptor transmembrane region. *Biochim Biophys Acta.* 1371:241-253.
- Rinaldo, F., J. Li, E. Wang, M. Muders, and K. Datta. 2007. RalA regulates vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) synthesis in prostate cancer cells during androgen ablation. *Oncogene.* 26:1731-1738.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386:671-674.
- Risbridger, G.P., G.A. Almahbobi, and R.A. Taylor. 2005. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res.* 322:173-181.
- Roberts, A.B., M.B. Sporn, R.K. Assoian, J.M. Smith, N.S. Roche, L.M. Wakefield, U.I. Heine, L.A. Liotta, V. Falanga, J.H. Kehrl, and et al. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4167-4171.
- Robinson, E.J., D.E. Neal, and A.T. Collins. 1998. Basal cells are progenitors of luminal cells in primary cultures of differentiating human prostatic epithelium. *Prostate.* 37:149-160.
- Rochette-Egly, C. 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.* 15:355-366.
- Roepstorff, K., M.V. Grandal, L. Henriksen, S.L. Knudsen, M. Lerdrup, L. Grovdal, B.M. Willumsen, and B. van Deurs. 2009. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic.* 10:1115-1127.
- Rosini, P., L. Bonaccorsi, E. Baldi, C. Chiasserini, G. Forti, G. De Chiara, M. Lucibello, M. Mongiat, R.V. Iozzo, E. Garaci, F. Cozzolino, and M.G. Torcia. 2002. Androgen receptor expression induces



- FGF2, FGF-binding protein production, and FGF2 release in prostate carcinoma cells: role of FGF2 in growth, survival, and androgen receptor down-modulation. *Prostate*. 53:310-321.
- Rui, L., M. Yuan, D. Frantz, S. Shoelson, and M.F. White. 2002. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem*. 277:42394-42398.
- Rumpold, H., E. Heinrich, G. Untergasser, M. Hermann, G. Pfister, E. Plas, and P. Berger. 2002. Neuroendocrine differentiation of human prostatic primary epithelial cells in vitro. *Prostate*. 53:101-108.
- Sack, J.S., K.F. Kish, C. Wang, R.M. Attar, S.E. Kiefer, Y. An, G.Y. Wu, J.E. Scheffler, M.E. Salvati, S.R. Krystek, Jr., R. Weinmann, and H.M. Einspahr. 2001. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:4904-4909.
- Saikali, Z., H. Setya, G. Singh, and S. Persad. 2008. Role of IGF-1/IGF-1R in regulation of invasion in DU145 prostate cancer cells. *Cancer Cell Int*. 8:10.
- Saito, Y., J. Haendeler, Y. Hojo, K. Yamamoto, and B.C. Berk. 2001. Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol*. 21:6387-6394.
- Salomon, D.S., R. Brandt, F. Ciardiello, and N. Normanno. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 19:183-232.
- Saric, T., and S.A. Shain. 1998. Androgen regulation of prostate cancer cell FGF-1, FGF-2, and FGF-8: preferential down-regulation of FGF-2 transcripts. *Growth Factors*. 16:69-87.
- Savage, C.R., Jr., T. Inagami, and S. Cohen. 1972. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 247:7612-7621.
- Schaeper, U., N.H. Gehring, K.P. Fuchs, M. Sachs, B. Kempkes, and W. Birchmeier. 2000. Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol*. 149:1419-1432.
- Schalken, J.A., and G. van Leenders. 2003. Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology*. 62:11-20.
- Schaper, F., C. Gendo, M. Eck, J. Schmitz, C. Grimm, D. Anhuf, I.M. Kerr, and P.C. Heinrich. 1998. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J*. 335 ( Pt 3):557-565.
- Schaufele, F., X. Carbonell, M. Guerbado, S. Borngraeber, M.S. Chapman, A.A. Ma, J.N. Miner, and M.I. Diamond. 2005. The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:9802-9807.
- Scheid, M.P., and J.R. Woodgett. 2001. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:760-768.
- Schiemann, W.P., J.L. Bartoe, and N.M. Nathanson. 1997. Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J Biol Chem*. 272:16631-16636.
- Schlessinger, J. 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*. 306:1506-1507.
- Schmitz, J., M. Weissenbach, S. Haan, P.C. Heinrich, and F. Schaper. 2000. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem*. 275:12848-12856.
- Schuur, E.R., G.A. Henderson, L.A. Kmetec, J.D. Miller, H.G. Lamparski, and D.R. Henderson. 1996. Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *J Biol Chem*. 271:7043-7051.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*. 17:7-30.
- Shah, B.H., and K.J. Catt. 2004. Matrix metalloproteinases in reproductive endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*. 15:47-49.

- Shatkina, L., S. Mink, H. Rogatsch, H. Klocker, G. Langer, A. Nestl, and A.C. Cato. 2003. The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH<sub>2</sub>-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol.* 23:7189-7197.
- Sheflin, L., B. Keegan, W. Zhang, and S.W. Spaulding. 2000. Inhibiting proteasomes in human HepG2 and LNCaP cells increases endogenous androgen receptor levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 276:144-150.
- Shi, X., J. Gipp, and W. Bushman. 2007. Anchorage-independent culture maintains prostate stem cells. *Dev Biol.* 312:396-406.
- Shing, Y., G. Christofori, D. Hanahan, Y. Ono, R. Sasada, K. Igarashi, and J. Folkman. 1993. Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science.* 259:1604-1607.
- Shuai, K., C.M. Horvath, L.H. Huang, S.A. Qureshi, D. Cowburn, and J.E. Darnell, Jr. 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell.* 76:821-828.
- Shuai, K., G.R. Stark, I.M. Kerr, and J.E. Darnell, Jr. 1993. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science.* 261:1744-1746.
- Siegal, C.B., G. Schwab, R.P. Nordan, D.J. FitzGerald, and I. Pastan. 1990. Expression of the interleukin 6 receptor and interleukin 6 in prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 50:7786-7788.
- Siegsmond, M.J., H. Yamazaki, and I. Pastan. 1994. Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia. *J Urol.* 151:1396-1399.
- Signoretti, S., D. Waltregny, J. Dilks, B. Isaac, D. Lin, L. Garraway, A. Yang, R. Montironi, F. McKeon, and M. Loda. 2000. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol.* 157:1769-1775.
- Small, E.J., and S. Srinivas. 1995. The antiandrogen withdrawal syndrome. Experience in a large cohort of unselected patients with advanced prostate cancer. *Cancer.* 76:1428-1434.
- Somers, W., M. Stahl, and J.S. Seehra. 1997. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.* 16:989-997.
- Song, J., M. Takeda, and R.I. Morimoto. 2001. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol.* 3:276-282.
- Song, K., H. Wang, T.L. Krebs, S.J. Kim, and D. Danielpour. 2008. Androgenic control of transforming growth factor-beta signaling in prostate epithelial cells through transcriptional suppression of transforming growth factor-beta receptor II. *Cancer Res.* 68:8173-8182.
- Sorkin, A., and L.K. Goh. 2009. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res.* 315:683-696.
- Spiotto, M.T., and T.D. Chung. 2000. STAT3 mediates IL-6-induced growth inhibition in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate.* 42:88-98.
- Stahl, N., T.J. Farruggella, T.G. Boulton, Z. Zhong, J.E. Darnell, Jr., and G.D. Yancopoulos. 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science.* 267:1349-1353.
- Stamos, J., M.X. Sliwkowski, and C. Eigenbrot. 2002. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem.* 277:46265-46272.
- Starr, R., T.A. Willson, E.M. Viney, L.J. Murray, J.R. Rayner, B.J. Jenkins, T.J. Gonda, W.S. Alexander, D. Metcalf, N.A. Nicola, and D.J. Hilton. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature.* 387:917-921.
- Steiner, H., A.P. Berger, S. Godoy-Tundidor, A. Bjartell, H. Lilja, G. Bartsch, A. Hobisch, and Z. Culig. 2004. An autocrine loop for vascular endothelial growth factor is established in prostate cancer cells generated after prolonged treatment with interleukin 6. *Eur J Cancer.* 40:1066-1072.

- Stokoe, D., L.R. Stephens, T. Copeland, P.R. Gaffney, C.B. Reese, G.F. Painter, A.B. Holmes, F. McCormick, and P.T. Hawkins. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 277:567-570.
- Story, M.T., K.A. Hopp, and D.A. Meier. 1996. Regulation of basic fibroblast growth factor expression by transforming growth factor beta in cultured human prostate stromal cells. *Prostate*. 28:219-226.
- Stratton, M.S., H. Sirvent, T.S. Udayakumar, R.B. Nagle, and G.T. Bowden. 2001. Expression of the matrix metalloproteinase promatrilysin in coculture of prostate carcinoma cell lines. *Prostate*. 48:206-209.
- Sugimoto, S., T.J. Wandless, S.E. Shoelson, B.G. Neel, and C.T. Walsh. 1994. Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem*. 269:13614-13622.
- Sugimura, Y., G.R. Cunha, and A.A. Donjacour. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod*. 34:961-971.
- Summy, J.M., and G.E. Gallick. 2006. Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res*. 12:1398-1401.
- Suzuki, H., T. Ueda, T. Ichikawa, and H. Ito. 2003. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 10:209-216.
- Takahashi-Tezuka, M., Y. Yoshida, T. Fukada, T. Ohtani, Y. Yamanaka, K. Nishida, K. Nakajima, M. Hibi, and T. Hirano. 1998. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. 18:4109-4117.
- Takeda, H., T. Nakamoto, J. Kokontis, G.W. Chodak, and C. Chang. 1991. Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 177:488-496.
- Tanji, N., M. Tsuji, N. Terada, M. Takeuchi, and G.R. Cunha. 1994. Inhibitory effects of transforming growth factor-beta 1 on androgen-induced development of neonatal mouse seminal vesicles in vitro. *Endocrinology*. 134:1155-1162.
- Taplin, M.E., and S.P. Balk. 2004. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem*. 91:483-490.
- Taplin, M.E., G.J. Bubley, T.D. Shuster, M.E. Frantz, A.E. Spooner, G.K. Ogata, H.N. Keer, and S.P. Balk. 1995. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*. 332:1393-1398.
- Taylor, R.A., R. Toivanen, and G.P. Risbridger. 2010. Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem. *Endocr Relat Cancer*. 17:R273-285.
- Thomson, A.A., and G.R. Cunha. 1999. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development*. 126:3693-3701.
- Tice, D.A., J.S. Biscardi, A.L. Nickles, and S.J. Parsons. 1999. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:1415-1420.
- Tilley, W.D., G. Buchanan, T.E. Hickey, and J.M. Bentel. 1996. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res*. 2:277-285.
- Timme, T.L., L.D. Truong, V.W. Merz, T. Krebs, D. Kadmon, K.C. Flanders, S.H. Park, and T.C. Thompson. 1994. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor-beta expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*. 134:1039-1045.
- Timme, T.L., L.D. Truong, K.M. Slawin, D. Kadmon, S.H. Park, and T.C. Thompson. 1995. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor-beta 1 expression during normal and abnormal prostatic growth. *Microsc Res Tech*. 30:333-341.
- Timmermann, A., S. Pflanz, J. Grotzinger, A. Kuster, I. Kurth, V. Pitard, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2000. Different epitopes are required for gp130 activation by interleukin-6, oncostatin M and leukemia inhibitory factor. *FEBS Lett*. 468:120-124.
- Timms, B.G. 2008. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*. 76:565-577.

- Timms, B.G., T.J. Mohs, and L.J. Didio. 1994. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J Urol.* 151:1427-1432.
- Tomlinson, D.C., S.H. Freestone, O.C. Grace, and A.A. Thomson. 2004. Differential effects of transforming growth factor-beta1 on cellular proliferation in the developing prostate. *Endocrinology.* 145:4292-4300.
- Torring, N., F. Dagnaes-Hansen, B.S. Sorensen, E. Nexø, and N.E. Hynes. 2003. ErbB1 and prostate cancer: ErbB1 activity is essential for androgen-induced proliferation and protection from the apoptotic effects of LY294002. *Prostate.* 56:142-149.
- Torring, N., L.V. Jensen, J.G. Wen, F.B. Sorensen, J.C. Djurhuus, and E. Nexø. 2001. Chronic treatment with epidermal growth factor induces growth of the rat ventral prostate. *Scand J Urol Nephrol.* 35:339-344.
- Torring, N., P.E. Jorgensen, B.S. Sorensen, and E. Nexø. 2000. Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Res.* 20:91-95.
- Tsujimura, A., Y. Koikawa, S. Salm, T. Takao, S. Coetzee, D. Moscatelli, E. Shapiro, H. Lepor, T.T. Sun, and E.L. Wilson. 2002. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *J Cell Biol.* 157:1257-1265.
- Twillie, D.A., M.A. Eisenberger, M.A. Carducci, W.S. Hsieh, W.Y. Kim, and J.W. Simons. 1995. Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology.* 45:542-549.
- Tzahar, E., G. Levkowitz, D. Karunakaran, L. Yi, E. Peles, S. Lavi, D. Chang, N. Liu, A. Yayon, D. Wen, and et al. 1994. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hereregulin isoforms. *J Biol Chem.* 269:25226-25233.
- Uematsu, F., M. Kan, F. Wang, J.H. Jang, Y. Luo, and W.L. McKeehan. 2000. Ligand binding properties of binary complexes of heparin and immunoglobulin-like modules of FGF receptor 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 272:830-836.
- Ullrich, A., L. Coussens, J.S. Hayflick, T.J. Dull, A. Gray, A.W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T.A. Libermann, J. Schlessinger, and et al. 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* 309:418-425.
- Umesono, K., and R.M. Evans. 1989. DETERMINANTS OF TARGET GENE SPECIFICITY FOR STEROID THYROID-HORMONE RECEPTORS. *Cell.* 57:1139-1146.
- Ungureanu, D., P. Saharinen, I. Junttila, D.J. Hilton, and O. Silvennoinen. 2002. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol.* 22:3316-3326.
- Valdez, B.C., D. Henning, L. Perlaky, R.K. Busch, and H. Busch. 1997. Cloning and characterization of Gu/RH-II binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 234:335-340.
- van Leenders, G., H. Dijkman, C. Hulsbergen-van de Kaa, D. Ruiters, and J. Schalken. 2000. Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Lab Invest.* 80:1251-1258.
- van Leenders, G.J., W.R. Gage, J.L. Hicks, B. van Balken, T.W. Aalders, J.A. Schalken, and A.M. De Marzo. 2003. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol.* 162:1529-1537.
- Vander Griend, D.J., W.L. Karthaus, S. Dalrymple, A. Meeker, A.M. DeMarzo, and J.T. Isaacs. 2008. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer Res.* 68:9703-9711.
- Varghese, J.N., R.L. Moritz, M.Z. Lou, A. Van Donkelaar, H. Ji, N. Ivancic, K.M. Branson, N.E. Hall, and R.J. Simpson. 2002. Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15959-15964.
- Veldscholte, J., C.A. Berrevoets, C. Ris-Stalpers, G.G. Kuiper, G. Jenster, J. Trapman, A.O. Brinkmann, and E. Mulder. 1992a. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand

- binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 41:665-669.
- Veldscholte, J., C.A. Berrevoets, N.D. Zegers, T.H. van der Kwast, J.A. Grootegoed, and E. Mulder. 1992b. Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry.* 31:7422-7430.
- Verras, M., J. Lee, H. Xue, T.H. Li, Y. Wang, and Z. Sun. 2007. The androgen receptor negatively regulates the expression of c-Met: implications for a novel mechanism of prostate cancer progression. *Cancer Res.* 67:967-975.
- Vinkemeier, U., I. Moarefi, J.E. Darnell, Jr., and J. Kuriyan. 1998. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science.* 279:1048-1052.
- Visakorpi, T., E. Hyytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. Keinänen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola, and O.P. Kallioniemi. 1995. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 9:401-406.
- Vivanco, I., and C.L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2:489-501.
- Walker, F., and A.W. Burgess. 1991. Reconstitution of the high affinity epidermal growth factor receptor on cell-free membranes after transmodulation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 266:2746-2752.
- Wallner, L., J. Dai, J. Escara-Wilke, J. Zhang, Z. Yao, Y. Lu, M. Trikha, J.A. Nemeth, M.H. Zaki, and E.T. Keller. 2006. Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchiectomized mice. *Cancer Res.* 66:3087-3095.
- Wang, F., K. McKeegan, C. Yu, and W.L. McKeegan. 2002a. Fibroblast growth factor receptor 1 phosphotyrosine 766: molecular target for prevention of progression of prostate tumors to malignancy. *Cancer Res.* 62:1898-1903.
- Wang, H., K. Song, T.L. Sponseller, and D. Danielpour. 2005. Novel function of androgen receptor-associated protein 55/Hic-5 as a negative regulator of Smad3 signaling. *J Biol Chem.* 280:5154-5162.
- Wang, X., Y. Yang, X. Guo, E.R. Sampson, C.L. Hsu, M.Y. Tsai, S. Yeh, G. Wu, Y. Guo, and C. Chang. 2002b. Suppression of androgen receptor transactivation by Pyk2 via interaction and phosphorylation of the ARA55 coregulator. *J Biol Chem.* 277:15426-15431.
- Wang, Y., S. Hayward, M. Cao, K. Thayer, and G. Cunha. 2001. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation.* 68:270-279.
- Wartmann, M., and R.J. Davis. 1994. The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem.* 269:6695-6701.
- Watabe, T., M. Lin, H. Ide, A.A. Donjacour, G.R. Cunha, O.N. Witte, and R.E. Reiter. 2002. Growth, regeneration, and tumorigenesis of the prostate activates the PSCA promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:401-406.
- Watt, F., A. Martorana, D.E. Brookes, T. Ho, E. Kingsley, D.S. O'Keefe, P.J. Russell, W.D. Heston, and P.L. Molloy. 2001. A tissue-specific enhancer of the prostate-specific membrane antigen gene, FOLH1. *Genomics.* 73:243-254.
- Webber, M.M., D. Bello, and S. Quader. 1997. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate.* 30:58-64.
- Webber, M.M., S.T. Quader, H.K. Kleinman, D. Bello-DeOcampo, P.D. Storto, G. Bice, W. DeMendonca-Calaca, and D.E. Williams. 2001. Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression. *Prostate.* 47:1-13.
- Wen, Y., M.C. Hu, K. Makino, B. Spohn, G. Bartholomeusz, D.H. Yan, and M.C. Hung. 2000. HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res.* 60:6841-6845.



- Werry, T.D., P.M. Sexton, and A. Christopoulos. 2005. "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends Endocrinol Metab.* 16:26-33.
- Whitaker, H.C., S. Hanrahan, N. Totty, S.C. Gamble, J. Waxman, A.C. Cato, H.C. Hurst, and C.L. Bevan. 2004. Androgen receptor is targeted to distinct subcellular compartments in response to different therapeutic antiandrogens. *Clin Cancer Res.* 10:7392-7401.
- Wieduwilt, M.J., and M.M. Moasser. 2008. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 65:1566-1584.
- Wolk, A., C.S. Mantzoros, S.O. Andersson, R. Bergstrom, L.B. Signorello, P. Lagiou, H.O. Adami, and D. Trichopoulos. 1998. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 90:911-915.
- Wu, J.D., K. Haugk, L. Woodke, P. Nelson, I. Coleman, and S.R. Plymate. 2006. Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. *J Cell Biochem.* 99:392-401.
- Wu, X., C. Jin, F. Wang, C. Yu, and W.L. McKeehan. 2003. Stromal cell heterogeneity in fibroblast growth factor-mediated stromal-epithelial cell cross-talk in premalignant prostate tumors. *Cancer Res.* 63:4936-4944.
- Xin, L., R.U. Lukacs, D.A. Lawson, D. Cheng, and O.N. Witte. 2007. Self-renewal and multilineage differentiation in vitro from murine prostate stem cells. *Stem Cells.* 25:2760-2769.
- Xu, G.Y., H.A. Yu, J. Hong, M. Stahl, T. McDonagh, L.E. Kay, and D.A. Cumming. 1997. Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J Mol Biol.* 268:468-481.
- Yamabhai, M., and R.G. Anderson. 2002. Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem.* 277:24843-24846.
- Yamamoto, T., H. Hihara, T. Nishida, S. Kawai, and K. Toyoshima. 1983. A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. *Cell.* 34:225-232.
- Yamauchi, T., K. Ueki, K. Tobe, H. Tamemoto, N. Sekine, M. Wada, M. Honjo, M. Takahashi, T. Takahashi, H. Hirai, T. Tushima, Y. Akanuma, T. Fujita, I. Komuro, Y. Yazaki, and T. Kadowaki. 1997. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature.* 390:91-96.
- Yan, G., Y. Fukabori, G. McBride, S. Nikolaropolous, and W.L. McKeehan. 1993. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol.* 13:4513-4522.
- Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh. 2003. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene.* 320:3-21.
- Yarden, Y., and M.X. Sliwkowski. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:127-137.
- Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J.N. Ihle, and A. Yoshimura. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* 18:1309-1320.
- Yawata, H., K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J.* 12:1705-1712.
- Yeaman, T.J. 2004. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer.* 4:470-480.
- Yeh, S., H.K. Lin, H.Y. Kang, T.H. Thin, M.F. Lin, and C. Chang. 1999. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5458-5463.
- Yoon, S., and R. Seger. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 24:21-44.

- York, T.P., S.R. Plymate, P.S. Nelson, L.J. Eaves, H.D. Webb, and J.L. Ware. 2005. cDNA microarray analysis identifies genes induced in common by peptide growth factors and androgen in human prostate epithelial cells. *Mol Carcinog.* 44:242-251.
- Yu, H., and R. Jove. 2004. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* 4:97-105.
- Yu, J., C. Wjasow, and J.M. Backer. 1998a. Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem.* 273:30199-30203.
- Yu, J., Y. Zhang, J. McIlroy, T. Rordorf-Nikolic, G.A. Orr, and J.M. Backer. 1998b. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol.* 18:1379-1387.
- Yu, X., K.D. Sharma, T. Takahashi, R. Iwamoto, and E. Mekada. 2002. Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell.* 13:2547-2557.
- Zarling, J.M., M. Shoyab, H. Marquardt, M.B. Hanson, M.N. Lioubin, and G.J. Todaro. 1986. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:9739-9743.
- Zelivianski, S., T. Igawa, S. Lim, R. Taylor, and M.F. Lin. 2002. Identification and characterization of regulatory elements of the human prostatic acid phosphatase promoter. *Oncogene.* 21:3696-3705.
- Zellweger, T., C. Ninck, M. Bloch, M. Mirlacher, P.A. Koivisto, H.J. Helin, M.J. Mihatsch, T.C. Gasser, and L. Bubendorf. 2005. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer.* 113:619-628.
- Zerbini, L.F., Y. Wang, J.Y. Cho, and T.A. Libermann. 2003. Constitutive activation of nuclear factor kappaB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 63:2206-2215.
- Zhang, F., J. Lee, S. Lu, C.A. Pettaway, and Z. Dong. 2005. Blockade of transforming growth factor-beta signaling suppresses progression of androgen-independent human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res.* 11:4512-4520.
- Zhang, H., A. Berezov, Q. Wang, G. Zhang, J. Drebin, R. Murali, and M.I. Greene. 2007. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* 117:2051-2058.
- Zhang, J.G., A. Farley, S.E. Nicholson, T.A. Willson, L.M. Zugaro, R.J. Simpson, R.L. Moritz, D. Cary, R. Richardson, G. Hausmann, B.J. Kile, S.B. Kent, W.S. Alexander, D. Metcalf, D.J. Hilton, N.A. Nicola, and M. Baca. 1999. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2071-2076.
- Zhang, Q., S.M. Thomas, V.W. Lui, S. Xi, J.M. Siegfried, H. Fan, T.E. Smithgall, G.B. Mills, and J.R. Grandis. 2006a. Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:6901-6906.
- Zhang, X., J. Gureasko, K. Shen, P.A. Cole, and J. Kuriyan. 2006b. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 125:1137-1149.
- Zhao, H., H. Shiina, K.L. Greene, L.C. Li, Y. Tanaka, H. Kishi, M. Igawa, C.J. Kane, P. Carroll, and R. Dahiya. 2005. CpG methylation at promoter site -140 inactivates TGFbeta2 receptor gene in prostate cancer. *Cancer.* 104:44-52.
- Zhao, X.Y., B. Boyle, A.V. Krishnan, N.M. Navone, D.M. Peehl, and D. Feldman. 1999. Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol.* 162:2192-2199.
- Zhao, X.Y., P.J. Malloy, A.V. Krishnan, S. Swami, N.M. Navone, D.M. Peehl, and D. Feldman. 2000. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med.* 6:703-706.



- Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 264:95-98.
- Zhou, B.P., M.C. Hu, S.A. Miller, Z. Yu, W. Xia, S.Y. Lin, and M.C. Hung. 2000. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*. 275:8027-8031.
- Zhou, Z.X., M. Sar, J.A. Simental, M.V. Lane, and E.M. Wilson. 1994. LIGAND-DEPENDENT BIPARTITE NUCLEAR TARGETING SIGNAL IN THE HUMAN ANDROGEN RECEPTOR - REQUIREMENT FOR THE DNA-BINDING DOMAIN AND MODULATION BY NH2-TERMINAL AND CARBOXYL-TERMINAL SEQUENCES. *J. Biol. Chem*. 269:13115-13123.
- Zhu, B., K. Fukada, H. Zhu, and N. Kyprianou. 2006. Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor beta signaling in human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 66:8640-8647.
- Zhu, B., and N. Kyprianou. 2005. Transforming growth factor beta and prostate cancer. *Cancer Treat Res*. 126:157-173.
- Zhu, M.L., and N. Kyprianou. 2008. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 15:841-849.
- Zhu, M.L., J.V. Partin, E.M. Bruckheimer, S.E. Strup, and N. Kyprianou. 2008. TGF-beta signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer cells. *Prostate*. 68:287-295.

DISCIPLINE : Biologie Cellulaire et Moléculaire

**TITRE : La Voie ERK1/2 : Point d'intégration et de convergence des connexions entre voies de signalisation dans les cellules épithéliales de prostate normale**

RESUME : Le développement et l'homéostasie cellulaire de la prostate impliquent le contrôle strict des voies de signalisation induites par les androgènes et les facteurs de croissance. Ces voies sont altérées dans le cancer de la prostate. La lignée RWPE-1, immortalisée à partir de l'épithélium de prostate humaine, a été utilisée pour étudier certains signaux régulant la prolifération cellulaire et les connexions entre les voies de signalisation correspondantes. La prolifération des cellules RWPE-1 en réponse à l'EGF est strictement dépendante de la voie ERK1/2. L'inhibition du récepteur aux androgènes (RA) a permis de montrer le rôle essentiel qu'il joue dans l'activation d'ERK1/2 en réponse à l'EGF. Le RA s'associe avec plusieurs molécules de signalisation dans les cellules RWPE-1, notamment avec la kinase Raf-1, activatrice de la voie ERK1/2. Ainsi, le RA contrôlerait directement un processus essentiel à la prolifération épithéliale selon un mode d'action non-génomique. Par ailleurs, la réponse proliférative des cellules RWPE-1 à l'IL-6 requiert l'activation de la voie ERK1/2, et l'activité kinase du récepteur à l'EGF (EGF-R), suggérant sa transactivation par l'IL-6. L'activation de protéines ADAM (a disintegrin and metalloprotease), notamment ADAM17, par l'IL-6 conduirait au clivage d'un ligand membranaire de l'EGF-R, aboutissant à l'activation de la voie ERK1/2. Ce nouveau mécanisme pourrait être impliqué dans les situations inflammatoires conduisant à une prolifération excessive de l'épithélium prostatique, prélude à la transformation tumorale. En conclusion, les voies de signalisation étudiées sont fortement connectées dans les cellules épithéliales normales.

MOTS-CLES : Cellules épithéliales de prostate normale, Prolifération, Voie ERK1/2, Récepteur aux androgènes, Signalisation non-génomique, Interleukine-6, Récepteur à l'EGF, Transactivation.

---

DISCIPLINE : Cellular and Molecular Biology

**TITLE : ERK1/2 pathway : an integrating node of converging signaling pathways in normal prostate epithelial cells.**

ABSTRACT : Prostate development and homeostasis involve strict control of androgen and growth factors induced signaling pathways. These signaling pathways are deeply altered in prostate cancer. The RWPE-1 immortalized cell line derived from human prostate epithelium has been used to study the signaling pathways regulating cell proliferation and their crosstalk. EGF-dependent RWPE-1 cell proliferation rely strictly on the ERK1/2 pathway. Specific inhibitors showed essential role of androgen receptor (AR) in EGF mediated ERK1/2 activation. AR is associated with several signaling molecules in RWPE-1 cells. I show for the first time the physical interaction between AR and the ERK1/2 activating kinase Raf1. Then, AR could directly regulate an essential pathway for epithelial cells proliferation through a non-genomic mechanism. In addition, I showed that IL-6 induced proliferation requires both ERK1/2 and EGF-R kinase activities, suggesting an IL-6 mediated transactivation of EGF-R. By using several inhibitors, I showed that ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family, especially ADAM17, are involved in this process. IL-6-mediated ADAM proteins activation could lead to the cleavage of a membrane bound EGF-R ligand, leading to ERK1/2 pathway activation. This new mechanism could be involved in the inflammatory situations inducing hyperproliferation of the prostate epithelium, the first step of transformation process. To conclude, the signaling pathways I studied are strongly connected in normal epithelial cells. The two new mechanisms described in this study lead to ERK1/2 kinases activation, an integrating node of signaling pathways in normal prostate epithelial cells.

KEYWORDS : Normal prostate epithelial cells, Proliferation, ERK1/2 Pathway, Androgen Receptor, Non genomic signaling, Interleukin-6, EGF Receptor, Transactivation.