



Importance de la co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR dans la transformation épithéliale prostatique. Approche in vivo à l'aide d'un modèle dans les glandes accessoires de la Drosophile

Amandine Rambur

► To cite this version:

Amandine Rambur. Importance de la co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR dans la transformation épithéliale prostatique. Approche in vivo à l'aide d'un modèle dans les glandes accessoires de la Drosophile. Cancer. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC088 . tel-02448774

HAL Id: tel-02448774

<https://theses.hal.science/tel-02448774>

Submitted on 22 Jan 2020

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.

*Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la
Santé – Agronomie – Environnement*

THESE

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologies, Nutrition, Microbiologie Santé, Innovation

Soutenue publiquement par

Amandine Rambur

Le 28 Novembre 2018

Importance de la co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR dans la transformation épithéliale prostatique. Approche *in vivo* à l'aide d'un modèle dans les glandes accessoires de la Drosophile.

<u>Rapporteurs :</u>	Dr. Florence Ruggiero	CNRS UMR5242, IGFL, Lyon
	Dr. Martine Duterque- Coquillaud	CNRS UMR8161, IBL, Lille
	Dr. Romain Levayer	Institut Pasteur, Paris
<u>Directeur de thèse :</u>	Pr. Laurent Morel	CNRS UMR 6293 ISERM, U1103, Clermont Ferrand
<u>Membre invité :</u>	Dr. Cyrille de Jossineau	CNRS UMR 6293 ISERM, U1103, Clermont Ferrand

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble de mon jury de thèse : le Dr. Florence Ruggiero, le Dr. Martine Duterque, et le Dr. Romain Levayer pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Laurent, merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse durant ces 3 années. Tes conseils et encouragements tout au long de ma thèse m'ont permis de progresser aussi bien pour l'écriture que pour les présentations orales. Merci de n'avoir jamais douté de mes capacités à mener à bien cette thèse (et également à réaliser des grilles de mots croisés), et de m'avoir encouragé à pousser la réflexion toujours plus loin. Ton immense patience, ton écoute et tous ces échanges ont été un réel soutien et je t'en remercie.

Cyrille, je te remercie de m'avoir fait confiance dès le Master et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse sur ce sujet qui, dès l'arrivée de la liste des stages en Master 1 m'avait « tapé dans l'œil ». Tu m'as fait découvrir le monde « drosophiliste » qui m'étais jusqu'alors totalement inconnu, et qui offre énormément d'opportunités. Merci de ton aide pour la réalisation du projet, les manips et l'écriture de la thèse. La réalisation de cette thèse n'aura pas toujours été simple mais les résultats qui en ressortent sont vraiment encourageant et je suis sûre que le modèle de « prostate de mouche » a encore de beaux jours devant lui....

Silvère, dès la réalisation des mini-projet en Master avec la « dream team AQP8 », j'ai détecté ta bonne humeur et ton goût pour toutes sortes d'expressions. Cela m'aura bien aidée à tenir bon jusqu'au dernier jour d'écriture de ce manuscrit et à ne pas rester dans un coin à « peigner la girafe ». Merci de toujours repousser la discussion scientifique un peu plus loin, et merci également de m'avoir poussé à me surpasser en pâtisserie !!

Jean-Marc, merci d'être toujours présent avec ta bonne humeur et tes blagues, dans les bons mais aussi dans les moments plus compliqués. Ça aura commencé dès le master avec mon « beug informatique » à la veille du concours de l'école doctorale jusqu'au soucis de références pour la fameuse revue que tu as su gérer comme un chef !!!

Irina et Julie, votre passage au labo, bien que bref, aura apporté beaucoup de bonne humeur. Merci pour les discussions qu'on a pu avoir et les moments de rigolade. J'espère que vos projets aboutiront, vous le méritez !!!

Laura, la « réunification » du GReD m'as permis de faire vraiment ta connaissance. Merci pour tous les moments de rigolade qui ont permis de dédramatiser nombre de situations et pour tout le soutien que tu as pu m'apporter tout au long de cette dernière année de thèse !!! Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse et surtout prend bien soin de Gudule !!

Merci à tous les membres de l'équipe LXR présents ou passés qui par leur présence ont contribué à la réalisation de cette thèse dans de bonnes conditions : Amalia, Salwan, Sarah, Julio, Linda,...

De manière générale, merci aux « équipes du 3 » mais également à toutes les personnes présentes à la cuisine le midi et qui ont rendu ces pauses agréables. On se souviendra notamment du « concours de mots croisés ». Pas toujours facile à arbitrer...

Cyril, merci pour tout ton soutien pendant ma thèse. Merci aussi de m'avoir apporté ton soutien pour le projet « un lave-vaisselle au GReD », je compte sur toi pour le mener à bien ahah !! Je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites !!

Houda, passer l'étape de l'écriture du manuscrit ensemble aura été sympa et a permis de rendre ça moins pénible, merci pour ton soutien et bon courage pour la suite!!

Claude, merci pour ton aide dans ce projet à mon arrivée au laboratoire mais également lors de ma thèse et pour l'écriture du papier. Ton humour et toutes tes blagues lors des repas du midi mettent une sacrée ambiance !!!

Rachel, merci beaucoup pour ton soutien au cours de ma thèse. Je garde tous les précieux conseils que tu m'as donné pour la suite !! Et merci de ne pas m'avoir lynchée malgré les « petites » pauses. Et au fait on se le fait quand le mini-golf ?!

Corinne, merci de m'avoir assisté pour la réalisation du projet au début de ma thèse. Ta gentillesse et les discussions que nous avons pu avoir m'ont beaucoup apporté pendant le master puis pendant ma thèse.

Les « drosophilistes », merci pour votre accueil, particulièrement au début de ma thèse où vous n'avez pas hésité à me faire une petite place dans vos bureaux et sur vos paillasses pour me permettre de travailler dans de bonnes conditions.

Jean-Louis, ton départ en retraite a créé un vide dans la « pièce des mouches ». Je n'ai pas le souvenir d'une question à laquelle tu n'as pas pu me donner de réponse. Toutes les discussions et tes précieux conseils m'ont permis de gagner un temps précieux lors de la mise au point de mes dissections et je t'en remercie.

Vincent, je te remercie pour toutes les remarques pertinentes et conseils que tu as pu me donner tout au long de ma thèse et lors de mes différents comités qui m'ont aidé à aller au bout de ce travail.

Caroline, merci d'avoir été toujours très présente que ce soit pour apporter ton aide au moindre problème technique que j'ai eu ou simplement pour discuter de tout et de rien. Tous ces moments passés au labo et en dehors m'ont apporté beaucoup de réconfort à certains moments un peu compliqués et m'ont permis d'avancer plus sereinement dans la thèse.

Graziella, que de moments de rigolades en pièce des mouches. Merci pour tout ça. Merci pour toutes les petites anecdotes que tu as partagées notamment concernant tes enfants à l'école et qui m'auront bien amusé ! Et t'inquiète tes clonages vont finir par fonctionner !!!

Nathalie, merci pour tous les moments partagés notamment avant le déménagement du GReD, lorsqu'on était dans le même bureau. Merci de m'avoir apporté ton aide lors des problèmes que j'ai pu rencontrer tout au long de la thèse. Et surtout pour tous les moments passés à discuter, rigoler,... que ce soit au labo ou en dehors.

Pierre P., merci pour ton aide tout au long de ma thèse. Merci de ne pas t'être trop moqué lorsque je venais te voir pour te poser des questions « bêtes » au début de ma thèse (oui c'est pas toujours facile d'utiliser un ordinateur..). Merci pour tous les moments de grands débats et de rigolade lors des pauses au labo et aussi en dehors !!!

Merci à tous les membres du GReD que je n'ai pas forcément cité mais auxquels je pense forcément qui ont contribué à la réalisation de cette thèse !! MERCI !! Et bon courage pour les nouveaux stagiaires et thésards qui viennent d'arriver !!

Merci aussi à toutes les personnes en dehors du GReD, que ce soit lors de soirées ou d'entraînements, qui m'ont permis de penser à autre chose qu'à cette thèse durant ces 3 ans !

Monsieur Loizeau, merci de m'avoir apporté tout votre soutien à une période charnière de ma scolarité/vie. Vous avez largement contribué à la poursuite de mes études jusqu'à la réalisation de cette thèse ! Merci beaucoup !!!

Julien R., merci de m'avoir remise sur pied depuis le Master et tout au long de cette thèse et de l'avoir rendu moins douloureuse !!!

Manue, merci pour toutes les discussions, les conseils que tu m'as apportés, les fous rires, les débats que l'on a pu avoir. Finalement c'est une bonne chose que la dernière saison de GoT ne soit pas arrivée cette année parce que les matinées « débriefs et pronostics » m'auraient trop manquées !!!

Allison, ma jumelle, ça va être compliqué de faire court et concis... On en a partagé des choses : la licence, les mini-projet, les galères du Master avec la préparation du concours où on se disait que c'était impossible d'y arriver toutes les deux. Et pourtant on l'a fait !!! Et heureusement !! Je me demande ce que ça aurait donné si tu n'avais pas été là !! Tous ces fous rires, ces « petites pauses café » (encore désolée Rachel), ces débriefs,... Et encore dans la dernière ligne droite avec la rédaction de ce manuscrit ton soutien aura été plus que précieux.... Et c'est sans compter les soirées Just Dance, resto, ... Tu as su être là dans les meilleurs et les pires moments et pour tout ça je te remercie !!

Fabiana, tu es sans nul doute ma plus belle rencontre lors de cette thèse, un vrai coup de cœur amical. Et pourtant ça n'était pas gagné au départ !! Mais tous ces moments partagés au labo, la garde alternée de nos « BB » mouches et en dehors du labo avec nos desserts à deux cuillères, ces repas où on se fait un peu mettre dehors à force de trop parler, ce congrès à Grasse à chercher un endroit où se cacher pour ne pas faire nos présentations.... Tout ça restera gravé !! Merci !! Tu as toujours su être là pour moi dans les moments difficiles où j'avais juste besoin d'une oreille attentive. Depuis ton départ à Paris ce n'est vraiment plus pareil, heureusement que tu n'es pas partie loin !!

Fatiha, merci pour ta bonne humeur toujours sans faille et tous les moments de rigolade partagés lors de nos resto « décompression », mais aussi lors des soirées « just dance » ou Karaoké où je pense que des talents se sont révélés... Cette thèse aurait été encore meilleure si on avait pu reformer notre trio comme pour les mini projet !! Merci pour tout !!!

Mes sœurs, la team des « moches », vous dire merci est un très faible mot. Vous êtes tout pour moi, ma famille et aussi mes meilleures amies. Il est clair que sans vous arriver au bout de cette thèse aurait été très compliqué. Je n'ai pas toujours pu vous accorder tout le temps que j'aurais voulu mais vous avez toujours été là, sans m'en tenir rigueur ! Estelle, merci aussi pour ton aide « artistique » tout au long de la thèse ! Quand je vois ce que tu as réalisé cette année, de partir toute seule « avec ton sac à dos » au Canada, ça me rend fière !! et ça me donne du courage pour la suite ! Avec un peu de chance, notre prochaine soirée sœur se fera au Canada ☺. Ludivine, merci de t'être occupée de moi comme une grande sœur pendant toutes ces années. Je sais que je peux toujours compter sur toi, que ce soit pour discuter, aller nager, comme infirmière personnelle :D ou encore pour de la ronronthérapie. Merci vraiment pour tout !

Papa, Maman, il est clair que vous êtes la pierre angulaire de cette thèse. Vous n'avez jamais hésité à vous sacrifier pour nous permettre de nous épanouir. Vous avez été d'un soutien sans faille durant toute ma scolarité et pourtant ça n'aura pas été simple !! Vous avez su croire en moi quand tout le monde avait laissé tomber !! Vous m'avez encouragée, soutenue quoiqu'il arrive ! Cette thèse c'est avant tout la votre !! Merci pour tout !!

Vincent, depuis qu'on s'est rencontré on en a traversé des choses, des bonnes comme de très mauvaises. Tu as toujours su être là pour me soutenir même dans les moments difficiles où je t'ai parfois mené la vie dure (désolée..). Tu as toujours cru en moi pour la réalisation de cette thèse, et souvent plus que moi. Je ne t'ai pas toujours accordé tout le temps que j'aurais voulu et pourtant tu m'as toujours encouragée. Merci vraiment pour tout ça parce que je pense que pour mener à bien une thèse, se sentir épanoui et vivre dans un environnement serein est essentiel et tu y as très largement contribué.

Résumé

L'étude d'échantillons humains montre que les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR sont fréquemment activées de manière aberrante dans les tumeurs de la prostate, d'autant plus dans les phases de résistance aux traitements. Ces deux voies de signalisation sont sensibles aux facteurs de croissances et impliquées dans la régulation de processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la croissance ou encore la différenciation cellulaire. Ces données suggèrent qu'elles ont un rôle essentiel dans la tumorigenèse prostatique. Cependant, le rôle respectif de chacune de ces voies dans la carcinogenèse prostatique, particulièrement dans les phases précoces, n'est pas clairement établi. L'objectif de ma thèse est donc de définir le rôle possible de ces deux voies dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate, ainsi que les mécanismes impliqués dans leur co-dérégulation. Cette étude est réalisée dans un modèle *in vivo* alternatif, la drosophile, qui possèdent un équivalent fonctionnel de la prostate : les glandes accessoires. La première partie des travaux réalisés montre que seule la suractivation de la voie RAS/MAPK dans la glande accessoire conduit à un processus de tumorigenèse, avec la production de masses cellulaires récapitulant de nombreuses caractéristiques cancéreuses : croissance cellulaire et prolifération incontrôlée, expression de métalloprotéases, perte de l'expression de marqueurs épithéliaux et formation de nouvelles trachées. Cependant, les deux voies de signalisation sont nécessaires à la tumorigenèse, mais avec des rôles différents : la voie RAS/MAPK est activée précocement et est capable de recruter la voie PI3K/AKT/TOR grâce à la mise en place de deux boucles autocrines de régulation. La première dépend de spitz (dEGF) et du récepteur EGFR pour amplifier l'activation de la voie RAS/MAPK. La seconde dépend de l'activation d'ILP6 (dIGF1), produit suite à l'activation de la voie RAS/MAPK, et permet le recrutement de la voie PI3K/AKT/TOR par l'intermédiaire du récepteur à l'insuline InR. La deuxième partie des travaux réalisés montre que l'activation de la voie RAS/MAPK conduit à la production de MMP1 dans les cellules qui seront à l'origine des tumeurs avant leur extravasation hors de l'épithélium. Cette expression temporelle contrôlée correspond à une étape où une réorganisation du cytosquelette a lieu et où le microenvironnement est altéré. Ces données placent donc la dérégulation de la voie RAS/MAPK comme un événement précoce de la tumorigenèse prostatique, capable de recruter la voie PI3K/AKT/TOR et d'entraîner la production de MMP1, pour *in fine* conduire à l'extravasation des cellules et à la formation de tumeurs.

Abstract

Clinical studies have demonstrated that, in prostate cancer, RAS/MAPK and PI3K/AKT/TOR signaling pathways are often aberrantly co-activated in tumors, their activation levels increasing again in resistance phases. These pathways, that are regulated by growth factors, are implicated in fundamental cellular processes regulation such as proliferation, growth and cellular differentiation. These data suggest that they are likely implicated in prostate tumorigenesis. However, the relative implication of each of these two pathways during prostate tumorigenesis, especially during early phases, is not fully understood. Thus, the aim of my thesis is to define the possible implication of these pathways in prostate cancer initiation and progression and which molecular mechanisms are implicated in their co-deregulation. Therefore, we have developed an alternative *in vivo* model of prostate tumorigenesis in drosophila, where accessory glands are a functional equivalent of the human prostate. The first part of my work shows that only the hyperactivation of the RAS/MAPK pathway in accessory glands can promote tumorigenesis, with the formation of cell masses that recapitulate many cancer hallmarks including uncontrolled cell growth and proliferation, enhanced matrix metalloproteinases expression, loss of epithelial markers expression, neovascularization-like tracheogenesis. However, both pathways are necessary to tumorigenesis, even though they display different roles: the RAS/MAPK pathway is activated earlier and is able to recruit the PI3K/AKT/TOR pathway thanks to the formation of two feedback loops. The first depend on Spitz (dEGF) and EGFR receptor to amplify RAS/MAPK pathway activation. The second depends on ILP6 (dIGF1) activation, produced following RAS/MAPK pathway activation and allow PI3K/AKT/TOR pathway recruitment *via* insulin receptor InR. The second part of the work shows that RAS/MAPK pathway activation allows MMP1 production restricted to the cells that will be the origin of the tumors, before their actual extravasation. This temporally controlled step of MMP1 expression corresponds to a time window where the cells show strong cytoskeletal reorganization and where microenvironment is disturbed. These data place the RAS/MAPK pathway deregulation as an early event of prostate tumorigenesis, able to recruit the PI3K/AKT/TOR pathway and to induce MMP1 production to allow cell extravasation and tumor formation.

Abréviations

0-#

4E-BP1 : Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1

α2M : Alpha 2 Macroglobulin

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AKT/PKB : Protein Kinase B

APAF-1 : Apoptotic Protease activating Factor 1

AR : Androgen Receptor

ARN : Acide RiboNucléique

ATM/ATR : Ataxia Telangiectasia Mutated/ATM Rad3-related

ATP : Adénosine TriPhosphate

B

BAD : BCL-2 Associated Death promoter

BAX : BCL-2 associated X protein

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

BCL2 : B-Cell Lymphoma-2

BMK1 : Big MAP Kinase-1

BMP : Bone Morphogenic Protein

Btl : Breathless

C

CBL : Casitas B-lineage Lymphoma

CD : Cluster of Differenciation

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CK : CytoKératine

CKI : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor

CREB : Cyclin-AMP-Response Element Binding protein

CRPC : Castration Resistant Prostate Cancer

D

DEP1 : Density Enhanced Phosphatase 1

DEPTOR : DEP-domain-containing mTOR interacting protein

DES : Diéthylstilbestrol

DHH : Desert HedgeHog

DHT : Dihydrotestostérone

DIAP1 : Death-Associated Inhibitor of Apoptosis 1

dILP : drosophila Insulin Like Peptide

DSOR1 : Downstream of Raf1

DTT : Dithiothréitol

DUSP : Dual Specific Phosphatase

E

E2F : E2 Factor

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EHMT2 : Euchromatic Histone lysine N-Methyl Transferase 2

ELK1 : ETS domain containing protein

Elk1

EMT : Epithelial Mesenchymal Transition

eNOS : endothelial Nitric Oxide

Synthetase

ERG : ETS Related Gene

ERK : Extracellular Signal-Regulated

Kinase

ETS : E-Twenty Six

ETV : ETS-Translocation Variant

F

FBW8 : F-Box and WD Repeat Domain

Containing 8

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast Growth Factor

Receptor

FKBP12 : FK506-Binding Protein 12

FLI1 : Friend Leukemia Integration 1

FLP : Flippase

FOXO : Forkhead box subgroup “O”

FRT : FLP Recognition Target

G

GAB1 : Grb2-Associated Binding protein

1

GAP : GTPase Activating Protein

GDP : Guanosine Di-Phosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

Gli1/2/3 : Glioma-associated Oncogene

1/2/3

GPX2/3 : Glutathion Peroxidase 2/3

GRB2 : Growth Factor Receptor Bound

protein 2

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

GWAS : Genome Wide Association

H

HBP : Hyperplasie Bénigne de la Prostate

HER : Human Epidermal Growth Factor

Receptor

HES : Hairy and Enhancer of Split

HEY : HES-related with YRPW motif

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HGPIN : High Grade Prostatic

Intraepithelial Neoplasia

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HIFU : High Intensity Focused Ultrasound

HSP : Heat Shock Protein

I

IFI : Inducible Feedback Inhibitor

IGF : Insulin-like Growth Factor

IGFR : Insulin like Growth Factor

Receptor 1

IHH : Indian Hedgehog

IIS : Insulin/Insulin like growth factor

signaling

InR : Insulin Receptor

IRS : Insulin Receptor Substrate

J

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

K

KLKs : Kallikréines

KSR1 : Kinase Suppressor of RAS

L

LGPIN : Low Grade Prostatic
Intrepithelial Neoplasia

LH : Luteinizing Hormone

LHRH : Luteinizing Hormone Releasing
Hormone

LRIG-1 : Leucine Rich and
ImmunoGlobulin like domains protein 1

M

MAPK : Mitogen Activated Protein
Kinases

MDM2 : Double Minute-2 Murine

MEK : MAPK-ERK-Kinase

MKPs : MAPKs Phosphatases

mLST8 : mammalian Lethal with Sec13
protein 8

MMP : Métalloprotéase Matricielle

mSin1 : mammalian Stress-activated
Protein kinase Interacting protein

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

mTORC1/2 : mammalian Target of
Rapamycin Complexe 1/2

MYC : Myelocytose

N

NADH : Nicotidamide Adenine
Dinucleotide Hydrogen

NFκB : Nuclear Factor Kappa B

NICD : Notch Intracellular Domain

NKX3.1 : NK3 Homeobox 1

P

PB : Probasine

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDCD4 : Programmed Cell Death Protein
4

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDK1/2 : Phosphoinositide-Dependent
kinase 1/2

PDX : Patient-Derived Xenograft models

PH : Pleckstrin Homology

PHLPP1/2 : Pleckstrin Homology domain
Leucin-rich repeat Protein Phosphatases 1
and 2

PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase

PIA : Proliferative Inflammatory Atrophy

PIKK : Phosphatidyl Inositol Kinase
Related Kinase

PIN : Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PIP2 : Phosphatidyl Inositol Diphosphate

PIP3 : Phosphatidyl Inositol Triphosphate

PKB : Protein Kinase B

PKC : Protein Kinase C

PLCγ : Phospholipase Cγ

PP2A : Protein Phosphatase 2A

PRAS40 : Proline Rich Akt Substrate
40KDa

pRB : RetinoBlastoma gene product

PRD : Paired

PRDX : Peroxiredoxine

PSA : Prostate Specific Antigen
PSCA : Prostate Stem Cell Antigen
PTEN: Phosphatase and Tensin
homologue deleted on chromosom ten
PTC : Patched
PTP1B : Protein Tyrosine Phosphatase

R

Rag : Recombination-activating protein
RALT : Receptor Associated Late
Transducer
RAPTOR : Regulatory-associated protein
of mTOR
Rb : Retinoblastoma
RECK : Reversion inducing cysteine
protein with kazal motifs
Rheb : Ras homolog enriched in brain
RICTOR : Rapamycin-Insensitive
Companion of mTOR
ROS : Reactive Oxygen Species
RSK : Ribosomal S6 kinase

S

SCA1 : Stem Cell Antigen 1
SGK1 : Serum and Glucocorticoid-
induced protein kinase 1
SH2 : SRC homology 2
SHC : SRC homology collagen
SHH : Sonic Hedgehog
SKP2 : S-phase Kinase Associated Protein
SMAD : Suppressor of Mothers Against
Decapentaplegic
SMO : Smoothed

SNP : Single-Nucleotide Polymorphism
SOCS : Suppressor of Cytokine Signalling
SOS : Son of sevenless
SOX : SRY-related HMG box
SP : Sex peptide
SRC : SubRenal Capsule
SRC1 : Steroid Receptor Coactivator 1
STATS : Signal Transducers and Activators
of Transcription

T

TERC : Telomerase RNA Component
Tfm : Testicular feminization
TGF α : Transforming Growth Factor
alpha
TGF β : Transforming Growth Factor bêta
TGF β R : Transforming Growth Factor
bêta Receptor
TIMP : Tissue inhibitor of
metalloproteases
TMPRSS : Transmembrane protease
serine 2
TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha
TNM : Tumor, Node, Metastasis
TP53 : Tumor Protein 53
TSC1/2 : Tuberous Sclerosis Complex-1/2

U

UAS : Upstream Activator Sequence
UGE : UroGenital Epithelium
UGM : UroGenital Mesenchym
UGS : UroGenital Sinus

UTY : Ubiquitiously Transcribed

Tetratricopeptide Repeat containing Y-linked

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor

W

Wnt : Wingless Integrated

X

XRT : eXternal beam Radiation Therapy

Liste des figures

Figure 1 : Localisation et anatomie de la prostate humaine

Figure 2 : Localisation et anatomie de la prostate murine

Figure 3 : Développement du tractus génital masculin et de la prostate

Figure 4 : Importance du dialogue épithélium-mésenchyme et de la signalisation androgénique au cours du développement prostatique

Figure 5 : Le développement harmonieux de la prostate nécessite un dialogue réciproque entre l'épithélium et le mésenchyme

Figure 6 : Importance des ligands de signalisation sécrétés

Figure 7 : Importance des gènes homéotiques dans le développement de la prostate

Figure 8 : Structure de la prostate différenciée

Figure 9 : Le renouvellement des cellules épithéliales prostatiques dépend de cellules souches

Figure 10 : Incidence du cancer de la prostate

Figure 11 : Stades d'évolution du cancer de la prostate

Figure 12 : Coupes histologiques des différents stades du cancer de la prostate

Figure 13 : La classification TNM des cancers de la prostate

Figure 14 : Représentation schématisée de la gradation de Gleason

Figure 15 : Le cycle cellulaire

Figure 16 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cycline/CDK et les CKI

Figure 17 : Rôle de la protéine Rb dans le contrôle du cycle cellulaire

Figure 18 : Rôle de la protéine p53 dans le maintien de l'intégrité cellulaire

Figure 19 : Rôle de la protéine BCL2 dans la voie apoptotique intrinsèque

Figure 20 : La famille ErbB

Figure 21 : Mode d'activation des récepteurs tyrosine-kinase

Figure 22 : Régulation de l'activation du récepteur EGFR

Figure 23 : La superfamille des récepteurs à l'insuline

Figure 24 : La voie PI3K/AKT/mTOR

Figure 25 : Le complexe mTORC1

Figure 26 : Le complexe mTORC2

Figure 27 : Mécanismes de régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR

Figure 28 : La famille des protéines MAPKs

Figure 29 : La voie de signalisation Ras/MAPK

Figure 30 : Mécanismes de régulation de la voie Ras/MAPK

Figure 31 : Exemples de dialogues entre les voies Ras/MAPK et PI3K/AKT/mTOR

Figure 32 : La transition épithélium-mésenchyme

Figure 33 : L'angiogenèse

Figure 34 : Les modèles xénogreffes

Figure 35 : Cycle de développement de la drosophile

Figure 36 : Le système mosaïque Flippase/FRT

Figure 37 : Structure du tractus génital mâle et des glandes accessoires de la drosophile

Figure 38 : La structure de l'épithélium de la glande accessoire est similaire à l'acinus prostatique

Figure 39 : Les disques imaginaux, précurseurs des structures adultes

Figure 40 : La voie Ras/MAPK chez la drosophile

Figure 41 : La signalisation insulinique et la signalisation TOR chez la drosophile

Figure 42 : Boxplot de l'expression d'*egf* sur des échantillons humains de cancer de la prostate

Figure 43 : Boxplot de l'expression d'*igf* sur des échantillons humains de cancer de la prostate

Figure 44 : P-ERK est détectée au niveau de la carcinogenèse précoce dans le modèle murin PB-Cre4xPtenloxP/loxP

Figure 45 : L'expression clonale de Ras^{V12} n'est pas spécifique dans les glandes accessoires de la drosophile

Figure 46 : Les expériences de transplantation chez la drosophile permettent d'évaluer les capacités invasives des cellules tumorales

Figure 47 : Présence de masses cellulaires dans l'abdomen de femelles après injection de tumeurs Ras^{V12}

Figure 48 : L'expression clonale chez la drosophile impacte un faible nombre de cellules

Figure 49 : La mise en place de deux boucles autocrines de régulation permet la tumorigenèse

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les métalloprotéases et leurs substrats

Tableau 2 : Exemples de lignées cellulaires prostatiques utilisées pour l'étude du cancer de la prostate

Tableau 3 : Exemples de modèles génétiques murins utilisés pour l'étude du cancer de la prostate

Tableau 4 : Pathologies humaines pour lesquelles la drosophile est un modèle d'étude

Sommaire

Sommaire	1
Avant-propos.....	6
Introduction Bibliographique	9
CHAPITRE 1 : physiologie de la prostate et pathologies associées	10
I. Physiologie de la prostate	10
A) Structure et fonction de la glande prostatique.....	10
1) Structure.....	10
2) Fonction.....	11
B) Développement de la glande prostatique	12
1) Les étapes du développement	12
2) Importance des androgènes dans le développement de la prostate	12
3) Importance du dialogue épithélium-mésenchyme	13
4) Gènes régulant la morphogenèse prostatique	14
(1) Les ligands de signalisation sécrétés	14
(2) Les facteurs de transcription.....	16
(3) Les gènes homéotiques	17
5) Différenciation terminale des différents types cellulaires de l'épithélium prostatique mature	19
6) Origine des cellules épithéliales prostatiques et leur renouvellement	19
II. Physiopathologie de la prostate	21
A) Les prostatites	21
B) L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP).....	21
C) L'Atrophie Inflammatoire Proliférative (PIA, Proliferative Inflammatory Atrophy)	21
D) Le cancer de la prostate	22
1) Epidémiologie	22
2) Facteurs de risques	23
(1) L'âge	23
(2) Facteurs génétiques	23
(3) Alimentation et facteurs environnementaux.....	24
3) L'histoire naturelle du cancer de la prostate	24
(1) Les néoplasies intraépithéliales (PIN)	25
(2) Le carcinome et les métastases.....	25
4) Dépistage et diagnostic	26
5) Gradation histologique du cancer de la prostate.....	26
(1) La classification TNM (Tumor, Node, Metastase).....	27

(2) Le score de Gleason.....	27
(a) Détermination du grade de chaque composante de la tumeur.....	27
(b) Etablissement du score de Gleason	28
6) Prise en charge du cancer de la prostate.....	28
(1) Suivi attentif.....	28
(2) Prostatectomie radicale.....	28
(3) Radiothérapie.....	28
(4) Les ultrasons focalisés de haute intensité ou HIFU (High Intensity Focused Ultrasound, Ablaterm)	29
(5) La cryothérapie	29
(6) Hormonothérapie.....	29
(7) La chimiothérapie.....	30
CHAPITRE 2 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du cancer de la prostate	31
I. Principales altérations associées à la carcinogenèse prostatique	31
A) Altérations génétiques.....	31
1) NKX3.1.....	31
2) La fusion TMPRSS2-ERG.....	32
3) Surexpression de Myc	34
4) Les gènes de régulation du cycle cellulaire.....	35
(1) Les cyclines/CDKs et les inhibiteurs de CDK.....	35
(2) La protéine RB.....	37
(3) La protéine p53	38
5) L'apoptose	39
B) Dérèglement des molécules de signalisation cellulaire.....	39
1) La signalisation HGF	40
2) La signalisation VEGF.....	40
3) La signalisation FGF.....	41
4) La signalisation TGFβ.....	42
II. Implication des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR dans le cancer de la prostate	42
A) Le récepteur EGFR.....	43
1) Généralités	43
2) Mécanismes de régulation	43
B) La voie PI3K/AKT/mTOR et la délétion PTEN	45
1) Les acteurs de la signalisation PI3K/AKT/mTOR.....	45
(1) Les PI3K.....	45

(2) La protéine AKT/PKB.....	46
(3) La protéine mTOR.....	46
2) Systèmes de régulation	48
(1) Les phosphatases	48
(2) Les boucles de rétrocontrôle	48
3) La voie PI3K/AKT/mTOR et le cancer de la prostate.....	49
C) La voie RAS/MAPK.....	49
1) Généralités	49
2) Les acteurs de la signalisation RAS/MAPK	50
(1) Les protéines RAS.....	50
(2) Les protéines RAF.....	50
(3) Les protéines MEK et ERK	50
3) Systèmes de régulation	51
(1) Les protéines GAP et autres chaperonnes	51
(2) Les phosphatases	51
(3) Les boucles de rétrocontrôle	51
4) La voie RAS/MAPK et le cancer de la prostate.....	52
D) Dialogue entre les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR.....	53
III. Modifications du microenvironnement pour soutenir la croissance tumorale .	54
A) Les MMPs et la matrice extracellulaire	54
B) La transition épithélium-mésenchyme.....	56
C) Angiogenèse	57
CHAPITRE 3 : Modèles d'étude du cancer de la prostate	59
I. Modèles d'étude du cancer de la prostate	59
A) Les modèles in vitro	59
1) La lignée LNCaP.....	59
2) La lignée DU145.....	60
3) La lignée PC3.....	60
4) Autres lignées	61
5) Avantages et inconvénients liés à l'utilisation de ces lignées.....	61
6) Les modèles in vitro 3D	61
B) Les modèles in vivo	62
1) Les modèles xénogreffes	62
2) Avantages et inconvénients des modèles xénogreffes.....	63
3) Les modèles génétiques	64
II. Le modèle drosophile	66
A) Intérêt de l'utilisation de la drosophile dans l'étude de pathologies humaines.....	66

B) Outils génétiques	67
1) Les transposons	67
2) Les systèmes binaires	67
3) Les systèmes mosaïques	68
C) L'intérêt du modèle drosophile dans l'étude du cancer de la prostate	69
1) Anatomie du système reproducteur	69
(1) Description des glandes accessoires	69
(2) Le développement des glandes accessoires	70
2) Conservation des mécanismes généraux impliqués dans le cancer de la prostate	71
(1) La voie RAS/MAPK	71
(2) La signalisation insulinaire et la signalisation TOR	72
(a) La signalisation insulinaire IIS	72
(b) La signalisation TOR	73
(3) Le microenvironnement tumoral	74
3) Modèles de cancers chez la drosophile	75
Projet de recherche	77
Résultats	80
ARTICLE 1	81
ARTICLE 2	102
Discussion et perspectives	116
Annexes	128
Références	129

Avant-propos

Avec environ 50000 nouveaux cas diagnostiqués en France par an, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme. Les premières phases d'évolution de ce cancer sont asymptomatiques et rendent sa détection souvent très tardive. Depuis plusieurs années, les populations sont de plus en plus sensibilisées au dépistage (analyse du taux de PSA sanguin notamment), ce qui fait que l'on détecte le cancer de plus en plus précocement. De plus, il est maintenant bien documenté que toutes les tumeurs n'évolueront pas de la même manière. Certaines seront dites indolentes et ne nécessiteront pas de traitement mais une simple surveillance. D'autres seront au contraire agressives et nécessiteront une prise en charge. Etant donné la grande hétérogénéité des tumeurs, il apparaît difficile de définir clairement quelles anomalies génétiques sont responsables de l'initiation du cancer de la prostate puis de sa progression vers une forme résistante aux traitements anti-cancéreux. L'amélioration de la compréhension des mécanismes précoces du cancer de la prostate paraît donc indispensable pour (1) préciser au mieux le diagnostic tumoral initial à l'aide de biomarqueurs et (2) mieux définir de nouvelles cibles thérapeutiques dont les médecins pourraient disposer.

Depuis plusieurs années, une part importante des travaux en biologie du cancer se sont centrés sur l'étude des différentes étapes biochimiques de la transmission des signaux extra- et intracellulaires vers le génome afin d'élucider quels processus affectent l'expression des gènes régulateurs de la croissance et de la survie des cellules. Ainsi, différentes études réalisées sur des échantillons de cancer de la prostate ont montré que les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR, impliquées dans le contrôle de processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la croissance ou encore la différenciation cellulaire, sont souvent activées de façon aberrante dans les tumeurs et que leur degré d'activation est encore augmenté dans les phases tardives et de résistance aux thérapies. Cependant, peu de données sont disponibles concernant le rôle respectif de ces voies dans la tumorigenèse prostatique particulièrement dans ses phases précoces, et concernant leurs interactions au niveau moléculaire qui restent mal comprises.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse. L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la co-dérégulation des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR et d'analyser les conséquences dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate. Ce travail est réalisé dans un modèle *in vivo*, la drosophile, facilement manipulable génétiquement et dans lequel il est aisé d'analyser l'impact d'une ou plusieurs mutations combinées sur la signalisation cellulaire mais aussi sur le microenvironnement.

L'introduction bibliographique aborde en première partie successivement la physiologie et les physiopathologies de la glande prostatique, avec un accent porté sur le cancer de la prostate. Une deuxième partie traite des différents mécanismes moléculaires qui conduisent à son développement. Une attention particulière est portée sur les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR, leur implication dans le cancer de la prostate et leurs interactions connues. Enfin, la dernière partie traite des différents modèles de cancer de la prostate, et se termine par la présentation du modèle drosophile. Les résultats des travaux effectués sont ensuite présentés sous forme de deux articles. Le premier présente le rôle respectif des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR dans la tumorigenèse de la glande accessoire ainsi que leur interconnexion. Le deuxième article apporte des éléments quant au rôle des métalloprotéases et de la matrice extracellulaire dans notre modèle de tumorigenèse prostatique. L'ensemble de ces résultats est suivi d'une discussion.

Introduction

Bibliographique

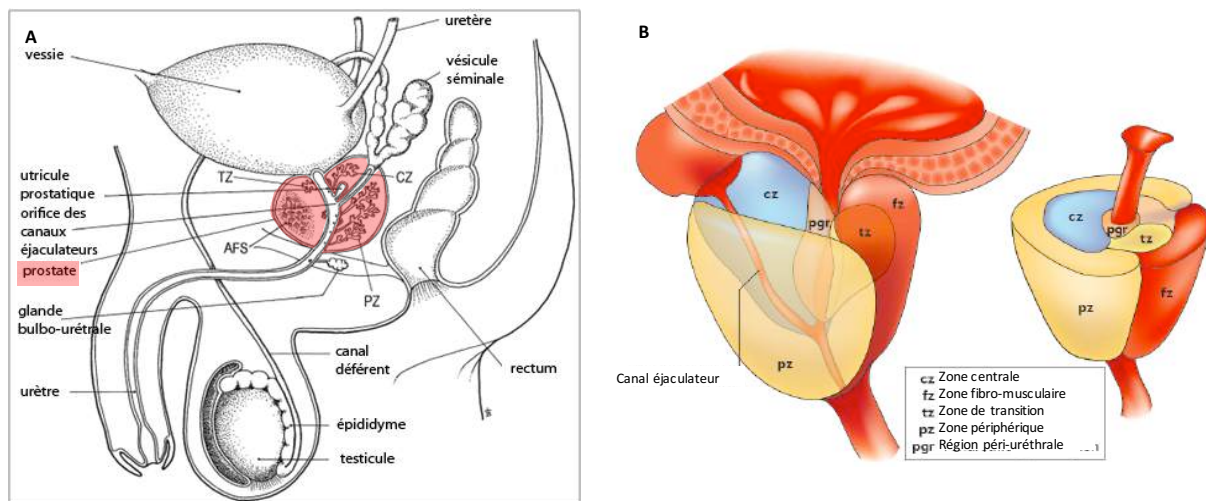


Figure 1 : Localisation et anatomie de la prostate humaine

A) Schéma d'une coupe sagittale de l'appareil génital masculin. Située sous la vessie et en avant du rectum, la prostate entoure l'urètre chargée d'évacuer les urines et le sperme.

D'après Timms et al., 2008

B) Schéma représentant les différentes zones histologiques de la prostate : la zone centrale, la zone de transition, la zone périphérique.

D'après Verze et al., 2016

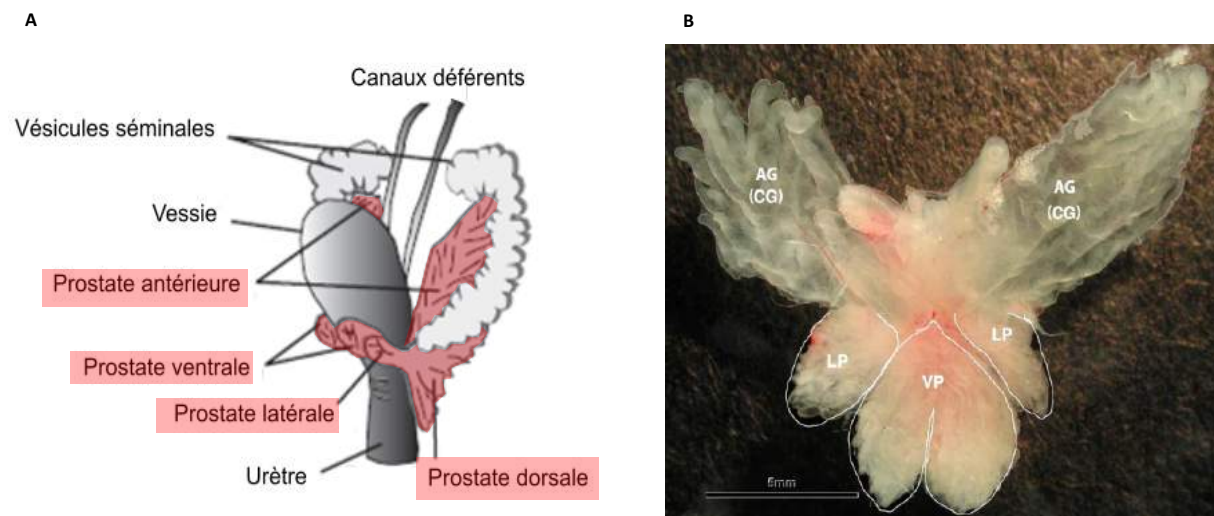


Figure 2 : Localisation et anatomie de la prostate murine

A) Schéma d'organisation de la prostate murine. Elle se subdivise en quatre paires de lobes entourant l'urètre : les lobes ventraux, dorsaux, latéraux et antérieurs.

D'après Berquin et al., 2005

B) Photographie d'une prostate de souris adulte de 30 jours après dissection de l'ensemble de l'appareil uro-génital.

VP : lobe ventral ; LP : Lobe latéral ; AG(CG) : lobe antérieur / glande coagulante.

D'après « The Visible Mouse Project », University of California, Davis, USA

CHAPITRE 1 : Physiologie de la prostate et pathologies associées

I. Physiologie de la prostate

A) Structure et fonction de la glande prostatique

1) Structure

La prostate est une glande exocrine appartenant au tractus génital masculin. Située sous la vessie et en avant du rectum, elle entoure l'urètre chargée d'évacuer les urines et le sperme (**figure 1A**). A la naissance, la prostate fait la taille d'un pois et augmente rapidement de volume au cours de la puberté, pour atteindre à l'âge adulte un volume d'environ 20cm³. Elle est constituée de trois zones : une zone de transition glandulaire qui entoure l'urètre ; une zone centrale non glandulaire composée d'un stroma dense entourant la zone de transition et traversée par les canaux éjaculateurs et une zone périphérique glandulaire formant l'essentiel de la partie apicale, postérieure et latérale, participant pour 80% du volume prostatique (McNeal, 1988) (**figure 1B**). Contrairement à l'homme, chez le rat et la souris, la prostate se subdivise en quatre paires de lobes entourant l'urètre : les lobes ventraux, dorsaux, latéraux et antérieurs (**figure 2**). Il n'existe pas d'homologie macroscopique évidente entre les lobes de prostate de la souris et du rat, et les zones que l'on retrouve chez l'homme (Shappell et al., 2004). Cependant, les glandes dans ces espèces sont proches d'un point de vue histologique et fonctionnel, ce qui en fait des modèles pertinents pour l'étude de la prostate en condition physiologique ou pathologique.

La prostate est constituée d'un épithélium pseudo-stratifié entouré d'un stroma fibromusculaire. Le stroma contient des muscles lisses, dont l'activité contractile aide à l'expulsion du fluide prostatique au moment de l'éjaculation (Hayward et al., 1996). Des fibroblastes matures sont également présents et sécrètent la matrice extracellulaire constituée de protéines fibrillaires, glycoprotéines et protéoglycanes. La matrice forme un réseau structurel important dans la médiation de la signalisation des facteurs de croissance (Tuxhorn et al., 2001). Le stroma a donc pour principale fonction d'apporter un environnement approprié au compartiment épithélial notamment grâce à la production par les cellules stromales des facteurs de croissance tels que l'IGF (*Insuline-like Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et le TGF α (*Transforming Growth factor alpha*) qui vont agir de façon

paracrine sur les cellules épithéliales, en stimuler la prolifération et la différenciation en cellules épithéliales luminales sécrétrices.

Le compartiment épithélial porte la fonction exocrine, il est responsable de la production du fluide prostatique. Il est composé d'une cinquantaine d'acini, structures fonctionnelles dont les sécrétions sont drainées par 15 à 25 canaux collecteurs ramifiés formant une structure arborescente et débouchant dans l'urètre. La lumière de chaque acinus est bordée par un épithélium pseudostratifié constitué de 3 types cellulaires épithéliaux majoritaires : les cellules épithéliales luminales, basales et neuroendocrines, qui seront décrites plus ultérieurement dans ce manuscrit.

2) Fonction

Avec les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales, la prostate fait partie des glandes accessoires, responsables de la production de sécrétions entrant dans la composition du sperme. Ainsi, la fonction principale de la prostate est la production par les cellules épithéliales luminales du fluide prostatique, constituant du liquide spermatique. Au moment de l'éjaculation, la prostate ainsi que le tissu musculaire qui l'entoure se contractent conduisant à l'expulsion du liquide prostatique dans le canal urétral où il se mélange aux spermatozoïdes et au liquide séminal. La composition du fluide prostatique est complexe puisqu'il participe à la fois au transport et à la protection des spermatozoïdes, à l'activation du sperme et à la capacitation. Ces activités reposent sur la présence de nombreux facteurs parmi lesquels les prostasomes, petites vésicules lipidiques, aux propriétés immunosuppressives et anti-oxydantes (Stegmayr and Ronquist, 1982). Des protéines comme les kallikréines (KLKs) qui constituent une famille de 15 protéases sérines dont le PSA (*Prostate Specific Antigen*), qui est une glycoprotéine responsable de la liquéfaction du sperme par protéolyse des protéines séménogeline I et II et de la fibronectine (Kalinska et al., 2016). Des métabolites comme le citrate, intermédiaire du cycle de Krebs (Medrano et al., 2006), substrat énergétique nécessaire à la production d'ATP. Des ions tels que le Zn^{2+} , stocké dans le cytoplasme des cellules épithéliales (Franz et al., 2013). Le Zn^{2+} bloque le cycle de Krebs, ce qui favorise l'accumulation de citrate, et forme des liaisons allostériques avec les KLKs afin de temporairement inhiber leur activité en condition physiologique avant l'éjaculation (Kalinska et al., 2016).

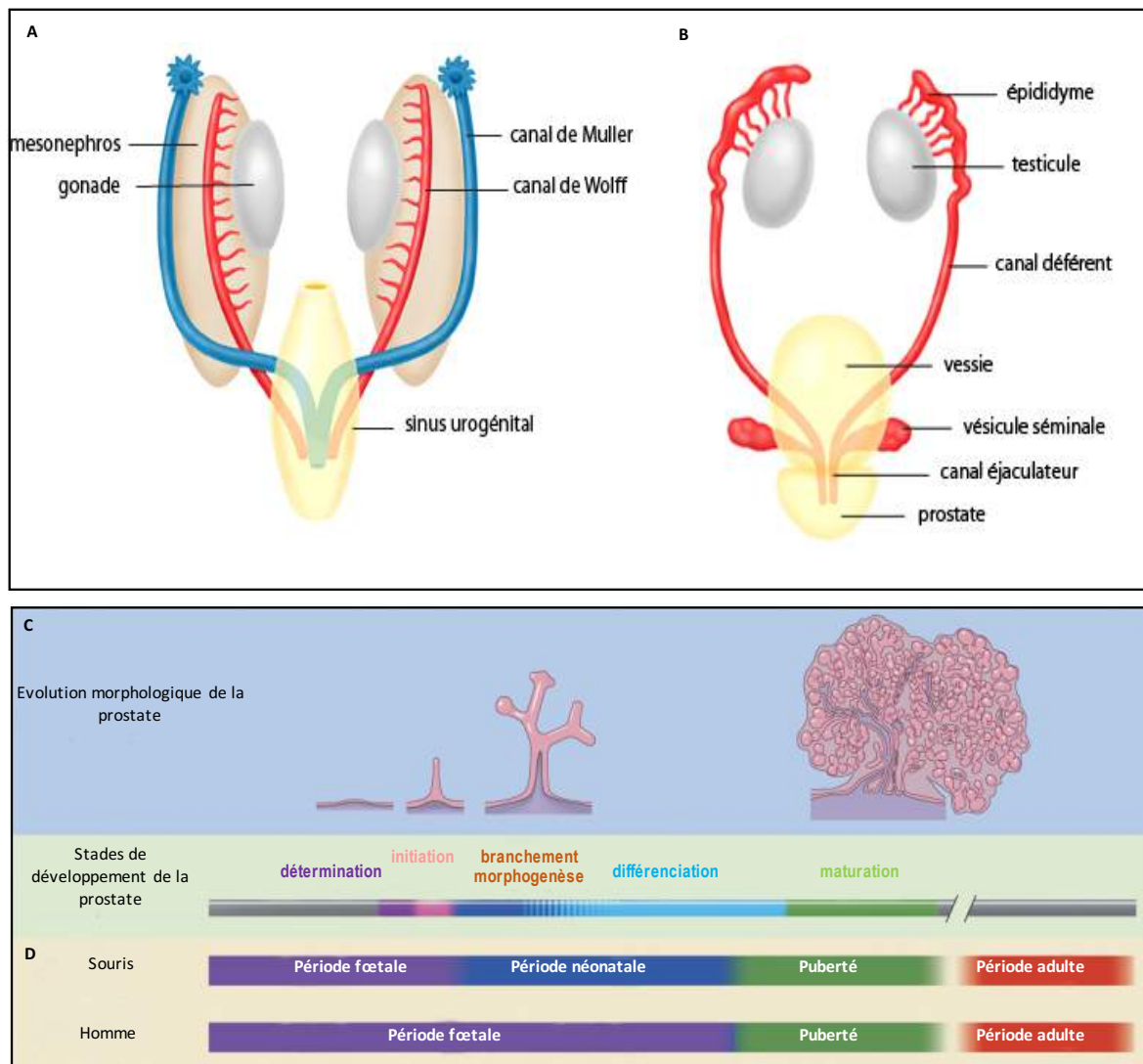


Figure 3 : Développement du tractus génital masculin et de la prostate

A) Durant les stades précoces de développement, les gonades sont indifférenciées et les canaux de Wolff et de Müller sont simultanément présents, reliés tous deux au sinus urogénital.

B) Au cours du développement du tractus génital mâle, les canaux de Müller régressent tandis que les canaux de Wolff se différencient en épididyme, canaux déférents et vésicules séminales. Le sinus urogénital se différencie en vessie et en prostate.

C) Le développement de la prostate se déroule en cinq étapes : la détermination, l'initiation, le branchement, la différenciation et la maturation.

D'après Prins and Putz, 2008

D) Les étapes de développement sont identiques chez l'homme et la souris. Seule les fenêtres de temps diffèrent. Chez l'homme, le développement jusqu'à l'étape de différenciation a lieu chez le fœtus. Chez la souris, les étapes de détermination et d'initiation ont lieu durant la période foetale tandis que les étapes de branchement et de différenciation ont lieu durant la période néonatale.

D'après Prins and Putz, 2008

B) Développement de la glande prostatique

1) Les étapes du développement

Le développement de la prostate est initié chez le fœtus humain, durant les deux derniers trimestres de la grossesse. Elle se développe en 5 étapes distinctes (Prins and Putz, 2008) à partir du sinus urogénital (UGS) (**figure 3**). L'UGS est constitué d'un feuillet épithélial d'origine endodermique appelé UGE (*UroGenital Epithelium*) et d'un feuillet mésenchymateux d'origine mésodermique appelé UGM (*UroGenital Mesenchyme*). Les étapes du développement de la prostate sont : la détermination, l'initiation (ou bourgeonnement), la morphogenèse des branches, la différenciation et la maturation. L'étape de détermination correspond à la différenciation du tissu prostatique à partir du sinus urogénital à partir de la 10^{ème} semaine de gestation. Elle est suivie par l'initiation durant laquelle le développement anatomique de l'organe commence avec la formation de bourgeons qui, en s'allongeant, forment des cordons de cellules. Ces cordons se subdivisent ensuite lors de la morphogenèse, formant des arborescences. Durant la différenciation, en fin de vie fœtale, les lumières se forment et les cordons donnent progressivement naissance à des canaux collecteurs et des acini. Les cellules de l'épithélium bordant ces acini se différencient alors en cellules épithéliales basales ou luminales et/ou en cellules neuroendocrines. A la naissance, les glandes entrent dans une phase de latence jusqu'à la puberté où, suite à l'étape de maturation, les cellules épithéliales luminales acquièrent leur fonction exocrine définitive. Chez la souris, les étapes de développement sont les mêmes. Cependant, le branchement et la différenciation ont lieu durant la période néonatale (**figure 3D**).

Pour permettre le développement harmonieux de la prostate, plusieurs facteurs exprimés à des moments clés seront nécessaires.

2) Importance des androgènes dans le développement de la prostate

Les individus atteints du syndrome de déficience de la 5 α -réductase, présentent une absence complète de morphogenèse prostatique ; bien que le développement de leurs vésicules séminales et de leurs canaux déférents soit normal (Siiteri and Wilson, 1974). Ainsi le développement de la prostate est dépendant des androgènes et plus particulièrement de la Dihydrotestostérone (DHT) qui résulte de la conversion par la 5 α -réductase de la testostérone produite par les testicules fœtaux. Un taux d'androgènes circulants, élevé chez l'embryon

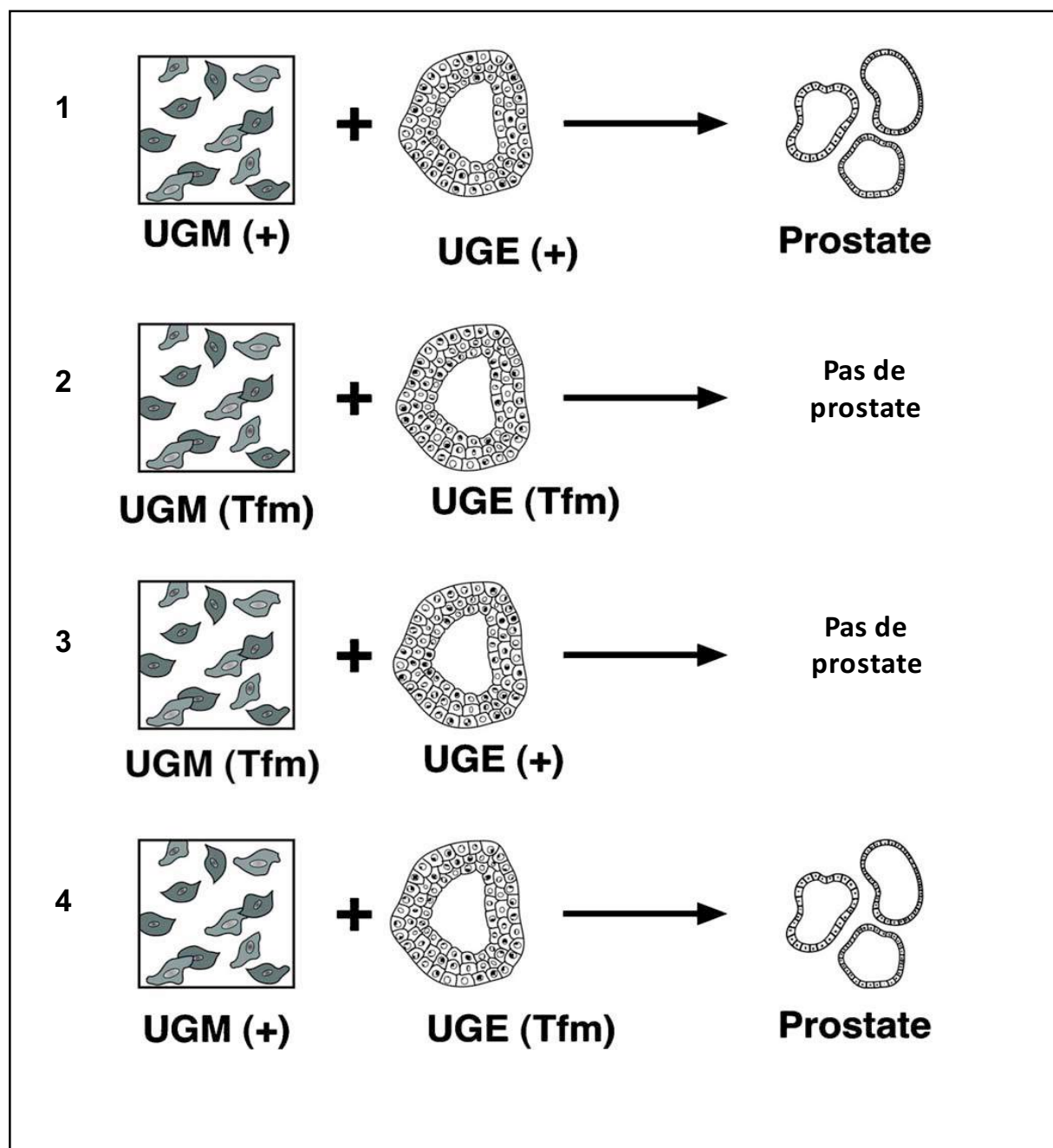


Figure 4 : Importance du dialogue épithélium-mésenchyme et de la signalisation androgénique au cours du développement prostatique

L'UGS est capable de former la prostate chez l'homme et une partie du vagin chez la femme. Sa différenciation dépend du dialogue entre l'épithélium (UGE) et le mésenchyme (UGM), et de la signalisation androgénique médiée par le récepteur des androgènes, exprimé dans l'UGM dans les étapes précoces de développement.

La recombinaison d'un épithélium sauvage (+) ou déficient pour le récepteur des androgènes (Tfm) avec un UGM sauvage (+) permet de générer une prostate. A l'inverse, l'UGE peut former une prostate uniquement si le mésenchyme qui lui est associé possède un récepteur aux androgènes fonctionnel.

D'après Cunha et al 2004

mâle, favorise l'initiation du développement prostatique (Pointis et al., 1980), et cela indépendamment du sexe génétique (Toivanen and Shen, 2017).

Des culture d'explants d'UGS issus d'embryons de souris à différents stades de développement, en absence ou en présence d'androgènes, montrent que ces hormones sont essentielles pour les étapes de détermination et d'initiation (Cunha, 1973). En plus de son rôle lors du développement précoce de la prostate, la DHT est requise dans l'épithélium pour soutenir l'activité des cellules épithéliales différenciées mais aussi pour promouvoir la différenciation du mésenchyme en muscles lisses (Cooke et al., 1991).

L'action de la DHT nécessite la présence d'un récepteur spécifique, le récepteur des androgènes (AR, *Androgen Receptor*). C'est un facteur de croissance de la superfamille des récepteurs nucléaires. De façon inattendue, AR est exprimé au niveau de l'UGM avant et pendant la morphogenèse prostatique mais pas au niveau de l'UGE pendant ces mêmes périodes. Son expression dans la partie épithéliale est induite plus tardivement, lors des étapes de bourgeonnement et de morphogenèse (Shannon and Cunha, 1983). Ces données suggèrent l'existence d'un dialogue étroit entre le mésenchyme et l'épithélium au moins dans les 1^{ères} phases de développement afin de relayer l'action des androgènes d'un compartiment sur l'autre (Tenniswood, 1986).

3) Importance du dialogue épithélium-mésenchyme

Cunha et ses collaborateurs ont disséqué le rôle exercé respectivement par le mésenchyme et l'épithélium, ainsi que l'importance de leur dialogue dans le processus de différenciation (Shannon and Cunha, 1983). Les travaux réalisés reposent sur la recombinaison des UGM et des UGE provenant de souris sauvages ou présentant une mutation perte de fonction pour AR (souris *tfm*, *testicular feminization*) (**figure 4**). Les tissus obtenus ont ensuite été greffés sous la capsule rénale de souris mâles sauvages afin qu'ils soient exposés à des concentrations physiologiques d'androgènes. Ils sont analysés 4 semaines plus tard afin d'apprécier la différenciation de l'UGE. Ces études montrent que les deux composantes mésenchymateuses et épithéliales sont indispensables pour la différenciation prostatique.

La recombinaison d'un épithélium différencié (vessie ou urètre) ou déficient pour le récepteur des androgènes (*Tfm*) avec un UGM sauvage permet de générer une prostate (Donjacour and Cunha, 1993). Par contre, la recombinaison entre un mésenchyme déficient pour le récepteur des androgènes et l'épithélium d'un embryon sauvage ne permet pas le développement de la prostate, même en présence des androgènes. Ainsi, l'UGE forme une

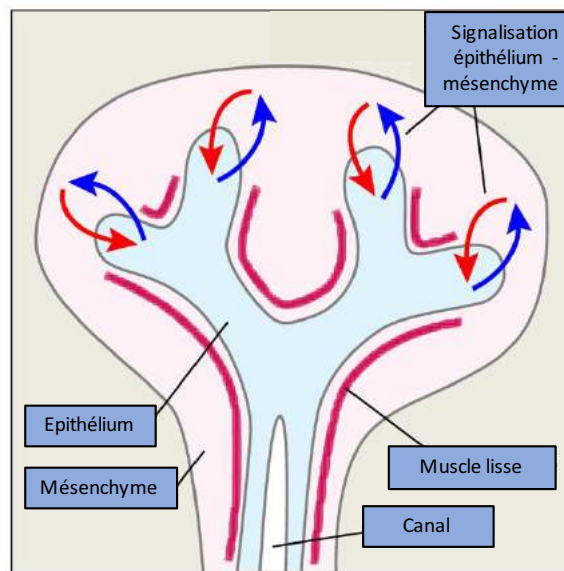


Figure 5 : Le développement harmonieux de la prostate nécessite un dialogue réciproque entre l'épithélium et le mésenchyme

Le dialogue entre l'épithélium et le mésenchyme se fait par l'intermédiaire de signaux tels que des facteurs de croissances et des ligands de signalisation sécrétés. Le mésenchyme permet ainsi la spécification de l'épithélium prostatique. Ce dernier induit lui la différenciation du mésenchyme en muscles lisses.

D'après Toivanen and Shen, 2017

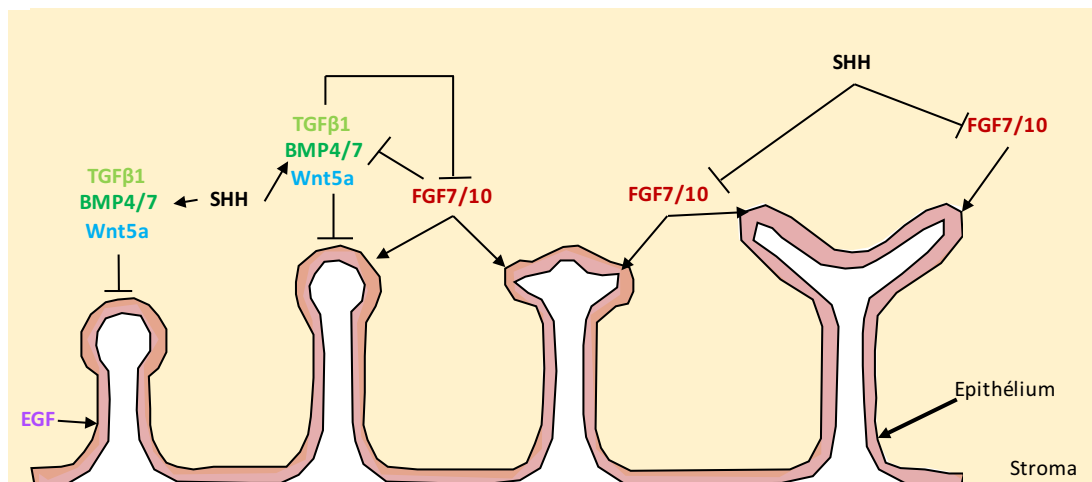


Figure 6 : Importance des ligands de signalisation sécrétés

Le dialogue entre l'épithélium et le mésenchyme peut se faire notamment par l'intermédiaire de différents signaux paracrines tels que des facteurs de croissances et des ligands de signalisation sécrétés.

L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et les membres de la famille FGF (*Fibroblast Growth Factor*) favorisent le bourgeonnement et l'élongation des canaux. A l'inverse, la famille TGF- β (*Transforming Growth Factor bêta*), SHH (*Sonic Hedgehog*) et Wnt5a contrôlent la croissance en restreignant l'envahissement du mésenchyme, ce qui permet le développement harmonieux de la glande prostatique.

prostate uniquement si le mésenchyme qui lui est associé est originaire du sinus urogénital et s'il possède un récepteur des androgènes fonctionnel. La spécification du tissu prostatique passe donc principalement par le mésenchyme et sa signalisation androgénique qui permet la production de signaux favorisant l'induction et le développement de l'épithélium prostatique. Ce dernier induira ensuite la différenciation de l'UGM en muscles lisses (Cunha et al., 1992).

4) Gènes régulant la morphogenèse prostatique

Le dialogue entre le mésenchyme et l'épithélium se fait par l'intermédiaire de différents signaux paracrines tels que des facteurs de croissance et des ligands de signalisation sécrétés (**figure 5**), mais aussi *via* l'expression d'un réseau de gènes permettant la différenciation du tissu.

(1) Les ligands de signalisation sécrétés

▪ L'EGF et les membres de la famille FGF

L'EGF, sécrété par le stroma en réponse aux androgènes (Berry et al., 2008) est déterminant pour le bourgeonnement de l'épithélium prostatique (Abbott et al., 2003), puisque celui-ci est réduit chez les souris invalidées pour le gène de l'*Egf* (**figure 6**).

FGF7 et FGF10 (*Fibroblast Growth Factor 7* et *10*) sont les deux seuls ligands de la famille FGF décrits comme étant impliqués dans le développement de la prostate. Ils sont exprimés dans l'UGM et agissent *via* le récepteur FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*), exprimé dans l'épithélium (Thomson and Cunha, 1999). Ils stimulent le branchement et l'élongation des bourgeons prostatiques (Yan et al., 1992; Lu et al., 1999). Ainsi l'inhibition de FGF7 sur des cultures *ex vivo* de prostates ventrales de rat conduit à une diminution du nombre de canaux prostatiques (Sugimura et al., 1996). De façon inattendue, des souris avec une délétion de *Fgf7* ne présentent pas de développement anormal de la prostate (Guo et al., 1996). Ce résultat peut s'expliquer par une redondance fonctionnelle de FGF7 avec FGF10 pour le développement puisque son invalidation entraîne la formation de bourgeons plus petits et moins nombreux (Donjacour et al., 2003). De plus, *Fgf10* est capable d'induire le branchement des bourgeons (Huang et al., 2005) ; et son expression peut être augmentée par les androgènes.

▪ La famille TGF β

D'autres facteurs ont plutôt un rôle d'inhibiteur de l'élongation des canaux afin de limiter l'invasion du mésenchyme. Leur expression est essentielle pour le développement

harmonieux de la glande prostatique et une distribution homogène des acini. Parmi ces facteurs citons ceux de la famille des BMP (*Bone Morphogenic Protein*) et du TGF β (*Transforming Growth Factor bêta*). La liaison des ligands BMPs et TGF β entraîne la phosphorylation de SMADS (1/5/8 pour les BMPs et 2/3 pour les TGF β) (Guo and Wang, 2009), conduisant à leur translocation dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles.

Bmp4 est exprimé dans le mésenchyme de la prostate prénatale puis, lors de la morphogenèse, il est restreint au niveau des bourgeons épithéliaux émergents (**Figure 6**). Un gradient de concentration de BMP4 est mis en place par l'expression d'antagonistes tels que Noggin mais également par l'inhibition exercée par Sonic Hedgehog ou encore FGF10 (Pu et al., 2004; Huang et al., 2005). Ce gradient permet une répression de la prolifération au niveau des bourgeons pour limiter le bourgeonnement des canaux et leur ramification.

Bmp7 présente des effets similaires sur le contrôle du bourgeonnement et de la ramification des canaux (Grishina et al., 2005), mais il a un schéma d'expression différent. Il est exprimé vers l'épithélium canalaire et principalement à l'extrémité des canaux en croissance.

TGF β 1 inhibe également la croissance des bourgeons prostatiques. En effet, l'ajout de TGF β 1 est ainsi capable de diminuer la prolifération des cellules des lobes ventraux cultivés *ex vivo* (Tomlinson et al., 2004). Chez la souris, il est exprimé dans le mésenchyme de la prostate post-natale et agit *via* ses récepteurs au niveau du mésenchyme et de l'épithélium (Tomlinson et al., 2004) : TGF β 1 bloque la prolifération des cellules épithéliales et stimule leur différenciation (Chang et al., 1999), et au niveau du mésenchyme, il agit en inhibant l'expression de *Fgf10*, ce qui contribue aux effets inhibiteurs sur la croissance (Tomlinson et al., 2004) (**Figure 6**).

▪ Les facteurs de la voie de signalisation Wnt

Les ligands WNT (*Wingless Integrated*) sont des glycoprotéines sécrétées qui agissent *via* le récepteur Frizzled et jouent un rôle dans le contrôle de la structuration des tissus, la prolifération ou encore le destin cellulaire (Cadigan and Nusse, 1997).

Un des ligands de la famille, *Wnt5*, est exprimé abondamment durant le développement de la prostate au niveau du mésenchyme proche des canaux en croissance (Zhang et al., 2006) (**figure 6**). Son invalidation *in vivo* chez la souris conduit à une mortalité périnatale (Yamaguchi et al., 1999), soulignant son rôle essentiel pour le développement. A l'image des facteurs de la famille TGF β , WNT5a contrôle la croissance et la ramification des canaux, en limitant l'invasion du stroma (Allgeier et al., 2008). En effet, sa perte *in vitro* sur

une culture de lobes ventraux de rats conduit à une position anormale des bourgeons ainsi qu'à la formation de canaux de taille anormale et irrégulière (Huang et al., 2009).

- Les facteurs de la voie de signalisation Hedgehog

La signalisation Hedgehog met en jeu trois ligands : Sonic Hedgehog (SHH) ; Indian Hedgehog (IHH) et Desert Hedgehog (DHH). Ils se lient sur le récepteur Patched (PTC), conduisant à la levée de l'inhibition sur le récepteur Smoothened (SMO) et à la régulation de l'expression de gènes cibles *via* les facteurs de transcription Gli1, Gli2 et Gli3 (Ingham et al., 2011).

Le ligand SHH est le plus abondant lors du développement de la prostate (Doles et al., 2006), son expression est maximale lors du bourgeonnement, puis diminue progressivement au moment de la ramification, jusqu'à un niveau faible chez l'adulte (Podlasek et al., 1999a). La redondance fonctionnelle entre les ligands rend compliquée l'étude de l'implication de SHH (Doles et al., 2006). Cependant il a été montré *in vitro* que SHH est capable de diminuer l'expression de *Fgf10* et d'augmenter celle de *Bmp4*, et ainsi de contrôler la croissance des bourgeons (Freestone et al., 2003; Wang et al., 2003a) (**figure 6**). De plus, la signalisation Hedgehog a une fonction variable au cours du développement grâce à une régulation de gènes stade spécifique (Yu and Bushman, 2013). Dans la prostate prénatale, elle favorise la prolifération épithéliale et le bourgeonnement alors que dans la prostate post-natale elle inhibe la prolifération épithéliale et la ramification des canaux.

(2) Les facteurs de transcription

- Sox9

SOX9 est un facteur de transcription appartenant à la famille des gènes *SOX*, impliqués dans de nombreuses activités développementales (Kamachi and Kondoh, 2013). *Sox9* est faiblement exprimé dans l'épithélium d'UGS mâle et femelle, et est plus présent lors du développement à l'extrémité des canaux en croissance (Thomsen et al., 2008). Son expression est essentielle pour inhiber le développement de la prostate, puisque la perte de son expression au moment de l'induction de l'UGS par les androgènes empêche le développement prostatique (Huang et al., 2012). De plus, *Sox9* permet le bourgeonnement correct des canaux car sa perte à ce stade entraîne une diminution de la prolifération épithéliale.

- Les facteurs de la voie de signalisation Notch

La voie Notch contrôle des processus essentiels du développement tels que la différenciation et le choix du destin cellulaire (Lai, 2004). Quatre récepteurs (Notch-1, -2, -3 et -4) et cinq ligands (Jagged-1, -2 et Delta like-1, -3, -4) initient cette voie. La fixation du ligand sur le récepteur provoque la libération par clivage du domaine intracellulaire de Notch, NICD (*Notch Intracellular Domain*), capable de transloquer dans le noyau et de réguler l'expression de gènes cibles tels que *Hes* et *Hey*.

Durant le développement de la prostate, la voie Notch favorise la prolifération des progéniteurs cellulaires (Wu et al., 2011). Elle permet aussi une morphogenèse correcte des branches avec la mise en place hiérarchisée des compartiments basaux et luminaux (Wang et al., 2006b), notamment en régulant la prolifération et la différenciation des cellules basales et luminales (Kwon et al., 2014). Enfin, elle permet la survie et la différenciation du tissu stromal (Orr et al., 2009). En effet, l'inhibition de la voie Notch entraîne une diminution de la différenciation des muscles lisses du compartiment mésenchymateux.

Son action peut également se faire par des interactions avec d'autres acteurs essentiels du développement de la prostate. L'activation de Notch1 entraîne une diminution de l'activité de AR grâce à l'action répressive de HEY1 sur SRC1, co-activateur de AR (Belandia et al., 2005). En retour, AR est capable de réprimer la signalisation Notch en diminuant l'expression de *Notch1* et de *Jagged1* (Nantermet et al., 2004). Enfin, une régulation réciproque a aussi lieu entre Notch et la famille TGFβ puisque l'activation de Notch favorise la signalisation TGFβ (Valdez et al., 2012) ; tandis que l'expression de *Bmp7* diminue le clivage de Notch1 et donc l'activité de ses cibles tels que *Hes1* (Grishina et al., 2005).

(3) Les gènes homéotiques

Les gènes homéotiques forment une superfamille de facteurs de transcription. Leur expression est contrôlée de façon spatio-temporelle afin de créer un « code morphogénétique » permettant la différenciation des différentes structures et compartiments de l'organe où ils sont exprimés. Les plus importants dans le développement de la prostate sont les gènes de la famille Hox et les gènes de la famille NK, dont plus particulièrement le gène NKX3.1 (*NK3 Homeobox 1*).

- La famille Hox

La famille des gènes *Hox* est connue pour son implication dans la détermination de l'identité segmentaire et la structuration des tissus dans le développement (Mallo and Alonso,

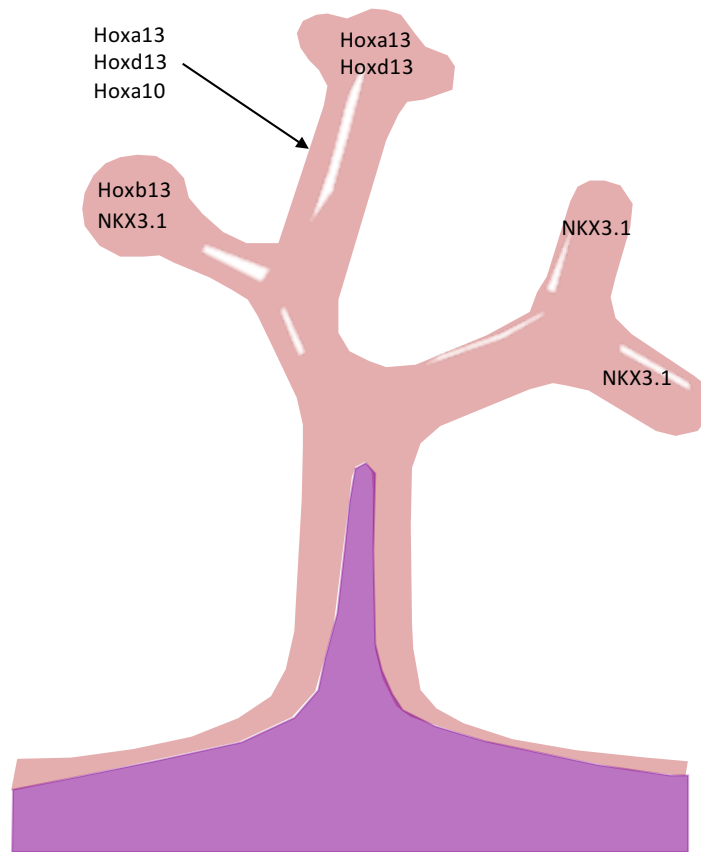


Figure 7 : Importance des gènes homéotiques dans le développement de la prostate

Les gènes homéotiques les plus importants dans le développement de la prostate sont : la famille HOX avec *Hoxa13*, *Hoxb13*, *Hoxd13* et *Hoxa10* ; la famille NK avec *Nkx3.1* (*NK3 Homeobox 1*). Ils forment des gradients de concentration tout le long des canaux en formation afin de réguler la croissance et la différenciation du tissu.

Nkx3.1 et *Hoxb13* sont exprimés uniquement dans l'épithélium tandis que *Hoxa13* et *Hoxd13* sont exprimés dans les deux compartiments. *Hoxa10* est lui uniquement exprimé dans le mésenchyme.

2013). Dans le développement de la prostate, quatre gènes *Hox* sont particulièrement impliqués : *Hoxa10*, *Hoxa13*, *Hoxb13* et *Hoxd13* (**figure 7**).

Hoxa10 est exprimé dans le mésenchyme et régule le branchement des canaux (Podlasek et al., 1999c). Des souris déficientes pour *Hoxa10* présentent un défaut au niveau du lobe antérieur, avec des anomalies de branchement.

Hoxa13 et *Hoxd13* sont exprimés dans l'UGS prénatal au niveau des deux compartiments, dans l'épithélium et le mésenchyme (Oefelein et al., 1996; Podlasek et al., 1999b). Des mutants pour ces deux gènes montrent une diminution de la croissance et du branchement des canaux (Podlasek et al., 1997).

Hoxb13 a un rôle différent puisqu'il n'est exprimé que dans l'épithélium et est impliqué dans sa différenciation. En effet, les mutants *Hoxb13* ne présentent pas de défaut de nombre de bourgeons ou de branchement de leurs bourgeons prostatiques, mais une absence de protéines qui ne sont plus sécrétées dans le fluide séminal (Economides and Capecchi, 2003).

▪ *NKX3.1*

NKX3.1 est un gène suppresseur de tumeur qui fait partie de la famille des NK, identifié pour la première fois chez la drosophile (Kim and Nirenberg, 1989), et impliqué dans le développement du mésoderme viscéral. Chez l'homme *NKX3.1* stimule le bourgeonnement et la différenciation de l'épithélium prostatique (**figure 7**). En modèle souris, sa mutation entraîne une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales avec l'apparition d'hyperplasies et de dysplasies (Bhatia-Gaur et al., 1999; Tanaka et al., 2000), tandis que sa délétion conduit à une diminution du branchement des canaux et à une désorganisation du compartiment luminal (Bieberich et al., 1996). En effet, une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation de la prostate tels que *Hoxb13* ou encore *Tmprss2* est observée chez des souris *Nkx3.1*^{-/-} (Dutta et al., 2016). À l'inverse, sa surexpression dans un épithélium murin différencié de vésicules séminales suffit à reprogrammer les cellules vers un épithélium prostatique (Dutta et al., 2016).

Des liens entre *NKX3.1* et d'autres acteurs impliqués dans le développement de la prostate sont connus. En effet, FGF10 et la signalisation WNT activent l'expression de *Nkx3.1* durant l'organogenèse (Huang et al., 2005; Kruithof-de Julio et al., 2013).

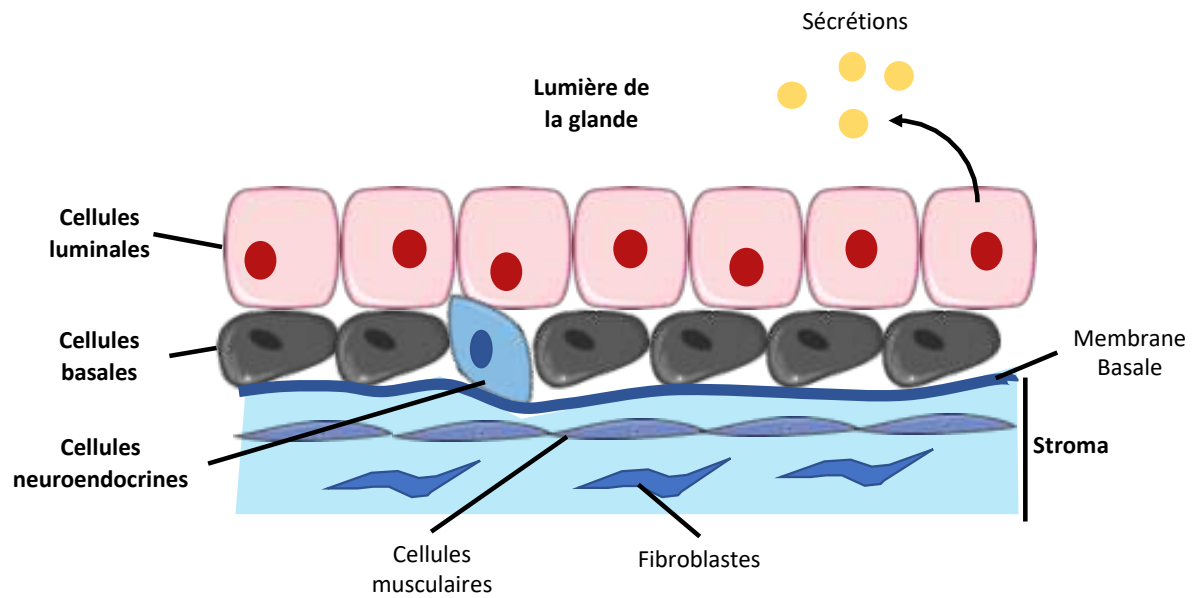


Figure 8 : Structure de la prostate différenciée

La prostate est constituée de deux compartiments : le compartiment épithélial dans lequel on retrouve les cellules luminales, les cellules basales et les cellules neuroendocrines ; et le stroma avec des fibroblastes et des cellules musculaires. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale. Les sécrétions prostatiques sont libérées dans la lumière de la glande.

5) Différenciation terminale des différents types cellulaires de l'épithélium prostatique mature

La dernière étape de différenciation se déroule à la puberté, lorsque les taux d'androgènes plasmatiques augmentent fortement. Elle aboutit à la formation d'un tissu hautement hiérarchisé d'un point de vue structural et fonctionnel, constitué principalement de cellules épithéliales luminales, de cellules basales et de cellules neuroendocrines (**figure 8**). Les cellules épithéliales luminales bordent la lumière de l'acinus et constituent le type cellulaire majoritaire. Ces cellules sont dépendantes des androgènes pour leur survie et leur fonction, et expriment donc le récepteur des androgènes à un niveau élevé. Elles expriment également d'autres marqueurs qui permettent de les différencier des autres types cellulaires, tels que les *cytokératines* (CK) de faible poids moléculaire 8 et 18, *NKX3.1*, la *kallikréine 2*, *PSCA* (*Prostate Stem Cell Antigen*), *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou encore le marqueur de surface *CD57* (Litvinov et al., 2003).

Entre la lame basale et les cellules luminales, les cellules basales forment une monocouche continue. Elles sont non sécrétrices et androgéno-indépendantes. Ces cellules expriment un ensemble de facteurs spécifiques tels que les *cytokératines* de haut poids moléculaire 5 et 14, *PSCA*, *P63*, *c-MET* (récepteur du HGF), *BCL2* et le marqueur de surface *CD44* (Litvinov et al., 2003).

Entre ces deux couches cellulaires, des cellules "intermédiaires" ont été identifiées. Elles expriment à la fois des marqueurs de cellules épithéliales basales et des marqueurs de cellules luminales (Bonkhoff et al., 1994, 1998). Enfin, des cellules neuroendocrines sont dispersées au niveau de la lame basale. Ces cellules sont androgéno-indépendantes et n'expriment pas *AR*. Elles produisent des facteurs paracrines pour soutenir l'activité des cellules luminales (Bonkhoff, 1998). De plus, elles expriment des facteurs spécifiques comme la chromogranine A, la sérotonine et d'autres neuropeptides.

6) Origine des cellules épithéliales prostatiques et leur renouvellement

Une fois la prostate adulte formée, une maintenance du tissu est nécessaire pour conserver l'homéostasie prostatique. Les cellules luminales, basales ou neuroendocrines endommagées et éliminées au cours de la vie doivent être remplacées. Ce renouvellement met en jeu des cellules souches, capables de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs lignages cellulaires grâce à leur multipotence. Il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus

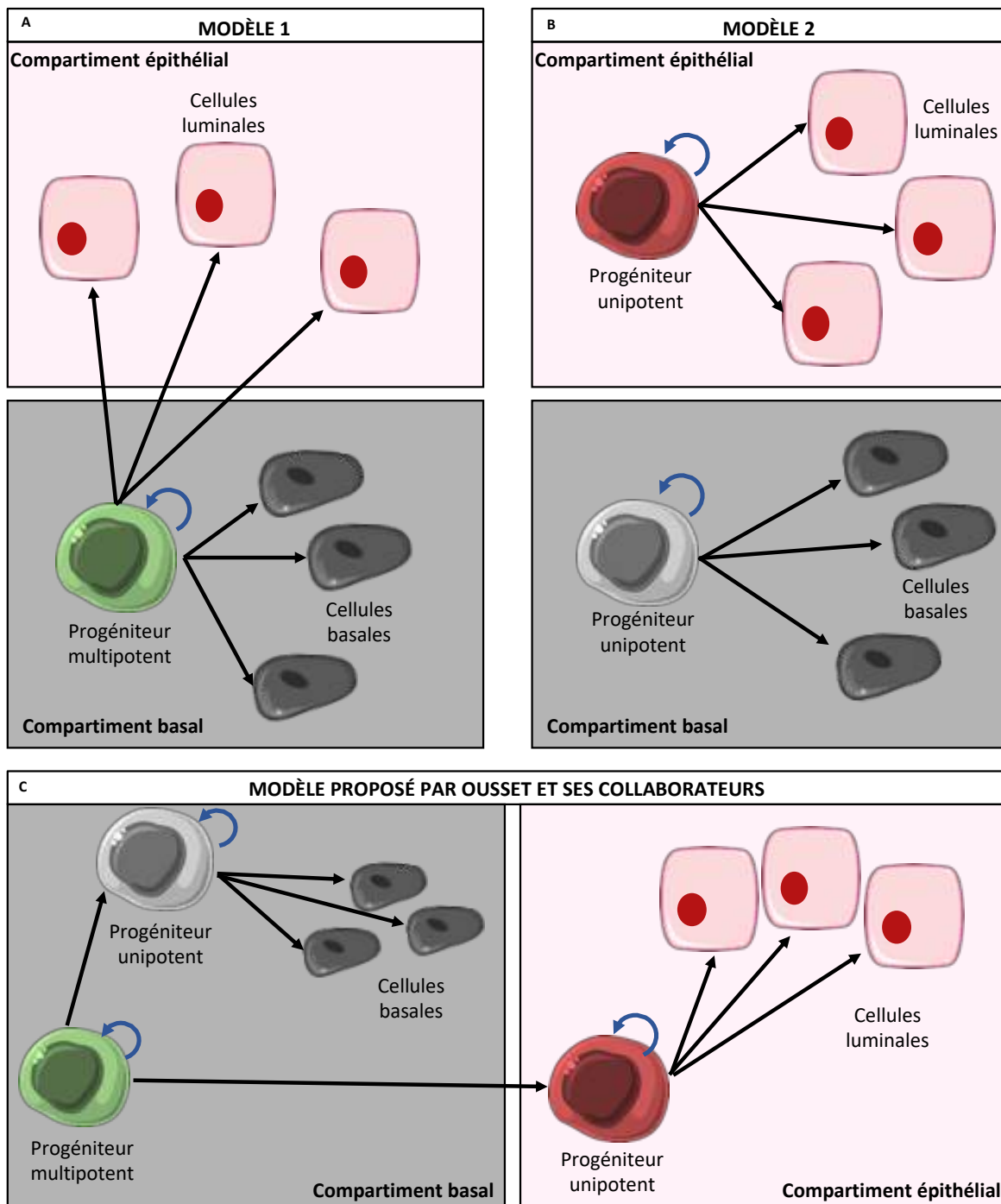


Figure 9 : Le renouvellement des cellules épithéliales prostatiques dépend de cellules souches

A l'heure actuel il n'existe pas de consensus concernant la localisation des cellules souches et leur origine. Plusieurs modèles ont pu être décrits au cours d'études.

A) Le 1^{er} modèle suggère que les cellules épithéliales sont générées à partir de cellules souches pluripotentes du compartiment basal.

B) Le 2^e modèle postule que les cellules épithéliales proviennent de cellule souches unipotentes dans chaque compartiment indépendamment.

C) Un modèle récent, réunit les deux premiers et suggère que le développement de cellules souches multipotentes du compartiment basal génère des cellules souches unipotentes luminales et basales, permettant le renouvellement cellulaire à l'âge adulte

D'après Ousset et al., 2012

concernant la localisation et l'origine de ces cellules souches mais différentes études ont permis de décrire deux modèles majeurs.

Le premier modèle suggère que la régénération du tissu se fait à partir de cellules souches multipotentes dans le compartiment basal (**figure 9A**). Dans ce compartiment il existe des cellules avec des capacités prolifératives importantes (Evans and Chandler, 1987; Bonkhoff et al., 1994). Elles présentent une morphologie intermédiaire entre celle d'une cellule basale et celle d'une cellule luminale (Verhagen et al., 1988). Ces cellules sont capables de régénérer les trois types cellulaires du compartiment épithélial (Lawson et al., 2007) : basal, luminal et neuroendocrine. Leong and Coll. ont même montré qu'une seule cellule souche adulte, contenant les marqueurs Sca1+/CD133+/CD44+/CD117+ est capable de régénérer les différents types cellulaires, suggérant qu'il s'agit de cellules souches « originelles » (Leong et al., 2008). A l'inverse, des souris mutantes pour *P63*, et donc sans cellules basales, ne présentent pas de développement de prostate, suggérant que certaines cellules du compartiment basal p63+ sont les progéniteurs (Signoretti et al., 2000), dont dériveraient les cellules lumineales (Signoretti et al., 2005).

Le deuxième modèle postule que la régénération cellulaire se fait indépendamment pour chacun des types cellulaires présents dans l'épithélium (**figure 9B**). Lors d'expériences de régénération de tissus, des techniques de lignage cellulaire ont mis en avant des cellules souches unipotentes permettant le renouvellement de chacun des compartiments indépendamment les uns des autres (Choi et al., 2012). De plus, l'administration d'androgènes après une castration permet la prolifération et la régénération du seul compartiment luminal (Evans and Chandler, 1987).

La limite de ces études est l'utilisation d'approches *ex vivo* basées sur la transplantation de tissu ou sur la régénération cellulaire suite à une castration. Elles peuvent donc modifier la hiérarchie de lignage, telle qu'elle existe dans la physiologie normale de la prostate. De plus, les fenêtres d'analyse utilisées sont variées : alors que certaines sont réalisées durant le développement, d'autres le sont à l'âge adulte ce qui génère des différences importantes dans les résultats. Une étude récente a permis d'apporter plus d'informations concernant le lignage cellulaire à l'état physiologique en traçant les cellules à l'aide de marqueurs fluorescents (Ousset et al., 2012). Le modèle proposé combine les deux présentés précédemment puisque les auteurs ont montré que durant le développement, des cellules souches multipotentes du compartiment basal génèrent des cellules souches unipotentes lumineales et basales, qui permettent le renouvellement cellulaire à l'âge adulte, indépendamment dans chaque compartiment (**figure 9C**).

II. Physiopathologie de la prostate

A) Les prostatites

Les prostatites sont des pathologies bénignes de la prostate. Elles sont la conséquence d'une inflammation de la prostate. La prévalence de cette inflammation est de 11 à 13% des hommes (Wagenlehner et al., 2013). Leur origine peut être variable : changements hormonaux, infections (bactériennes ou virales), réponses auto-immunes, reflux urinaire dans la prostate et inflammation systémique avec syndrome métabolique. Les symptômes principaux sont la présence de fièvre, de frissons, d'une grande fatigue associée à des symptômes urinaires (brûlures, difficulté à uriner ou besoin d'uriner trop fréquent). Ces pathologies sont principalement traitées par la prise d'antibiotiques. De plus, les troubles urinaires seront soulagés par des antalgiques, des anti-inflammatoires et des $\alpha 1$ -bloquants pour favoriser la relaxation des fibres musculaires et la vidange de la vessie.

B) L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP)

En France, l'HBP est la pathologie la plus fréquente, elle affecte près de 80% des hommes de plus de 80 ans. Elle correspond à une croissance excessive non maligne de la prostate, caractérisée par une expansion du compartiment épithélial mais également stromal (McNeal, 1978). L'augmentation de la taille de la prostate est lente jusqu'à être détectable par échographie. Il peut se passer des années avant la manifestation de symptômes très gênants. Le développement de cette HBP a lieu essentiellement au niveau de la zone de transition ce qui explique qu'elle peut entraîner des troubles urinaires de type obstructif dus au rétrécissement de l'urètre mais également des troubles irritatifs. Les prises en charge vont de la simple surveillance à la prescription de médicaments, voir à l'intervention chirurgicale en cas d'échec du traitement médical : des α -bloquants (Alfuzosine, Tamsulosine, Silodosine) pour détendre les muscles de la vessie afin de réduire les troubles urinaires ; couplés à des inhibiteurs de la 5α -réductase (Finastéride, Dutastéride) qui diminuent le volume de la prostate. (Source : Urofrance.org).

C) L'Atrophie Inflammatoire Proliférative (PIA, Proliferative Inflammatory Atrophy)

L'atrophie inflammatoire proliférative se forme lors d'une altération du tissu épithélial, suivie de sa régénération mais dans un contexte inflammatoire (Perletti et al.,

Indicende des cancers chez l'homme

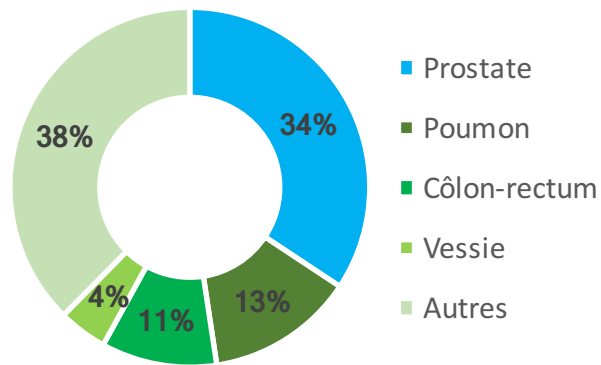


Figure 10 : Incidence du cancer de la prostate chez l'homme

Le cancer de la prostate est le plus fréquent chez l'homme, devant le cancer du poumon et du côlon-rectum.

Source : La ligue contre le cancer, 2011

2009). Elle est caractérisée par un épithélium prolifératif avec des noyaux et nucléoles hypertrophiques, ainsi qu'une modification du ratio noyau/cytoplasme, comme on peut le retrouver dans les cancers de la prostate (Celma et al., 2014). Ce type de lésion favorise soit la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS), et en conséquence la formation de lésions génomiques ; soit l'enrichissement du microenvironnement en cytokines et en facteurs de croissance, propice pour la carcinogenèse (Perletti et al., 2009). A l'instar du carcinome prostatique, la PIA se développe dans la zone périphérique ; et il a été montré que l'ingestion continue d'anti-inflammatoire de type non-stéroïdien diminue les risques de développer un cancer de la prostate (Jafari et al., 2009), c'est pourquoi les lésions PIA ont été proposées comme étant des précurseurs des néoplasies intraépithéliales de haut grade (HGPIN) ou, plus directement, des cancers de la prostate (De Marzo et al., 2007). Ceci est appuyé par le fait que certaines altérations génétiques observées dans les PIA le sont aussi dans les néoplasies intraépithéliales et les carcinomes, telles qu'une perte de *NKX3.1* ou une surexpression de *c-MYC* (Woenckhaus and Fenic, 2008), et ce de manière progressive lorsque l'on compare un épithélium normal, une PIA et un carcinome prostatique (Fonseca-Alves et al., 2018). L'implication des PIA comme étant un stade préliminaire du développement d'un carcinome prostatique reste cependant controversée, du fait d'un manque de liens moléculaires avérés (Russo et al., 2018).

D) Le cancer de la prostate

1) Epidémiologie

Avec 48427 nouveaux cas en 2013 en France, le cancer de la prostate est le plus fréquent chez l'homme de plus de 50 ans (source : Institut National du cancer, 2013), nettement devant le cancer du poumon et le cancer colorectal (source : Institut National du Cancer 2011) (**figure 10**). Il s'agit de la 3^e cause de décès par cancer chez l'homme (Haute autorité de Santé 2012), avec 8207 décès estimés en France en 2017 (Institut National du Cancer). Dans 95% des cas, le cancer de la prostate est de type adénocarcinome, c'est-à-dire d'origine épithéliale. Mais certains pourront s'initier à partir des cellules neuroendocrines (<2% des cas) (Grignon, 2004).

2) Facteurs de risques

(1) L'âge

Le principal facteur de risque pour le cancer de la prostate est l'âge. En effet, il apparaît rarement avant 50 ans et son incidence augmente avec l'âge, avec un âge médian de dépistage de 70 ans (American Cancer Society 2009). On estime qu'environ 1 homme sur 7 sera diagnostiqué avec un cancer de la prostate au cours de sa vie (Siegel et al., 2016). Des analyses d'échantillons prélevés lors d'autopsies révèlent qu'une majorité d'hommes de plus de 85 ans aurait un cancer de la prostate (Sakr et al., 1993). L'influence de l'âge sur l'augmentation de l'incidence du cancer de la prostate peut être associée au déséquilibre de la balance redox qui prédispose à l'apparition de mutations. D'autre part, plusieurs auteurs citent la diminution des androgènes chez les hommes âgés comme un facteur de risque supplémentaire (Algarte-Génin et al., 2004).

(2) Facteurs génétiques

La majorité des cancers de la prostate sont d'origine sporadique : comparé à d'autres cancers, le facteur héréditaire est faible (Carter et al., 1993), représentant 5% des cas. Les cancers de la prostate héréditaires se développent plus tôt, à environ 55 ans (Bratt, 2002). Il a été démontré que les hommes ayant un parent du 1^{er} degré (père ou frère) atteint ont un risque de développer un cancer de la prostate de 2 à 3,5 fois supérieur à la moyenne (Whittemore et al., 1995). Le risque relatif est même de 3 à 5 fois plus élevé si le diagnostic est réalisé chez le parent du 1^{er} degré avant ses 65 ans (Lesko et al., 1996). Des analyses GWAS (*Genome Wide Association*) montrent notamment des zones de variabilités génétiques, appelés SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*) qui seraient associées au cancer de la prostate (Gómez-Acebo et al., 2017).

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une augmentation de l'incidence de cancers dans les populations américaines d'origine africaine ou caribéenne en comparaison avec les populations d'origine caucasienne (DeSantis et al., 2016). A l'inverse, le cancer de la prostate est moins fréquent en Asie qu'aux Etats-Unis (Chen et al., 2014).

Au-delà des facteurs génétiques qui peuvent différencier ces populations, ceci peut aussi refléter l'influence de plusieurs autres paramètres : environnementaux (nutrition, pollution) et sociétaux (politiques de dépistage) (Bostwick and Qian, 2004).

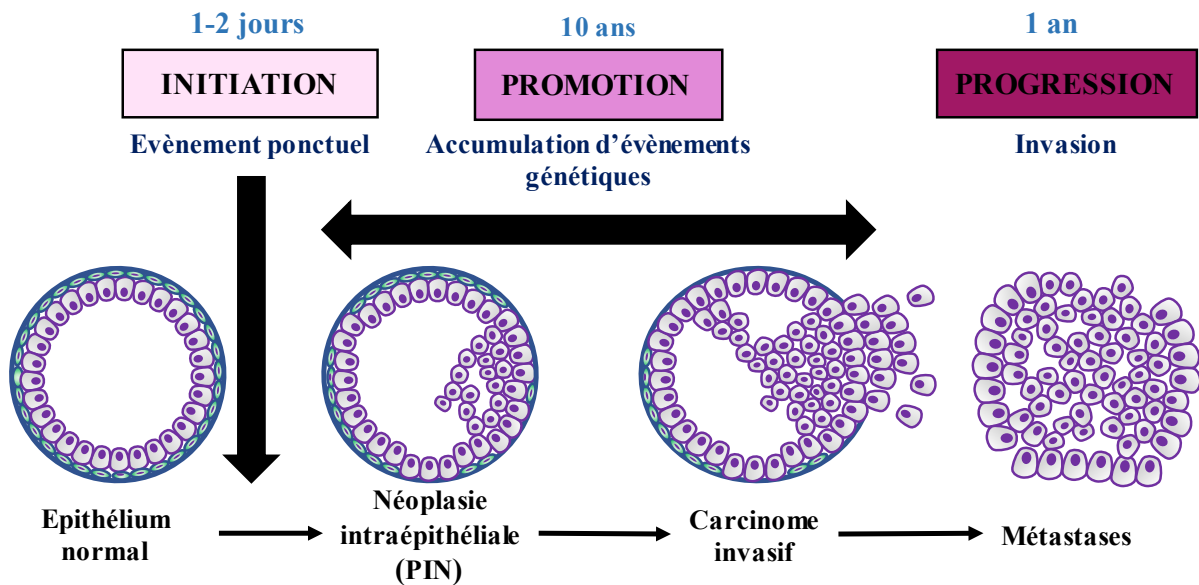


Figure 11 : Stades d'évolution du cancer de la prostate

Après une phase d'initiation marquée par un évènement ponctuel, l'étape de progression entraîne l'apparition de néoplasie intraépithéliale puis d'un carcinome invasif. Cette étape de progression est marquée par la perte de la couche de cellules épithéliales basales puis de la lame basale lors du carcinome invasif. Les cellules pourront alors envahir le stroma puis les circulations sanguines et lymphatiques, et former des métastases dans d'autres organes.

Modifié d'après Abate-Shen and Shen, 2000

(3) Alimentation et facteurs environnementaux

Des études sur les migrations de populations montrent l'importance de l'alimentation et de l'imprégnation environnementale. L'incidence des cancers de la prostate augmente de manière significative chez les hommes asiatiques immigrant dans diverses régions américaines (Schultz et al., 2011), où les quantités d'acides gras, de cholestérol, de protéines et de vitamines ingérées sont plus importantes (Watanabe et al., 2000). De plus, il existe une corrélation entre une augmentation des taux plasmatiques en acides gras saturés et le risque de développer un cancer de la prostate (Bassett et al., 2013). A l'inverse, les oméga-3 semblent être associés à un ralentissement de la progression tumorale et à une diminution de la mortalité (Chavarro et al., 2008).

En plus de l'alimentation, des agents environnementaux sont mis en cause dans le développement du cancer de la prostate. Certains pesticides ou perturbateurs endocriniens comme le bromure de méthyl, le dithiothréitol (DTT), le diéthylstilbestrol (DES) ou encore l'heptachlore sont associés à un risque de développer un cancer (Driscoll and Taylor, 1980; Alavanja et al., 2003).

3) L'histoire naturelle du cancer de la prostate

La formation et l'évolution des adénocarcinomes suit un processus classique qui peut se résumer en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression (**figure 11**). L'initiation est de courte durée (1 à 2 jours). Elle correspond à un événement ponctuel qui ne modifie pas le phénotype des cellules épithéliales. La promotion est plus longue (quelques années à quelques dizaines d'années) et correspond à une accumulation d'événements génétiques. Enfin, suit la phase de progression. Elle représente le dernier stade qui conduit à une invasion locale voire métastatique des cellules ayant acquis une indépendance vis-à-vis de leur environnement. L'évolution de l'adénocarcinome à travers ces différentes phases est la conséquence d'une succession d'altérations génétiques (perte de fragment chromosomique, fusions de gènes ou mutations), et d'activation de voies de signalisation, notamment celles impliquant les facteurs de croissance, ainsi qu'une modification du microenvironnement.

Lors du développement du cancer de la prostate, plusieurs types de lésions histologiques peuvent être observées et marquer les différents stades d'évolution de la maladie. L'hypothèse communément admise est que l'adénocarcinome prostatique a pour origine des néoplasies intraépithéliales qui évoluent en carcinomes invasifs, qui génèrent des métastases dans les stades les plus avancés.

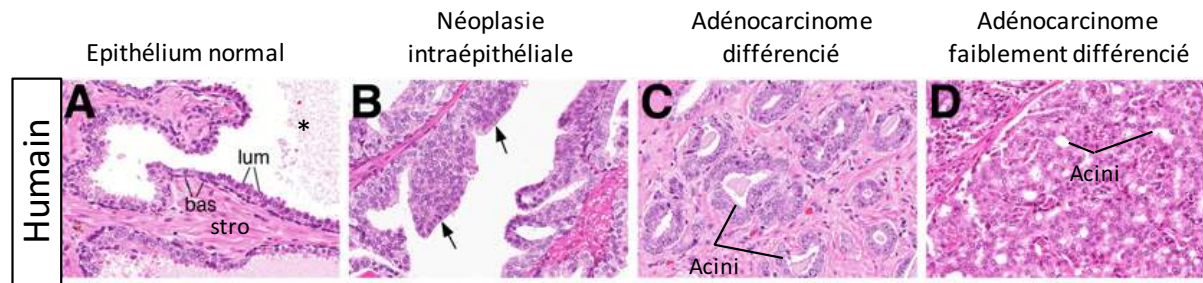


Figure 12 : Coupes histologiques des différents stades du cancer de la prostate

Le marquage hématoxyline-éosine permet de visualiser l'aspect histologique caractéristique des différents stades de la carcinogenèse prostatique.

A) La prostate est constituée d'unités fonctionnelles, les acini. Le compartiment épithélial est constitué de deux types de cellules majoritaires : les cellules épithéliales luminales (lum) bordant la lumière (*) dans laquelle se déversent les sécrétions prostatiques. Les cellules épithéliales basales (bas) reposent sur la lame basale composée principalement de laminine, de fibronectine, de collagène et de protéoglycane. Ce compartiment épithélial est entouré par le stroma (stro) principalement constitué de cellules musculaires et de fibroblastes.

B) Les néoplasies épithéliales sont caractérisées par une prolifération incontrôlée aboutissant à la formation d'un épithélium poly-stratifié (indiqué par les flèches).

C) Après dégradation de la lame basale, les cellules épithéliales commencent à envahir la lumière des acini localement la prostate. A ce stade les cellules épithéliales sont encore bien différenciées et les acini sont encore bien visibles.

D) Dans les stades les plus tardifs, les cellules épithéliales faiblement différenciées sont capables d'envahir des sites plus distants pour former des métastases. A ce stade, il devient plus difficile de distinguer les acini sur les coupes histologiques car les cellules épithéliales se dédifférencient et l'organisation tissulaire est fortement altérée.

Modifié d'après Shen and Abate-Shen, 2010

(1) Les néoplasies intraépithéliales (PIN)

La néoplasie intraépithéliale est décrite comme étant la lésion initiatrice de l'adénocarcinome. Elle est caractérisée par une désorganisation de l'épithélium avec notamment la présence de cellules dans les acini et les canaux (Bostwick, 1989) (**figure 12**). Selon leurs caractéristiques histologiques et cytologiques, les PIN peuvent être classées en lésions de bas grade (LGPIN, *Low Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia*) ou de haut grade (HGPIN, *High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia*) si les cellules présentent des noyaux avec des nucléoles proéminents (Joniau et al., 2005).

Plusieurs arguments sont en faveur du fait que les HGPIN représentent une étape de transition entre un épithélium bénin et un épithélium malin : (1) Les PIN se trouvent majoritairement dans la zone périphérique de la prostate, zone dans laquelle s'initie le cancer de la prostate (Bostwick and Brawer, 1987) ; (2) Les PIN sont généralement observées environ 10 ans avant l'apparition d'un cancer de la prostate, ce qui soutient la notion de progression (Sakr et al., 1993) ; (3) Les PIN sont multifocales tout comme les carcinomes, et elles présentent des lésions génétiques similaires à celle des carcinomes précoces (Qian et al., 1995) ; (4) Les PIN affichent des caractéristiques architecturales et cytologiques similaires à celles d'un cancer de la prostate comme une hyperplasie, une perte des cellules basales ou encore des noyaux et des nucléoles plus grands (Bostwick et al., 1993).

Quelques différences peuvent cependant être mises en avant comme la présence d'une membrane basale intacte au niveau des PIN et l'absence d'invasion du stroma (Bostwick et al., 1993). Enfin, les lésions néoplasiques ne sont pas associées à une augmentation du PSA plasmatique mais sont détectables lors d'une biopsie.

(2) Le carcinome et les métastases

Alors que dans les PIN la lame basale délimitant chaque acinus reste intacte, elle est altérée dans les carcinomes. Les cellules épithéliales envahissent donc le compartiment stromal et les tissus adjacents (**figure 12**). Cette étape est caractérisée par une prolifération intense des cellules épithéliales prostatiques, accompagnée d'une augmentation des sécrétions prostatiques et notamment du PSA. Dans les stades les plus tardifs, les cellules perdent leur adhérence à la matrice extracellulaire, et acquièrent une indépendance vis-à-vis de leur microenvironnement, leur permettant de se détacher et de coloniser des sites distants, *via* le réseaux lymphatiques et sanguins, pour former des métastases. Les sites préférentiels des métastases prostatiques sont les ganglions lymphatiques, les os et le cerveau (Schulz et al., 2003).

4) Dépistage et diagnostic

Le cancer de la prostate est caractérisé par une évolution lente et asymptomatique. Ceci peut être expliqué par le fait que l'épithélium prostatique a un faible niveau de prolifération contrebalancé par un faible niveau d'apoptose (Berges et al., 1995). Lorsque les premiers symptômes apparaissent (rétention urinaire, hématurie, impuissance ou encore des douleurs liées au développement de métastases), le cancer se trouve souvent à un stade avancé ce qui complique sa prise en charge. C'est pourquoi des politiques de prévention et de dépistages ont été mises en place pour permettre une prise en charge précoce. Aujourd'hui, le dépistage repose principalement sur deux méthodes : le dosage du PSA et le toucher rectal.

Le PSA (*Prostate specific antigen*) est produit au niveau des cellules épithéliales de la prostate et se retrouve dans le sang lors d'une désorganisation de l'architecture normale de la prostate (Lilja et al., 2008). Depuis que la mesure du taux sérique de PSA est utilisée, de nombreux cas de cancer de la prostate ont été détectés, en particulier les formes localisées. Le PSA existe sous deux formes dans le sang : une forme libre (non liée) et une forme complexée (liée à une protéine). La forme libre augmente en cas de HBP tandis que c'est la forme liée qui augmente lors d'un cancer. Le dosage des différentes formes permet d'orienter le diagnostic. De plus, on considère qu'une valeur supérieure à 4ng/ml de PSA total est anormale et nécessite des examens complémentaires.

Le cancer de la prostate s'initie préférentiellement dans la zone périphérique qui se trouve proche du rectum. Ainsi, le toucher rectal peut également permettre de déceler des modifications de volume, de forme et de consistance de la prostate et apporter une aide précieuse au dépistage.

Cependant de nos jours, seules les analyses histologiques et cytologiques d'échantillons de la glande prostatique permettent d'établir avec certitude le diagnostic. En effet, le PSA est un marqueur imparfait. Dans 15% des cas où le PSA est normal, un cancer de la prostate est présent, de plus, dans 30% des cas, il s'agit d'un cancer avancé (Yadav et al., 2018). A l'inverse 80% des patients avec un taux de PSA $>$ à 4ng/ml, ne présentent pas de cancer après analyse de biopsies (Thompson et al., 2004).

5) Gradation histologique du cancer de la prostate

La gradation histologique joue un rôle important dans le diagnostic et la prise en charge du cancer de la prostate. Dans ce manuscrit, seules les deux méthodes les plus répandues seront décrites : la classification TNM et le score de Gleason.

Classification TNM des cancers de la prostate		
T1		Tumeur non palpable et non visible à l'imagerie. Découverte par biopsie
T2	T2a T2b T2c	Tumeur limitée à la prostate Atteinte de moins de 50% d'un lobe Atteinte de plus de 50% d'un lobe Atteinte des 2 lobes
T3	T3a T3b	Extension au-delà de la capsule Atteinte du tissu extra-capsulaire Atteinte des vésicules séminales
T4		Extension aux organes adjacents: Col vésical, sphincter, rectum, paroi pelvienne, muscle élévateur
N	N0 N1	Métastases ganglionnaires régionales Absence de métastase ganglionnaire régionale Atteinte ganglionnaire régionale
M	M0 M1	Métastases à distance Atteinte osseuse présumée Absence de métastase à distance Métastases à distance

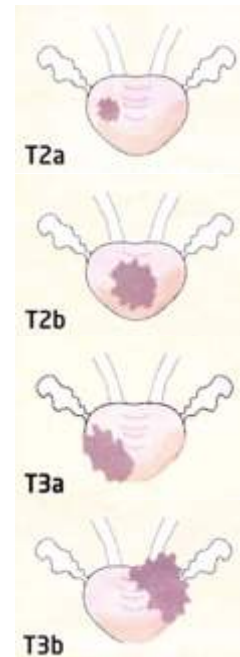


Figure 13 : La classification TNM des cancers de la prostate

T : Tumor, N : Node, M : Metastasis

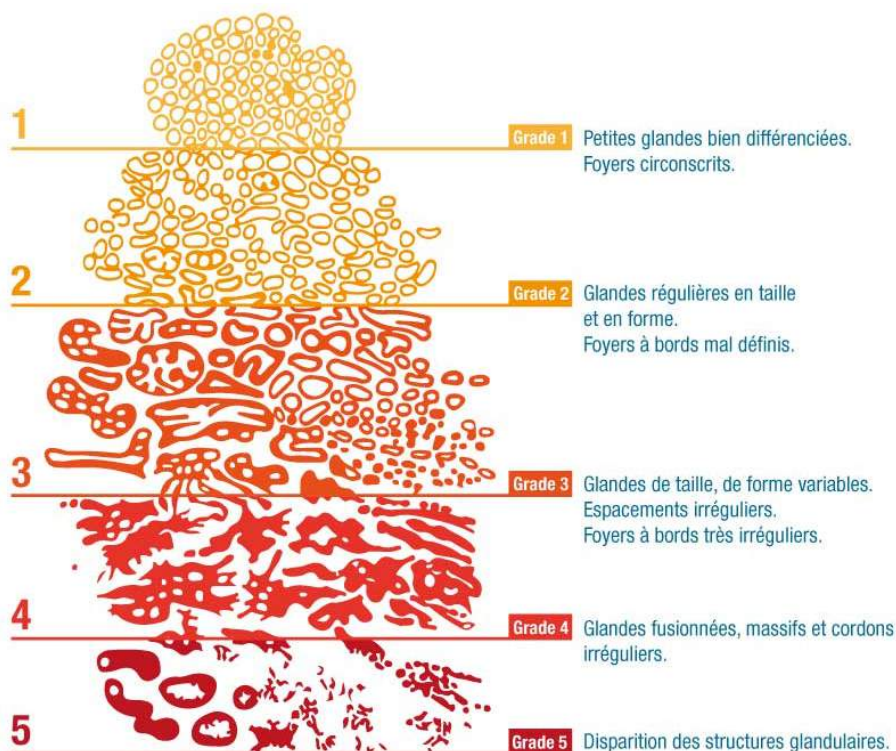


Figure 14 : Représentation schématique de la gradation de Gleason

Le score de Gleason est établi à partir de biopsies de prostate, analysées par un anatomopathologiste qui attribue un score représentant la somme des deux grades les plus souvent retrouvés dans la tumeur. Pour cela, il s'appuie sur l'aspect des acini et des cellules épithéliales ; et leur état de différenciation. Plus les cellules se dédifférencient, plus le cancer est à un stade avancé.

Source : <https://prostanet.com/cancer-prostate/le-diagnostic/l-anatomopathologie/>

(1) La classification TNM (Tumor, Node, Metastase)

C'est une classification internationale élaborée par Pierre Denoix entre 1943 et 1952, qui s'appuie sur l'extension anatomique. TNM est le sigle symbolisant la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N, node) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est ensuite affectée à un coefficient (**figure 13**). La lettre T est cotée de T0, quand la lésion primitive n'est pas retrouvée, à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximum de la lésion et la fixation aux organes voisins. La lettre N, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. La lettre M est cotée M0 en l'absence de métastase connue ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple.

(2) Le score de Gleason

Le cancer de la prostate est caractérisé par sa grande hétérogénéité. Elle est observée à plusieurs niveaux : entre la tumeur primaire et les métastases, entre deux tumeurs primaires indépendantes dans le même épithélium, et au sein d'une même tumeur (Yadav et al., 2018). Face à cette problématique, il a été développé un outil qui prend en compte cette hétérogénéité : c'est le score de Gleason, qui est actuellement la méthode la plus couramment utilisée pour évaluer la gravité du cancer de la prostate et dont la première publication remonte à 1974. Il est basé sur la somme de deux grades les plus prévalents du foyer néoplasique (**figure 14**), et sa valeur pronostique a été démontrée (Gleason and Mellinger, 1974). Cette classification procède en 2 étapes :

(a) *Détermination du grade de chaque composante de la tumeur*

Cinq grades sont distingués lors de l'analyse anatomo-pathologique et témoignent de l'agressivité de la tumeur. Les grades 1 et 2 correspondent à des lésions rares et principalement localisées au niveau de la zone transitionnelle, très rarement au niveau de la zone périphérique. Le grade 3 est la forme la plus fréquente des tumeurs glandulaires de la zone périphérique observée lors de biopsies. Le grade 5 représente les composantes tumorales les plus agressives, faiblement différenciées.

(b) Etablissement du score de Gleason

Le score est établi en réalisant l'addition des grades des deux contingents les plus représentés. Le premier chiffre représente le grade le plus représenté. Ainsi le score (4+3) est plus péjoratif que le score (3+4). Un score inférieur ou égal à 6 représente un cancer bien différencié et de meilleur pronostic. Un score égal à 7 correspond à une tumeur moyennement différenciée. Enfin, un score supérieur ou égal à 8 est de moins bon pronostic avec un cancer très peu différencié.

6) Prise en charge du cancer de la prostate

Lorsque le diagnostic du cancer de la prostate est posé, le médecin décide de la prise en charge du patient. Pour cela, il prend en compte l'état du patient, son âge, l'étendue de la maladie et les risques de comorbidité. Il orientera ensuite le patient vers une prise en charge allant d'un suivi attentif jusqu'aux chimiothérapies dans les stades les plus avancés.

(1) Suivi attentif

La surveillance active est possible lorsque la maladie est diagnostiquée à un stade précoce. En effet il s'agit d'un cancer indolent dont l'évolution peut être très longue sans avoir d'effet sur la santé du patient. Dans ce cas, des analyses régulières du taux de PSA, un toucher rectal tous les 6 mois ainsi qu'une biopsie à 1 an puis tous les 2 à 3 ans jusqu'aux premiers signes de progression tumorale sont suffisants. Des traitements curatifs seront mis en œuvre uniquement si la maladie progresse (Dunn and Kazer, 2011).

(2) Prostatectomie radicale

En cas de cancers localisés, une des approches est la chirurgie avec la prostatectomie radicale, qui correspond à une ablation totale de la prostate. Cependant, parmi les effets indésirables cette chirurgie peut causer des dysfonctionnements érectiles et des incontinences urinaires (Lepor, 2005).

(3) Radiothérapie

En cas de cancers localisés de bas grade ou de grade intermédiaire, la radiothérapie peut être utilisée. Le but de ce traitement est d'utiliser des faisceaux externes (XRT : eXternal beam Radiation Therapy) pour délivrer une dose curative au sein de la prostate sans endommager les tissus alentours (vessie, rectum et intestin). Les rayons entraînent la mort des cellules malignes en bloquant leur multiplication. Les effets indésirables les plus courants de

ce traitement consistent en des rougeurs de la peau, et une inflammation de la vessie et de l'urètre.

C'est pourquoi il existe aussi la radiothérapie interne où cette fois l'administration d'une source radioactive (grain) se fait directement dans la prostate par le biais d'une seringue sous guidage à ultrasons transrectale (Dunn and Kazer, 2011). De la même manière que la radiothérapie externe, les rayons entraînent la mort des cellules avoisinantes. L'avantage de cette technique est que la portée des radiations émises est faible, ce qui permet de protéger les tissus voisins. Les effets secondaires classiques sont l'apparition d'ecchymoses, des saignements au niveau du lieu d'insertion des implants, des troubles urinaires et parfois également des troubles de l'érection.

(4) Les ultrasons focalisés de haute intensité ou HIFU (High Intensity Focused Ultrasound, Ablaterm)

Lorsque le cancer est localisé, de bas grade, et lorsque la radiothérapie n'a pas eu d'effet, les ultrasons focalisés de haute intensité peuvent être utilisés. Ce traitement se fait à l'aide d'une sonde endorectale pour obtenir un effet d'ablation thermique. Les principaux effets secondaires seront des troubles urinaires et de l'érection.

(5) La cryothérapie

Le but de ce traitement est de congeler le tissu à l'aide d'une sonde transurétrale introduite sous guidage à ultrasons au sein de la prostate qui est alors gelée à des T°C de -100°C à -200°C pendant 10min (Mouraviev and Polascik, 2006). La plupart des praticiens n'utilisent pas ce traitement en première ligne, mais cela peut représenter une alternative quand les autres traitements n'ont pas été efficaces.

Si le cancer est non localisé, les approches ciblées physiques présentées ci-dessus ne sont pas adaptées. Il y aura nécessité d'approches systémiques et chimiques pour cibler à la fois les cellules tumorales et les métastases.

(6) Hormonothérapie

Les cellules tumorales prostatiques ayant besoin des androgènes pour proliférer et survivre, la privation androgénique est un traitement de référence dans la prise en charge du cancer de la prostate localisé de haut grade ou localement avancé. Lorsque les ganglions sont atteints et que des métastases sont détectées, l'hormonothérapie est utilisée pour une longue durée.

La privation des androgènes peut se faire de différentes manières. Tout d'abord avec l'ablation des testicules, visant à supprimer la source de testostérone qu'ils produisent. La quantité de testostérone se retrouve alors diminuée de 90 à 95% et entraîne une régression rapide de la tumeur. Une approche médicamenteuse peut également être mise en place avec soit des analogues (Busérelina, Gosérelina, Leuproréline, Triptoréline), soit des antagonistes (Dégarelix) de la LHRH (*Luteinizing Hormone Releasing Hormone*), qui est responsable de la libération de LH au niveau de l'hypophyse, laquelle stimule la production de testostérone par les testicules. Enfin, on peut également coupler ce dernier traitement à l'utilisation d'anti-androgènes qui entrent en compétition avec la testostérone ou la DHT pour la fixation sur AR (Klotz, 2006) (Cyprotérone, le Flutamide et la Nilutamide).

L'hormonothérapie entraîne une régression tumorale avec notamment une régression des cellules épithéliales luminales (Huggins and Hodges, 1941). Elle est systématiquement prescrite chez les patients souffrant de tumeurs localement avancées ou métastatiques, seule ou en association avec un autre traitement. Cependant, les bénéfices de l'hormonothérapie ne perdurent pas après 30 mois de traitement (Harris and Reese, 2001). La réponse au traitement hormonal n'est que transitoire et la majorité des patients progressent vers un statut androgéno-résistant. En effet, la signalisation androgénique sera active sans que le ligand ait besoin de se fixer sur le récepteur. Cela peut être dû à une mutation gain de fonction de AR, retrouvée dans certaines tumeurs primaires (Buchanan et al., 2001), mais d'autres mécanismes peuvent également être mis en place (pour revue, voir (Sharifi, 2013)).

(7) La chimiothérapie

Il s'agit de l'approche chimique de référence pour les cancers métastatiques et/ou résistants à la castration. Il s'agit d'un traitement non curatif permettant de cibler les cellules tumorales quelle que soit leur localisation et d'agir sur leurs mécanismes de prolifération. En général, c'est le Docetaxel qui bloque la mitose ou encore le Mitoxantrone, un intercalant de l'ADN, qui sont utilisés. Plus récemment, des molécules innovantes ont été développées comme le cabazitaxel qui bloque la mitose cellulaire et améliore de manière significative le pronostic de la maladie (Bono et al., 2010). Cependant, les effets secondaires de ce type de traitement sont nombreux : baisse de la qualité de vie, myélosuppressions (perte des globules blancs), dérèglements gastro-intestinaux, ou encore neuropathies périphériques (Tannock et al., 2004).

CHAPITRE 2 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du cancer de la prostate

I. Principales altérations associées à la carcinogenèse prostatique

En général, les carcinomes se forment dans des tissus qui s'auto-renouvellent et dans lesquels les cellules qui se divisent acquièrent des altérations somatiques dans des gènes de régulateurs de croissance. On considère que dans les tumeurs, entre 2 et 20 mutations « drivers », c'est-à-dire conférant un avantage sélectif à la cellule (prolifération plus importante, résistance à l'apoptose, ...), sont nécessaires pour qu'un cancer devienne malin (Beerenwinkel et al., 2007). Contrairement à d'autres cancers, le cancer de la prostate est caractérisé par un faible taux de mutations (environ 1 par mégabase, soit 7 à 15 fois moins que pour le cancer du poumon ou le cancer de la peau par exemple) et a donc peu de mutations « drivers » (Berger et al., 2011), ce qui explique qu'il y ait peu de formes familiales. C'est la combinaison d'altérations génomiques ainsi que la dérégulation de voies des facteurs de croissances qui vont aboutir au développement du cancer de la prostate.

A) Altérations génétiques

1) NKX3.1

La diminution de l'expression de *NKX3.1* est associée au cancer de la prostate. Elle est due notamment à une perte de son hétérozygotie, qui est un évènement à la fois précoce dans la tumorigénèse prostatique et très fréquent puisqu'il est retrouvé dans 60 à 80% des tumeurs de la prostate (Bethel et al., 2006; Abate-Shen et al., 2008). L'inactivation de *NKX3.1* peut également se faire *via* des évènements épigénétiques inhibiteurs et notamment par l'hyper-méthylation de son promoteur (Asatiani et al., 2005).

L'invalidation de *Nkx3.1* chez la souris entraîne la formation de PIN présentant des altérations de la lame basale, du stroma et de l'expression de marqueurs de différenciation épithéliale (Kim et al., 2002a). *In vitro*, NKX3.1 permet de réduire la prolifération cellulaire et le pouvoir tumorigène de cellules xénogreffées (Lei et al., 2006), notamment *via* la régulation de la phosphorylation de AKT et donc de la signalisation PI3K/AKT. De plus, NKX3.1 stabilise indirectement la protéine P53, essentielle dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Elle stimule également l'activité de la protéine Topoisomérase I et l'expression de gènes codants pour des protéines anti- ou pro-oxydantes telles que GPX2 et 3 (*Glutathion*

peroxidase 2 et 3) et PRDX6 (*peroxiredoxine 6*), rendant les cellules plus résistantes au stress oxydatif et aux dommages à l'ADN, caractéristiques essentielles de la carcinogenèse (Bowen et al., 2007). NKX3.1 est également capable d'interagir avec des protéines comme G9a (ou EHMT2, *euchromatic histone lysine N-methyl transferase 2*) ou UTY (*Ubiquitously Transcribed Tetra-trico-peptide Repeat containing Y-linked* ; paralogue de UTX). Ces protéines sont impliquées dans le contrôle du niveau de méthylation de l'ADN et donc la régulation de l'expression de gènes, et leur activité est souvent dérégulée dans les cancers (Lau and Zhang, 2000).

NKX3.1 est le régulateur d'acteurs clés de la progression tumorale dans la prostate dont le récepteur des androgènes (AR) (Tan et al., 2012). L'inhibition ciblée de *Nkx3.1* par interférence ARN induit une diminution de l'expression de AR dans les cellules LNCaP (Tan et al., 2012). En sens inverse, une diminution ciblée de AR conduit à une diminution de l'accumulation de NKX3.1 (Bieberich et al., 1996; Prescott et al., 1998). Ces deux protéines se contrôlent donc négativement ce qui met en place une boucle de rétrocontrôle négatif qui assure le maintien de leur concentration à un niveau physiologique. Toute altération des niveaux de l'un ou de l'autre de ces protéines perturbe cet équilibre. Ainsi, des souris porteuses d'une délétion homozygote pour *Nkx3.1* présentent une augmentation de l'accumulation des protéines AR (Lei et al., 2006). Ceci suggère que NKX3.1 est capable de moduler l'action de AR sur ses cibles (Anderson et al., 2012). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par analyse de co-localisation et qui ont identifiées NKX3.1 et AR sur les mêmes régions dans les promoteurs des gènes *Psa*, *Myc* et *Trmprss2* (Tan et al., 2012).

Il est important de noter que la perte de *Nkx3.1* chez la souris n'est pas suffisante pour déclencher la progression tumorale jusqu'à des stades de carcinogenèse invasive. Elle précède d'autres altérations génétiques associées à la progression tumorale et affectant les gènes codant *TP53* ou *PTEN* (Baca et al., 2013). Elle est donc considérée comme un événement initiateur, qui prédispose au cancer en ouvrant la voie à d'autres altérations oncogéniques. En effet, des souris mutantes pour *Nkx3.1* et *Pten* par exemple, présentent des PIN mais aussi des carcinomes invasifs avec parfois des métastases dans les ganglions lymphatiques et les organes distants (Abate-Shen et al., 2003).

2) La fusion TMPRSS2-ERG

Des fusions de gènes sont classiquement retrouvées parmi les altérations géniques qui accompagnent le cancer de la prostate. En général, elles se font au niveau de la région 5' non transcrite d'un gène régulé par les androgènes, qui fusionne avec la région codante d'un

facteur de transcription ETS (*E-Twenty Six*) (Tomlins et al., 2005). Les facteurs de transcription ETS font partie d'une famille d'une vingtaine de membres impliqués dans divers processus biologiques : contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de l'hématopoïèse ou encore de l'angiogenèse (Seth and Watson, 2005). La fusion entraîne ainsi un détournement du programme transcriptionnel de l'expression de l'ETS par les androgènes. Elle joue un rôle important puisque 6 tumeurs primaires sur 10 sont associées à une dérégulation du programme transcriptionnel des ETS (Cancer Genome Atlas Research Network, 2015).

La fusion la plus décrite dans les cancers primaires de la prostate associe le gène codant la sérine protéase régulée par les androgènes, *TMPRSS2* (*Transmembrane Protease, serine 2*), et le gène codant l'ETS, *ERG* (*ETS related gene*). Cela conduit à l'expression d'une protéine ERG tronquée en N-Terminal qui, placée sous le contrôle du promoteur de *TMPRSS2*, devient alors sensible aux androgènes (Tomlins et al., 2005; Wang et al., 2006a). Cette fusion est un évènement précoce mais non initiateur retrouvée dans environ 50% des cancers localisés de la prostate (Albadine et al., 2009; Baca et al., 2013). Elle joue cependant un rôle important car cette forme tronquée de *Erg* conduit, avec d'autres altérations comme la perte de *Pten*, au développement de PIN de haut grade puis de carcinomes chez la souris (Carver et al., 2009). Elle favorise aussi la progression du cycle cellulaire (Tomlins et al., 2005), et peut stimuler *in vitro* les capacités invasives des cellules par l'activation de l'expression des métalloprotéases *Mmp3* et *Mmp9* notamment et une modification des membranes basales (Tomlins et al., 2008).

La fusion génique *TMPRSS2-ERG*, bien que la plus fréquente, n'est pas la seule fusion génique observée dans le cancer de la prostate. En effet, il existe d'autres fusions associant des facteurs de transcription ETS avec les promoteurs de *SLC45A3* (sensible aux androgènes) ou encore *HNRP2ABI* (insensible aux androgènes). De la même manière, *ERG* n'est pas le seul ETS impliqué. Des fusions avec *ETV1* sont observées dans 8% des tumeurs primaires (Tomlins et al., 2005), avec *ETV4* dans 4% des tumeurs primaires (Tomlins et al., 2006), et avec *FLII* (dans moins de 1% des tumeurs primaires) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2015; Attard et al., 2016). Les différents facteurs de transcription issus de ces fusions permettent l'expression illégitime de gènes qui peuvent influencer le développement du cancer de la prostate. Ainsi, la fusion *Tmprss2-Etv1* stimule les capacités invasives des cellules tumorales de prostate en réponse aux androgènes (Cai et al., 2007). Une fusion *Tmprss2-Etv1* dans un contexte *Pten*^{-/-} *in vivo* favorise également les capacités invasives des adénocarcinomes formés (Baena et al., 2013). La fusion génique impliquant *ETV4* conduit à

une augmentation de son expression, or celle-ci est corrélée à un score de Gleason élevé et donc à la gravité du cancer (Qi et al., 2015). De plus, la diminution de son expression dans des cellules PC3 induit une diminution de leur prolifération et de leurs capacités invasives ainsi qu'une réversion partielle de leur transition épithélium-mésenchyme. Celle-ci est notamment due à une diminution de l'expression de *Mmp2* et *Mmp9*, impliquées dans la dégradation des matrices extracellulaires et donc dans l'invasion tumorale. Enfin, FLI1 pourrait être impliquée dans l'angiogenèse, essentielle à la tumorigenèse. En effet, des études *in vitro* montrent que l'expression de *Fli1* est capable d'activer VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*), stimulant l'angiogenèse et donc la progression maligne (Nagano et al., 2010). De plus, il module l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose comme la protéine anti-apoptotique BLC2, ou du cycle cellulaire avec Rb par exemple (Li et al., 2015).

3) Surexpression de Myc

La surexpression de *c-MYC* est retrouvée dans les stades précoces de tumorigenèse (Gurel et al., 2008) et dans plus de 37% des cancers de la prostate métastatiques (Kumar et al., 2016). Elle est associée à l'existence des zones de variations génomiques (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*) mises en évidence lors d'études génétiques pangénomiques, GWAS (*Genome Wide Association Study*) (Eeles et al., 2014). Parmi les régions identifiées, il est retrouvé la région 8q24, une région non codante, proche du proto-oncogène *MYC* (ou *c-Myc*, *Myelocytose*) (Ahmadiyeh et al., 2010; Freedman et al., 2011).

c-MYC est un facteur de transcription. Son activation en réponse à des facteurs trophiques mobilisant la voie WNT/ β -caténine ou encore de la signalisation Sonic Hedgehog, se traduit également par une augmentation de la transcription de l'ADN ribosomique et conduit en cascade à une augmentation de l'activité ribosomale dans les cellules (Arabi et al., 2005) ce qui amplifie le potentiel traductionnel de la cellule (Lin et al., 2012). c-MYC stimule aussi l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire comme celui codant la sous-unité TERC de la télomérase (Baena-Del Valle et al., 2018). A l'inverse, C-MYC inhibe l'expression de gènes contrôlant l'apoptose ou la différenciation cellulaire et du suppresseur de tumeur *Nkx3.1* (Iwata et al., 2010).

Son implication dans le contrôle de ces processus cellulaires fondamentaux explique que sa surexpression est associée à un mauvais pronostic dans le cancer de la prostate (Ribeiro et al., 2006).

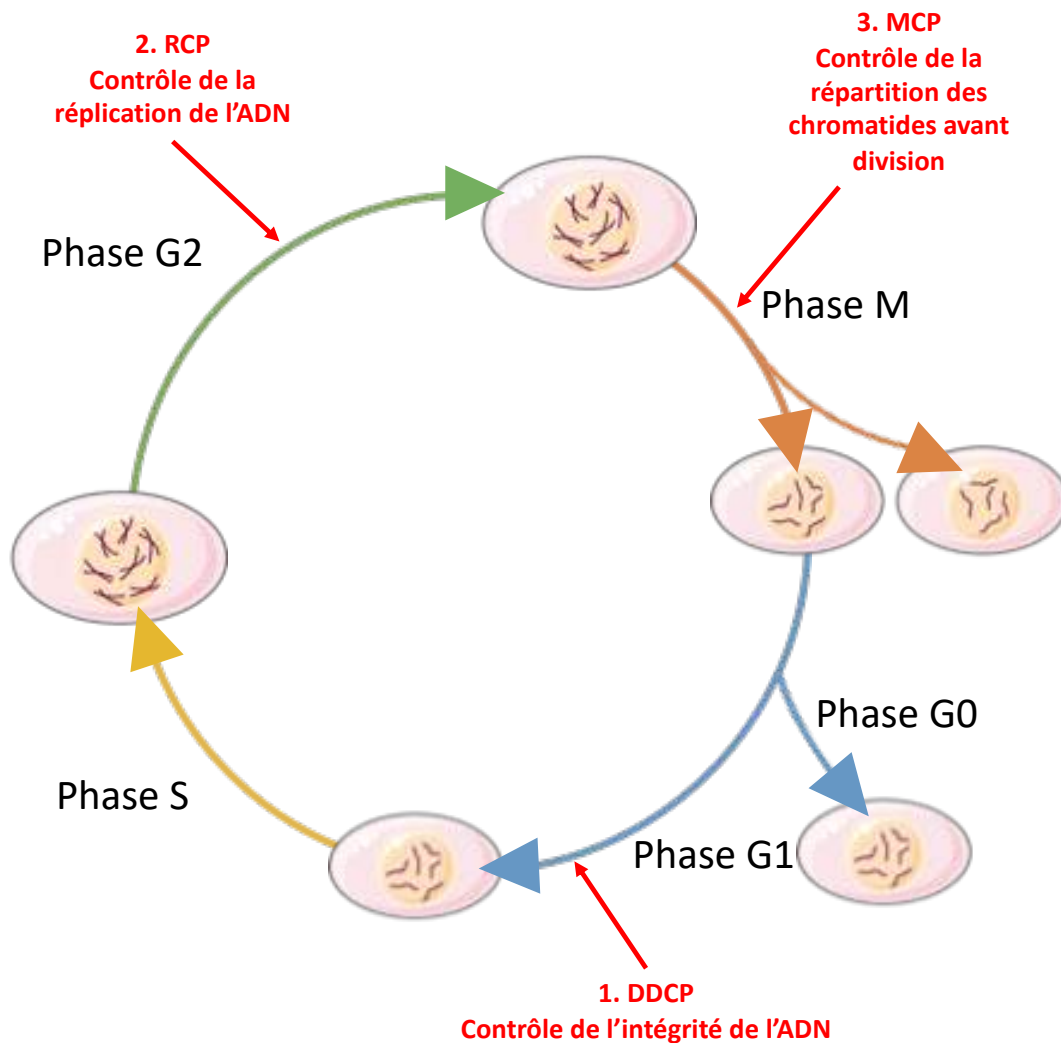


Figure 15 : le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se divise en quatre phases majeures. Durant la phase G1, la cellule reçoit des signaux mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare pour effectuer correctement la phase S (Synthèse). Durant la phase S, l'ADN se réplique. La phase G2 est une phase de croissance durant laquelle la cellule se prépare à la mitose. Enfin, la phase M correspond à la phase de Mitose où les chromosomes se séparent dans deux cellules filles. Il y a une phase supplémentaire, la phase G0 de quiescence, correspondant à un stade de non division.

Tout au long du cycle, plusieurs points de contrôle ont lieu pour détecter les éventuelles anomalies et imposer l'arrêt du cycle cellulaire. Ils vérifient trois processus essentiels au cours du cycle cellulaire : (1) l'absence de lésion au niveau de l'ADN avant le passage G1/S ; (2) l'absence d'anomalies lors de la réplication de l'ADN avant le passage G2/M et enfin (3) la répartition équitable des chromatides sœurs au niveau des fuseaux mitotiques avant la division en phase M.

DDCP : *DNA Damage Checkpoint* ; RCP : *Replication Checkpoint* ; MCP : *Mitotic Checkpoint*.

Dans un contexte de perte de *Pten* chez la souris, la surexpression de *c-Myc* est capable de récapituler les étapes du cancer primaire de la prostate (Ellwood-Yen et al., 2003). De plus, son expression forcée dans des cellules prostatiques humaines non cancéreuses est suffisante pour immortaliser ces cellules (Gil et al., 2005). Etant donné son rôle essentiel dans la carcinogenèse prostatique, empêcher sa surexpression et ses activités pro-oncogéniques en aval pourrait être intéressant dans le cas de carcinogenèse prostatique, c'est pourquoi des études sont en cours afin de voir le potentiel d'inhibiteurs de c-MYC (Rebello et al., 2017).

4) Les gènes de régulation du cycle cellulaire

Le maintien de l'homéostasie épithéliale nécessite un contrôle de la balance entre la prolifération et l'apoptose. L'épithélium prostatique est caractérisé par un faible niveau de prolifération, contrebalancé par un faible niveau d'apoptose (Berges et al., 1995). Dans les carcinomes, la prolifération est 7 à 10 fois plus importante que la normale et, dans les cancers avancés ou les métastases, l'apoptose est diminuée de 60% en moyenne. Les altérations affectant la balance prolifération/apoptose semblent donc jouer un rôle essentiel dans la carcinogenèse prostatique.

Le cycle cellulaire est constitué de 4 phases : la phase S (de synthèse de l'ADN), la phase M de mitose avec la division cellulaire, et deux phases intermédiaires de croissance G1 et G2 (**figure 15**). Plusieurs points de contrôle sont présents tout au long du cycle et sont essentiels pour l'arrêt ou la mise en route de la division cellulaire. Ces différents points de contrôle vont impliquer : pRB (*retinoblastoma gene product*), des cyclines/CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) et des inhibiteurs de CDK. L'augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses laisse penser à une perte de contrôle des éléments de régulation du cycle cellulaire.

(1) Les cyclines/CDKs et les inhibiteurs de CDK

Les complexes cyclines/CDK sont constitués d'une sous-unité régulatrice (les cyclines) et d'une sous-unité catalytique (les CDKs) et agissent comme des protéines kinases pour des acteurs spécifiques des phases du cycle cellulaire. Six complexes cycline/CDKs sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire : CyclineB/CDK1, CyclineD/CDK4, CyclineD/CDK6, CyclineE/CDK2, CyclineA/CDK2 et CyclineA/CDK1 (**figure 16**). Le contrôle de l'activité de ces complexes se fait d'une part en modulant la quantité des cyclines disponibles pour se fixer sur les CDKs, et d'autre part par l'intermédiaire des protéines

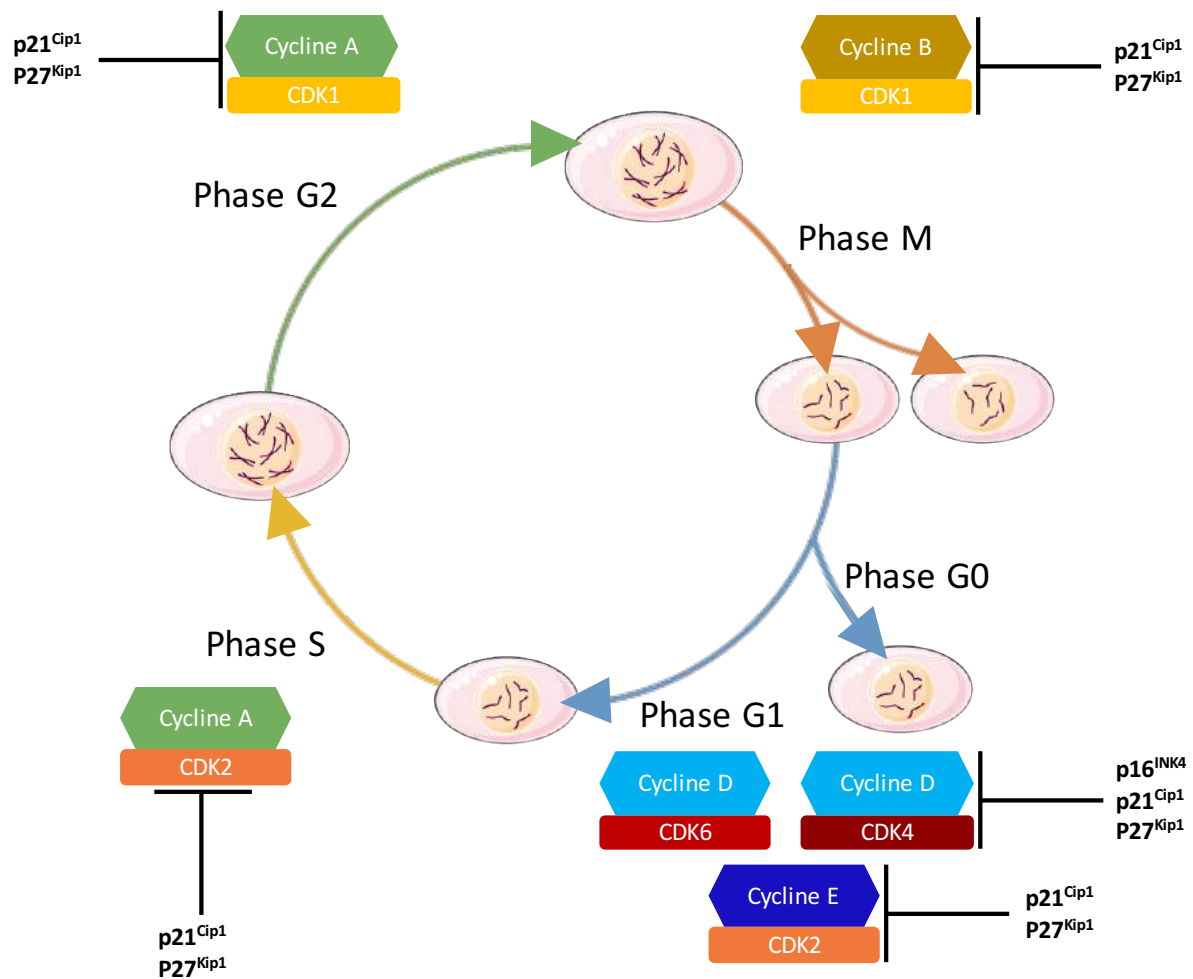


Figure 16 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cycline/CDK et les CKI

Les complexes Cycline/CDK se chargent du bon déroulement du cycle cellulaire. Les complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 sont exprimés durant la phase G1 afin de préparer la cellule à la phase S. Le complexe cycline E/CDK2 s'assure de la transition G1/S. Le complexe cycline A/CDK2 permet la réplication de l'ADN durant la phase S, tandis que le complexe cycline A/CDK1 permet l'entrée de la cellule en phase M. Enfin, le complexe cycline B/CDK1 est exprimé durant la transition G2/M et conduit la progression de la mitose.

Les complexes cyclines/CDKs sont eux-mêmes régulés par des inhibiteurs de CDK, les CKI : p21, p27 et p16.

CDK : *Cyclin-Dependent Kinase*

CKI : *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*

inhibitrices CKI (*Cdk inhibitor*) telles que p16, p21 ou p27, qui se lient aux cyclines ou aux Cdks pour bloquer leur activité.

- *p27^{kip1}* et *p21*

Les altérations les plus fréquentes retrouvées dans le cancer de la prostate affectent *p27^{kip1}*, une CKI clé dans la transition G1/S (Macri and Loda, 1998). Si le gène est rarement muté, une modification de localisation sub-cellulaire est observée. Elle est due à des altérations de sa phosphorylation et/ou de son ubiquitination. Une perte de fonction associée à un changement de localisation est retrouvée dans environ 50% des cancers de la prostate (Macri and Loda, 1998), et elles sont associées aux scores de Gleason élevés et à un mauvais pronostic (Yang et al., 1998). Une délétion de *p27^{kip1}* chez la souris induit une augmentation de la taille des prostates (Kiyokawa et al., 1996). De plus, l'augmentation de la prolifération de cellules d'adénocarcinomes humains (MDA PCa) suite à une stimulation par des facteurs de croissance tels qu'EGF est associée à une diminution de l'accumulation protéique de *p27^{kip1}* (Ye et al., 1999).

La protéine CKI p21 est impliquée dans le contrôle du passage G1/S et G2/M. Bien que des mutations de *p21* aient été décrites dans des tumeurs primaires (Gao et al., 1995), l'implication de cette protéine dans le cancer de la prostate n'est pas claire. En effet, des études *in vitro* montrent que l'expression de *p21* induit l'arrêt de la croissance cellulaire (Gotoh et al., 2003; Roy et al., 2007). Cependant, des niveaux élevés de p21 sont associés à un score de Gleason élevé et à un mauvais pronostic (Rigaud et al., 2004) ; alors que d'autres études suggèrent une relation inverse entre les niveaux de p21 et la survie (Sarkar et al., 1999). Enfin, d'autres auteurs ont suggéré des fonctions compensatoires entre p27 et p21, car la délétion de l'un ou de l'autre *in vitro* n'induit pas d'effet au niveau de la croissance et de la prolifération cellulaire alors que la délétion des deux conduit à une augmentation de la croissance cellulaire et de la prolifération (Roy et al., 2008).

- *Skp2*

La protéine SKP2 (*S-phase kinase associated protein*) est une E3 ligase capable de reconnaître des substrats spécifiques, de les ubiquitinyler et donc d'entraîner leur dégradation par le protéasome. Elle joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire, en modulant la disponibilité des régulateurs des différentes phases du cycle, comme p21 et p27 (Tsvetkov et al., 1999). Plusieurs études montrent son implication dans le développement du cancer de la prostate chez l'homme (Lu et al., 2002; Yang et al., 2002; Wang et al., 2008; Lin et al., 2010)

et également dans la résistance au traitement de cette pathologie (Yang et al., 2016). La surexpression de *Skp2* *in vivo* chez la souris induit une augmentation de la prolifération cellulaire conduisant à la formation d'hyperplasies au niveau de la prostate (Shim et al., 2003). De plus, l'accumulation protéique de SKP2 est corrélée au stade de développement de la maladie, et pourrait donc servir comme biomarqueur pour évaluer la gravité de la maladie. En dehors de son rôle de modulation des acteurs du cycle cellulaire, SKP2 est également liée à d'autres acteurs importants dans la carcinogenèse prostatique tels que AR, PTEN ou TWIST. Ainsi, la signalisation par les androgènes est capable d'inhiber l'expression de *Skp2* et donc la croissance cellulaire en augmentant la quantité de p27 disponible (Chuu et al., 2011; Kokontis et al., 2014). L'inhibition *in vitro* de la signalisation PI3K/AKT entraîne elle une diminution de l'expression de *Skp2* et donc une augmentation de l'expression de facteurs en aval tel que p27 (van Duijn and Trapman, 2006). SKP2 est également capable de stabiliser la protéine TWIST, impliquée dans la transition épithélium mésenchyme, et a donc un rôle jusque dans les stades tardifs de la maladie (Ruan et al., 2017).

- *p16^{Ink4A}*

p16^{Ink4A}, un autre CKI régulateur du cycle cellulaire, est impliqué dans la régulation du passage de la phase G1 à la phase S : en se liant à CDK4 et CDK6, il inhibe leur liaison avec la cycline D, qui est essentielle pour l'activité catalytique cycline/CDK. Une diminution de l'expression de *p16* est observée dans les stades tardifs et résulte fréquemment d'une délétion ou d'une hyperméthylation inhibitrice affectant son gène (Jarrard et al., 1997). La diminution de l'expression de *p16^{Ink4A}* favorise l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, et bloque également la sénescence des cellules épithéliales prostatiques.

- *La cycline D1*

Enfin, la cycline D1 est une protéine nucléaire du cycle cellulaire permettant le passage de la phase de croissance G1 à la phase de synthèse S. L'expression de la *cycline D1* dans des cellules LNCaP augmente la quantité de cellules en phase S, et est associée à une augmentation de phosphorylation de RB et de la protéine E2F1. Ces mêmes cellules transplantées *in vivo* dans des souris forment des tumeurs plus rapidement que des cellules LNCaP ne surexprimant pas la *cycline D1* (Chen et al., 1998).

(2) La protéine RB

Le suppresseur de tumeur RB (*Retinoblastoma*) est un inhibiteur du passage de la phase G1 à la phase S. Il agit en inhibant le facteur de transcription E2F, qui contrôle

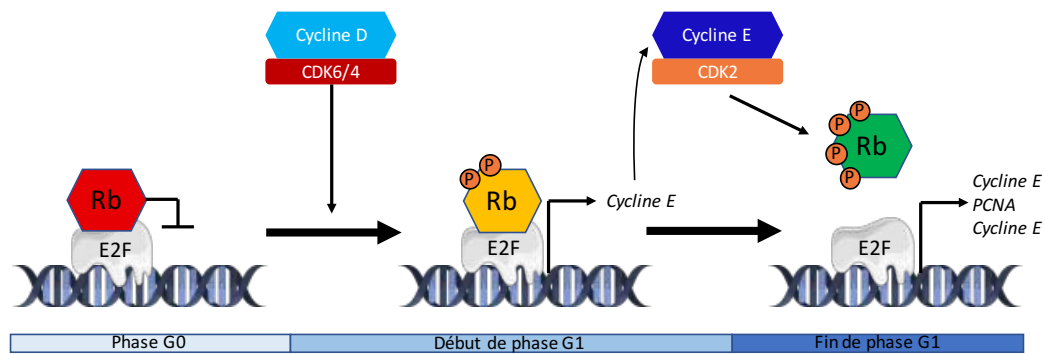


Figure 17 : Rôle de la protéine Rb dans le contrôle du cycle cellulaire

La protéine Rb non phosphorylée se lie au facteur de transcription E2F, empêchant sa liaison à l'ADN et l'activation de la transcription des gènes cibles.

Une fois activé, le complexe cycline D/CDK4 phosphoryle Rb, permettant la transcription de gènes cibles d'E2F tels que la *cycline E*. La Cycline E produite s'associe à CDK2 pour phosphoryler Rb. Cette forme hyperphosphorylée de Rb se détache du facteur de transcription E2F. Ce dernier active alors l'expression de gènes codant pour des protéines nécessaires au déroulement de la phase S telles que la *cycline A* et PCNA.

Rb : *Retinoblastoma*

E2F : *E2 Factor*

PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

CDK : *Cyclin-Dependent Kinase*

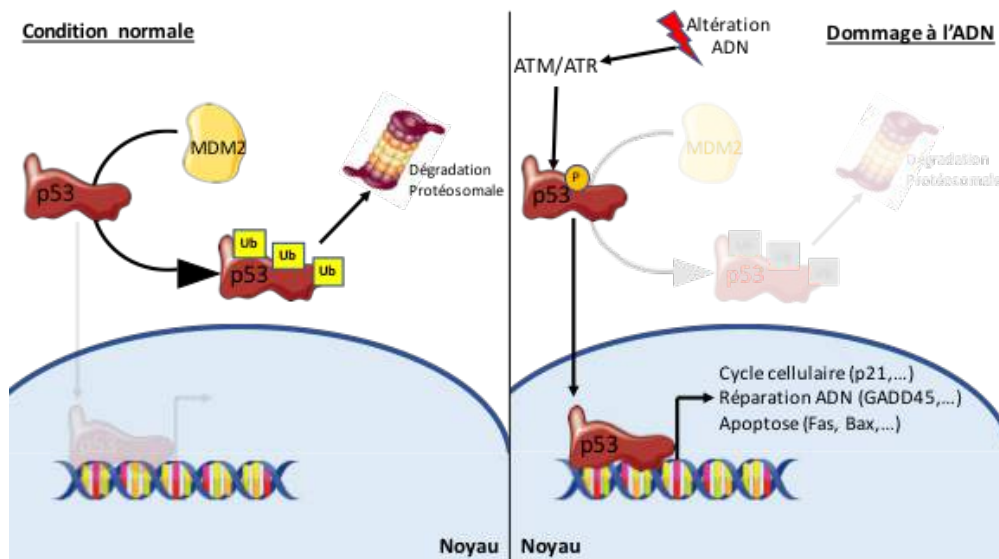


Figure 18 : Rôle de la protéine p53 dans le maintien de l'intégrité cellulaire

En condition normale, la protéine P53 est trop instable et ne peut s'accumuler suffisamment pour atteindre le seuil de stimulation de la transcription. La dégradation de P53 se fait suite à l'ubiquitinylation par MDM2, ce qui dirige p53 vers la dégradation protéosomale. Suite à un dommage à l'ADN, des protéines telles que ATM/ATR phosphorylent P53, la stabilisant et permettant son accumulation. Il active alors l'expression de gènes spécifiques permettant la réparation de l'ADN mais aussi de p21, permettant de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 ou G2 jusqu'à ce que l'ADN endommagé soit réparé et que les taux de P53 et de P21 retombent. Si les dommages à l'ADN sont trop importants, P53 exprime des gènes tels que *Fas* ou *Bax* pour induire l'apoptose de la cellule. MDM2 : *Double Minute-2 Murine*, ATM/ATR : *Ataxia Telangiectasia Mutated/ATM Rad3-related* BAX : *BCL-2 associated X protein*

l'expression de la *cycline E* et *A* par exemple, impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Chen et al., 2009) (**figure 17**). La perte d'hétérozygotie de la partie chromosomique 13q14 incluant la région contenant *Rb* est retrouvée dans 50% des tumeurs de la prostate (Cooney et al., 1996). Cette délétion est en partie responsable des dérégulations de la voie de signalisation de RB conduisant à une activation aberrante de E2F1 dans 34% des tumeurs primaires et 74 % des tumeurs métastatiques (Tomlins et al., 2007). Chez la souris, l'inactivation de *Rb* conduit à la formation de néoplasies intraépithéliales (Maddison et al., 2004) ou d'adénocarcinomes si toute la famille *Rb* est invalidée (*Rb/p107/p130*) (Hill et al., 2005), soulignant son rôle de suppresseur de tumeur. La perte de fonction de *Rb* est également capable d'altérer l'organisation du cytosquelette de la cellule et d'augmenter ses capacités de migration et d'invasion, essentielles dans les derniers stades de la maladie (Thangavel et al., 2017). Enfin, il est important de noter que *AR* est un gène cible de E2F1, sa dérégulation permet donc une augmentation de l'expression de *AR* et peut donc être impliquée dans la progression vers les stades de résistance à la castration chimique (Sharma et al., 2010).

(3) La protéine p53

La protéine P53 (*Tumor protein 53*) est produite par un gène localisé au locus 17p13. Son expression est physiologiquement augmentée dans les cellules subissant un stress conduisant à des dommages à l'ADN (Steelman et al., 2011) afin de faciliter la réparation de l'ADN. Lorsque que les altérations sont irréversibles, P53 conduit la cellule vers l'apoptose (**figure 18**), ce qui permet l'élimination des cellules irrémédiablement endommagées. P53 est ainsi capable de dicter le destin cellulaire et est donc essentielle pour le maintien de l'intégrité cellulaire. En condition physiologique, P53 est maintenue à un niveau faible par la protéine MDM2 (*double minute-2 murine*), une ubiquitine ligase E3 responsable de son ubiquitinylation et de sa dégradation protéasomale (Moll and Petrenko, 2003). Suite à des dommages à l'ADN, la protéine P53 est phosphorylée, par le complexe ATM/ATR par exemple, ce qui la stabilise en empêchant son interaction avec MDM2. Il en résulte une accumulation de la protéine P53, qui transloque dans le noyau pour réguler l'expression de gènes (Hill et al., 2011), modulant le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la senescence. Dans le cancer de la prostate, *P53* est muté dans environ 35% des cas (Ecke et al., 2010). Cette mutation est associée à tous les stades de progression tumorale jusqu'aux stades métastatiques (Stapleton et al., 1997). Chez la souris, l'inactivation de *Pten* et de *p53* conduit à une tumorigenèse plus agressive que celle observée avec l'inactivation de *Pten* seule (Chen et al., 2005), avec la présence de métastases accompagnées d'une plus forte létalité.

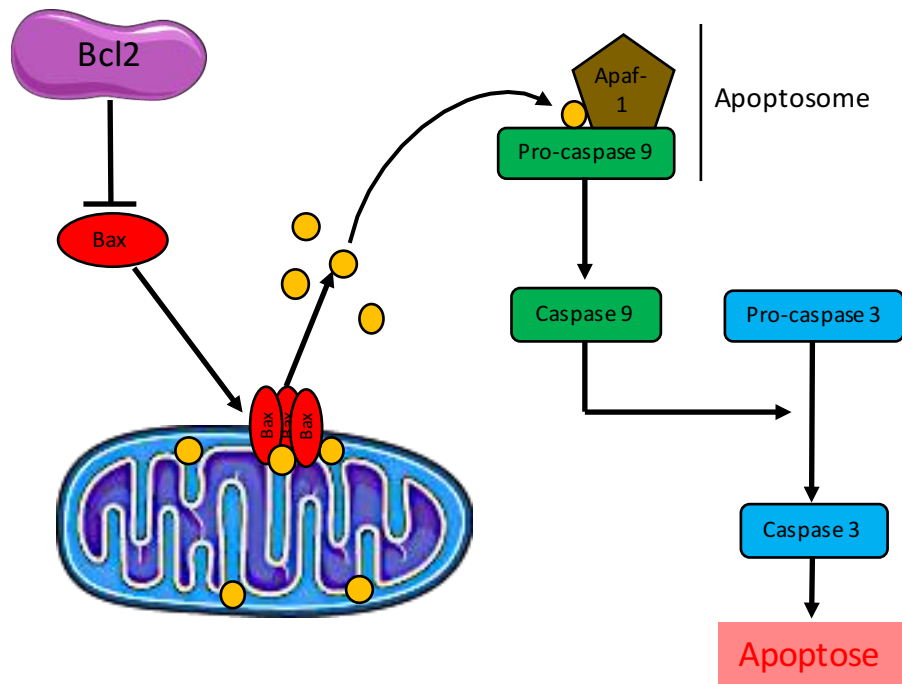


Figure 19 : Rôle de la protéine BCL2 dans la voie apoptotique intrinsèque

Le processus apoptotique intrinsèque implique des protéines apoptotiques telles que BAX. Cette protéine, en réponse à une lésion de l'ADN ou suite à une perte des signaux de survie, transloque au niveau de la mitochondrie. Elle forme un pore permettant la sortie du cytochrome C, normalement piégé dans la mitochondrie. L'association du cytochrome C avec les protéines APAF-1 et Pro-caspase 9 permet la formation de l'apoptosome, conduisant à la cascade d'activation des caspases et à l'apoptose cellulaire.

BAX : *BCL-2 associated X protein*

APAF-1 : *Apoptotic Protease Activating Factor 1*

5) L'apoptose

Pour contrebalancer une prolifération trop importante, un épithélium sain met en jeu des mécanismes apoptotiques permettant l'élimination des excédents cellulaires et donc le maintien de l'homéostasie tissulaire. Il s'agit de mort cellulaire programmée induite par deux voies principales. La première, appelée voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort), fait intervenir des protéases, les caspases (Taylor et al., 2008), responsables d'une cascade d'activation qui *in fine* conduit à la mort de la cellule. La deuxième voie, la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale), fait intervenir deux acteurs majeurs : la mitochondrie qui intègre les signaux pro- et anti-apoptotiques et BCL-2 (*B-cell lymphoma-2*) responsable de la perméabilisation de la mitochondrie qui libère alors le cytochrome C, responsable du déclenchement de la cascade apoptotique *via* les caspases (**figure 19**).

Dans la prostate, la protéine BCL2 est restreinte au niveau des cellules basales (Hockenbery et al., 1991). Par contre, elle est surexprimée dans les carcinomes prostatiques (Colombel et al., 1993), et confère ainsi une résistance à l'apoptose aux cellules cancéreuses. De fait, l'inhibition de BCL2 *in vitro* induit une sensibilité des cellules plus importante à l'apoptose suite à une exposition aux UV (Lin et al., 2007). De plus, le passage à un statut androgéno-indépendant pour une tumeur est corrélé à une hausse de l'expression de BCL2 (Lin et al., 2007), et ce passage peut être bloqué par l'expression de Bax2, protéine pro-apoptotique antagoniste de BCL2.

B) Dérèglement des molécules de signalisation cellulaire

Afin de contrôler différents processus biologiques tels que la prolifération ou la différenciation à l'échelle tissulaire, des facteurs régulateurs sont produits par la cellule elle-même (autocrinie) ou par les cellules du microenvironnement (paracrinie). Ces relations autocrines ou paracrines sont essentielles dès les premières étapes de développement prostatique, comme décrit précédemment dans ce manuscrit. Elles permettent également le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Leur dérégulation conduit les cellules tumorales à la réactivation de processus développementaux tels que la prolifération ou la croissance par exemple. Il n'est donc pas surprenant qu'elles soient très impliquées dans le processus de tumorigenèse prostatique.

Les signaux moléculaires permettant le contrôle de ces voies de signalisation agissent *via* des récepteurs membranaires. Plusieurs de ces molécules ont été identifiées comme

impliquées dans la tumorigenèse prostatique : le TGB-bêta, VEGF, HGF, FGF, EGF et IGF. Le rôle et la signalisation médiée par IGF et EGF seront détaillés dans ce manuscrit.

1) La signalisation HGF

Le facteur de croissance HGF (*Hepatocyte growth factor*) active le récepteur c-MET. Dans la prostate, HGF est produit par les fibroblastes du stroma, et exerce ses effets majeurs sur le compartiment épithélial (Kasai et al., 1996). La fixation de HGF au niveau de c-Met induit sa phosphorylation et l'activation de voies de signalisation intracellulaires telles que les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR. HGF stimule la croissance cellulaire, la motilité cellulaire et l'invasion matricielle dans les cellules cancéreuses, en induisant une diminution de l'accumulation de protéines constituant les jonctions serrées par exemple (Martin et al., 2014). L'augmentation du niveau sérique de HGF est également un indicateur de stade avancé de cancer de la prostate (Gupta et al., 2008; Yasuda et al., 2009) et une étude récente sur 111 patients montre une corrélation entre le niveau de *Hgf* dans les tumeurs et la récurrence du cancer après prostatectomie radicale (Nishida et al., 2015). *In vitro*, HGF augmente la synthèse d'ADN et *in fine* la prolifération des cellules (Kasai et al., 1996). Son récepteur c-MET est aussi dérégulé dans les tumeurs prostatiques. Sa surexpression est retrouvée dans plusieurs lignées cellulaires de cancer de la prostate et est corrélée à l'émergence de cancer de la prostate résistants à la castration (Humphrey et al., 1995) et de métastases (Verhoef et al., 2016). En conséquence, l'utilisation d'inhibiteurs de la signalisation c-Met sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate réduit la migration, l'invasion, et la prolifération des cellules (Dai and Siemann, 2010). Cibler la signalisation HGF/C-Met pourrait être une piste thérapeutique à explorer dans le cas de cancers résistants à la castration et métastatiques.

2) La signalisation VEGF

VEGF est le nom générique d'une famille de ligand qui inclut VEGF-A, -B, -C et -D ; VEGF-A qui peut produire d'autres isoformes suite à un épissage alternatif. La fixation du ligand sur le récepteur à activité tyrosine kinase VEGFR, dont il existe plusieurs isoformes (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) induit sa dimérisation, suivie de son autophosphorylation conduisant à l'activation de voies de signalisation intracellulaires, notamment PI3K/AKT et MAPK. Ces nombreux ligands et leurs récepteurs peuvent favoriser la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation ou encore l'angiogenèse.

VEGF est un stimulateur de l'angiogenèse en condition physiologique et est donc essentiel lors du développement embryonnaire et lors de la réparation de vaisseaux. Les

vaisseaux formés permettent l'apport de nutriments et d'oxygène dans les cellules afin d'assurer leur survie et donc de maintenir l'homéostasie des tissus (Takahashi and Shibuya, 2005). En condition pathologique, lors de la tumorigenèse, les cellules tumorales prolifèrent et forment des masses de plus en plus volumineuses. Elles se trouvent donc de plus en plus éloignées des vaisseaux présents dans le tissu sain. Afin d'avoir un apport en nutriments et en oxygène suffisant pour leur survie les cellules tumorales vont réactiver la signalisation VEGF permettant la mise en place de nouveaux vaisseaux. Plusieurs signaux peuvent conduire à la réactivation de l'angiogenèse et notamment l'hypoxie. En effet, une diminution de la pression partielle en oxygènes dans un tissu conduit à la stabilisation et à l'activation de facteurs de transcription tels que les HIFs (*Hypoxia-inducible factors*). Ces derniers permettent l'activation de l'expression de *Vegf*, et donc le développement de nouveaux vaisseaux pour pallier au manque d'oxygène.

Une surexpression de *VEGF* et de son récepteur est retrouvée dans des tissus prostatiques tumoraux (Stefanou et al., 2004). De plus, dans la prostate, les androgènes favorisent la production par les cellules stromales et cancéreuses de VEGF, stimulant ainsi l'angiogenèse et donc la croissance tumorale (Levine et al., 1998). Logiquement, pratiquer une ablation hormonale sur un modèle murin de carcinogenèse entraîne une baisse de l'expression de *Vegf* et de l'angiogenèse qui lui est associée, et une induction de l'apoptose cellulaire (Stewart et al., 2001).

3) La signalisation FGF

La famille FGF est constituée d'une vingtaine de ligands différents se liant sur les récepteurs FGFR1, -2, -3 et -4. La liaison du ligand sur son récepteur conduit à l'activation de diverses signalisations intracellulaires : PLC γ (*Phospholipase C γ*), PI3K, MAPK et STATS (*Signal transducers and activators of transcription*) (Ornitz and Itoh, 2015). Une augmentation de la signalisation FGFR est observée dans des échantillons de cancer de la prostate à un stade avancé (Feng et al., 2017). En modèle murin une activation du récepteur épithélial *Fgfr1* ainsi que l'expression stromal du ligand *Fgf10* sont décrits, interrogeant sur le rôle de la signalisation FGF dans la carcinogenèse (Acevedo et al., 2007; Memarzadeh et al., 2007). Expérimentalement, l'inhibition de FGFR sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate entraîne une diminution des capacités invasives des cellules ; de plus, ces mêmes effets sont retrouvés *in vivo* sur des modèles de xénogreffes (Feng et al., 2017).

4) La signalisation TGF β

La signalisation TGF β se fait *via* deux récepteurs membranaires : TGF β RI et TGF β RII ; et trois ligands : TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3. Après fixation du ligand sur le récepteur, celui-ci stimule de nombreuses cibles, toutes impliquées dans l'apoptose ou la prolifération cellulaire. Le premier effecteur intracellulaire peut être SMAD2 ou SMAD4, qui après phosphorylation transloque dans le noyau où il stimule l'expression de gènes tels que le facteur pro-apoptotique BAX (Guo and Kyprianou, 1999). Il inhibe l'expression d'autres gènes tels que le gène anti-apoptotique *BCL2*. SMAD agit aussi au niveau du cytosol en activant le facteur d'initiation de l'apoptose, caspase-1. En condition physiologique, TGF β inhibe donc la prolifération cellulaire et stimule l'apoptose, jouant un rôle de suppresseur de tumeur (Bello-DeOcampo and Tindall, 2003). Dans la prostate, il est produit par les cellules stromales et exerce ses effets de manière paracrine sur les cellules épithéliales (Bhowmick et al., 2004). Dans le cas du cancer de la prostate, il existe une corrélation entre l'expression de TGF β 1 et la progression de la maladie (Truong et al., 1993; Kakehi et al., 1996). A l'inverse, une diminution de l'expression de *TGF β RI* et *TGF β RII* est observée dans des échantillons humains de tumeurs de prostate et de métastases (Guo et al., 1997), et semble impliquée dans le développement du cancer : des expériences de xénogreffes de LNCaP montrent que la restauration de la signalisation *via* le TGF β 1 en surexprimant *TGF β RII*, permet de diminuer la croissance des tumeurs en activant l'apoptose dépendante de la caspase-1 (Guo and Kyprianou, 1999).

Ces différents signaux cellulaires permettent la dérégulation de l'homéostasie et contribue au développement du cancer grâce à l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Dans le cancer de la prostate, deux voies de signalisation majeures sont particulièrement impliquées : la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT/mTOR.

II. Implication des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR dans le cancer de la prostate

La voie PI3K/AKT/mTOR joue un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire, régulant à la fois la prolifération, le cycle cellulaire, la croissance, la survie, la migration ou encore l'angiogenèse. La plupart des protéines constituant cette voie sont des suppresseurs de tumeurs ou à l'inverse des proto-oncogènes qui peuvent être mutés, délétés ou encore surexprimés et sont donc essentiels dans le développement tumoral.

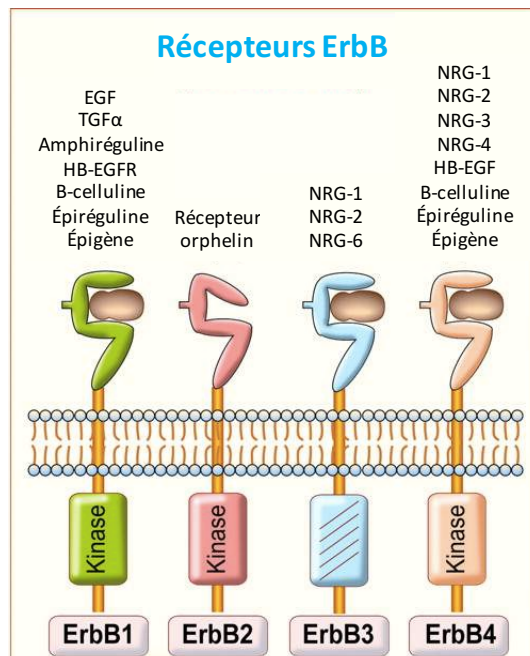


Figure 20 : La famille ErbB

La famille des récepteurs tyrosines kinases ErbB est composée de quatre membres qui forment des homo- ou hétérodimères une fois leur ligand fixé. Seul ErbB2 n'a pas de ligand identifié, mais un domaine intracellulaire actif avec une activité tyrosine kinase. ErbB3 a plusieurs ligands identifiés mais un domaine intracellulaire inactif. Son activité biologique nécessite donc son hétérodimérisation avec un autre récepteur ErbB.

NRG : neuréguline ; HB-EGF : *Heparin Binding Growth Factor*, EGF : *Epidermal Growth Factor*

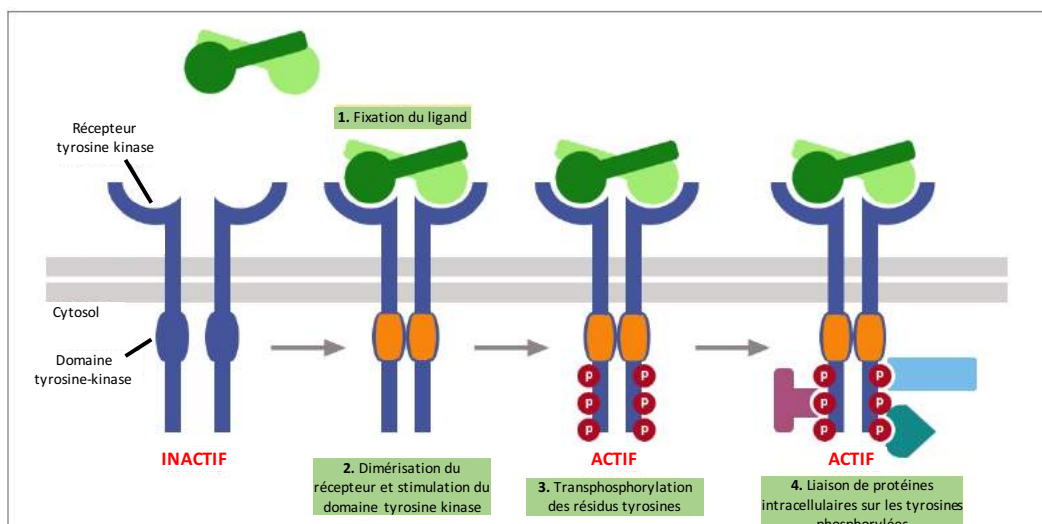


Figure 21 : Mode d'activation des récepteurs tyrosine-kinase

Lorsqu'ils sont inactifs, les récepteurs tyrosines kinases (RTK) sont sous forme de monomère au niveau de la membrane plasmique. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne sa dimérisation avec un autre RTK. L'activation et la dimérisation du récepteur entraîne un changement de conformation qui se transmet au domaine catalytique intracellulaire. Les deux dimères vont alors se trans-phosphoryler au niveau de groupements tyrosines afin de s'autoactiver. Ces tyrosines servent alors de sites de liaison pour des molécules de signalisation intracellulaire.

La voie RAS/MAPK est principalement constituée de protéines kinases et est impliquée dans la prolifération, la survie ou encore la différenciation cellulaire.

Les principaux ligands responsables de l'activation de ces voies sont les facteurs de croissance tels que IGF, PDGF, le TGF α ou encore EGF ; mais également des cytokines telles que des interleukines par exemple. Le lien entre ces ligands et la signalisation intracellulaire se fait principalement *via* des récepteurs membranaires tels que le IGFR, PDGFR ou encore EGFR. Leur activation conduira au recrutement de voies de signalisation intracellulaires. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons sur EGFR, récepteur principal capable de recruter les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR.

A) Le récepteur EGFR

1) Généralités

L'EGFR est un membre de la famille des récepteurs de type tyrosine kinase Erb. Elle est constituée de quatre membres : EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4) qui ont chacun des spécificités de liaison aux ligands différentes (**figure 20**). Ces ligands sont tous synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires de type I, et libérés sous forme de ligand soluble suite à un clivage protéolytique par des protéines de type métalloprotéase membranaire. La liaison du ligand sur le récepteur conduit à un changement conformationnel et permet la dimérisation du récepteur EGFR (**figure 21**). Ce rapprochement déclenche l'autophosphorylation de la partie intracellulaire du récepteur et notamment au niveau des résidus thréonines 1068, 1086, 1148 et 1173. La phosphorylation de ces résidus permet l'activation du récepteur et constitue également des sites de liaisons pour des protéines adaptatrices possédant un domaine SH2 (*SRC homology 2*) telles que SHC, CRK, GRB2 ou encore GAB1, et qui pourront activer des voies de signalisation en aval telles que la voie RAS/MAPK (Lowenstein et al., 1992; Batzer et al., 1994) ou la voie PI3K/AKT (Mattoon et al., 2004). La diversité des fonctions régulées par la famille ErbB est rendue possible par le choix du ligand qui se lie sur le récepteur, qui provoque la formation de différents dimères de récepteurs. Dans ce manuscrit nous allons nous concentrer sur le récepteur EGFR, responsable de l'activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR.

2) Mécanismes de régulation

Etant impliqué dans des processus fondamentaux tels que la prolifération, la survie, la différenciation ou encore la migration cellulaire, une régulation fine de l'activation de ce

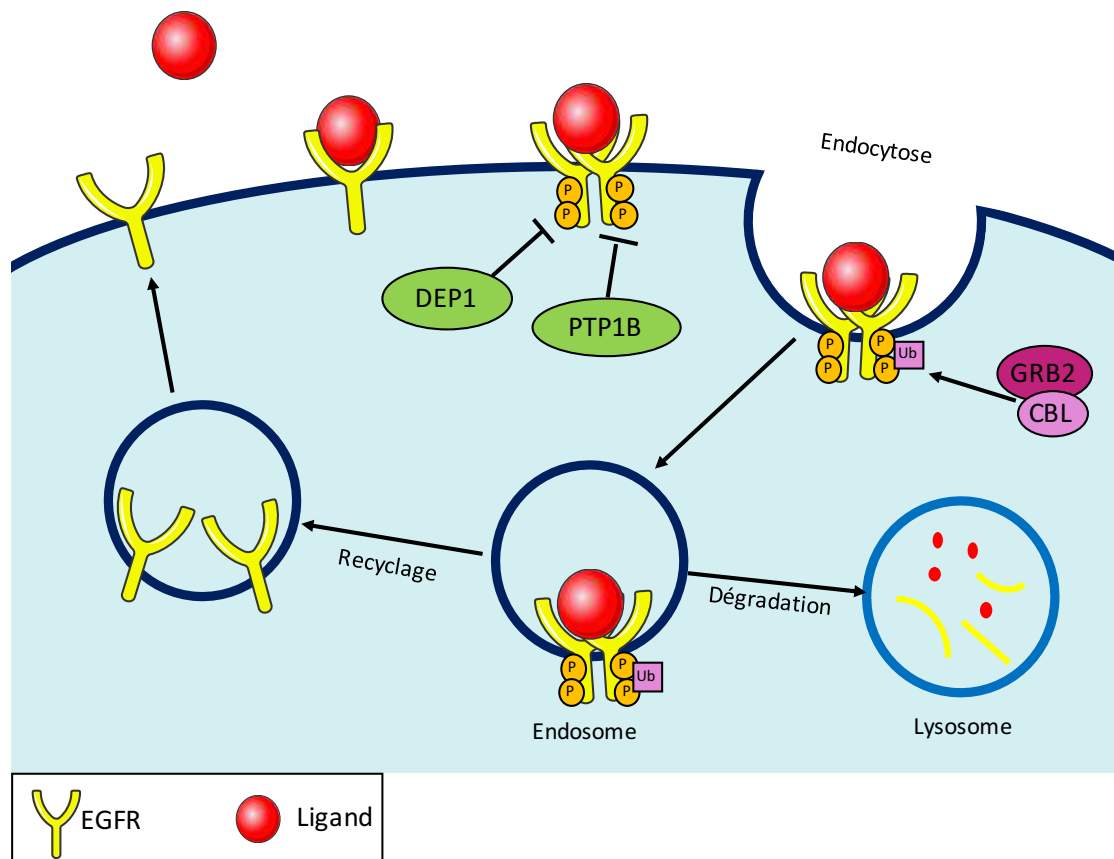


Figure 22 : Régulation de l'activation du récepteur EGFR

Plusieurs niveaux de régulation existent pour réguler l'activation du récepteur. Après fixation du ligand, dimérisation et activation du récepteur, des protéines telles que DEP1 ou PTP1B peuvent intervenir pour inhiber le récepteur. Ce sont des phosphatases qui retirent les sites de liaisons pour des protéines intracellulaires, empêchant la transduction du signal. Le récepteur peut aussi être endocyté et ubiquitinylé par des protéines ubiquitines E3-ligases telles que la protéine CBL. Une fois dans l'endosome, le récepteur est recyclé et renvoyé à la membrane ou dégradé dans une vésicule lysosomale.

Un dernier niveau de régulation plus tardif et non représenté sur ce schéma est la production de régulateurs tels que LRIG-1 ou SOCS4/5 qui comme les DEP1, PTP1B ou encore CBL, vont favoriser l'ubiquitinylation et/ou l'endocytose puis la dégradation du récepteur.

CBL : *Casitas B-lineage Lymphoma*

LRIG-1 : *Leucine Rich and ImmunoGlobulin like domains protein 1*

SOCS4/5 : *Suppressor of Cytokine Signalling*

DEP1 : *Density Enhanced Phosphatase 1*

PTP1B : *Protein Tyrosine Phosphatase*

récepteur est nécessaire pour assurer l'homéostasie cellulaire et la survie de l'organisme. Les mécanismes de régulation peuvent être rapides avec la déphosphorylation du récepteur ou son internalisation ; ils peuvent nécessiter un délai plus important avec l'expression de régulateurs négatifs ou la dégradation lysosomale (**figure 22**).

Le premier niveau de régulation contrôle l'activité et la disponibilité du récepteur. Il implique des protéines qui déphosphorylent le récepteur, les phosphatases. Parmi elles on retrouve DEP1 (*Density Enhanced Phosphatase 1*) (Berset et al., 2005) ou encore PTP1B (*Protein Tyrosine Phosphatase*) (Haj et al., 2003), qui permettent d'inhiber l'activation des récepteurs en supprimant les sites de liaisons pour des protéines intermédiaires de signalisation ou des protéines adaptatrices. De plus, en inactivant le récepteur, elles favorisent son endocytose (Madhus and Stang, 2009). Son internalisation permet d'affaiblir la signalisation *via* EGFR en dirigeant le récepteur vers le recyclage ou la dégradation, ce qui met en jeu des protéines ubiquitines ligases telles que CBL (Levkowitz et al., 1998).

Le deuxième niveau de régulation nécessite un délai plus important. Il consiste en la mise en place d'une boucle autocrine de régulation *via* la transcription et la traduction d'inhibiteurs de la voie, essentiels pour restreindre l'activité d'EGFR, un phénomène appelé régulation négative rétroactive (Citri and Yarden, 2006). Les premiers inhibiteurs rétroactifs inductibles (IFI : *Inducible Feedback inhibitors*) produits *de novo* après activation d'EGFR ont été découverts chez la drosophile (Perrimon and McMahon, 1999). Des IFIs ont ensuite été découverts chez les mammifères : LRIG-1 (*leucine rich and immunoglobulin like domains protein 1*), SOCS-5 et SOCS-4 (*suppressor of cytokine signalling 5, 4*) et MIG-6/RALT (*receptor-associated late transducer ou MIG6*) qui favorisent l'ubiquitinylation, et/ou l'endocytose puis la dégradation du récepteur (Fiorentino et al., 2000; Gur et al., 2004; Nicholson et al., 2005; Segatto et al., 2011). Sprouty 2, régule également l'activation d'EGFR. En effet, lors de la liaison d'EGF sur le récepteur, la phosphorylation du résidu tyrosine 55 entraîne la liaison de Sprouty 2 qui favorise le recrutement de l'ubiquitine ligase CBL, et donc l'ubiquitinylation et la dégradation d'EGFR (Egan et al., 2002; Rubin et al., 2003). Comparée aux protéines impliquées dans la déphosphorylation du récepteur, la régulation négative rétroactive nécessite la transcription et la traduction de nouvelles protéines, ce qui génère un temps de latence. En effet, les taux en ARNm de RALT (Fiorentino et al., 2000), SOCS4 et SOCS5 (Kario et al., 2005) atteignent leur maximum 60 minutes après l'activation du récepteur. Pour LRIG-1 l'induction est plus lente encore puisque les taux maximums en ARNm sont observés entre 3 et 4h après la stimulation d'EGFR (Gur et al., 2004).

La superfamille des récepteurs à l'insuline

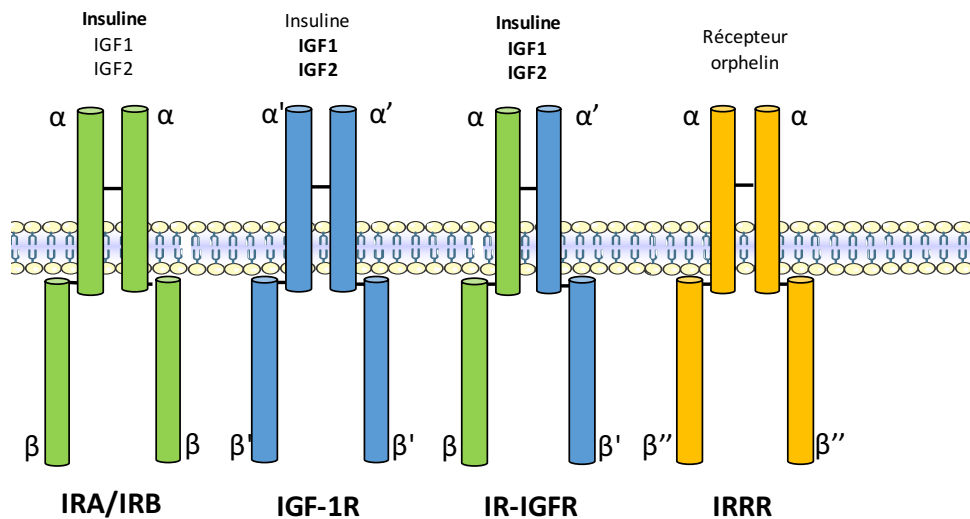


Figure 23 : La superfamille des récepteurs à l'insuline

La superfamille des récepteurs à l'insuline est constituée de trois membres principaux : le récepteur à l'insuline (IR) avec deux isoformes A et B, le récepteur IGF-1R (*Insulin like growth factor 1 receptor*) et l'IRRR (*Insulin receptor related receptor*). Chacun de ces récepteurs auront des affinités plus importantes pour certains ligands (en gras). Des récepteurs hybrides tels que IR-IG1R peuvent se former et sont capables de lier avec une haute affinité l'insuline, IGF1 et IGF2 (*Insulin-like Growth Factor*).

L'activation des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR peut également se faire après activation de la superfamille des récepteurs à l'insuline dont les principaux membres sont le récepteur à l'insuline (InR) et l'IGFR (*insulin like growth factor receptor 1*) (**figure 23**), avec pour principaux ligands l'insuline, IGF1 et IGF2. Il s'agit de récepteurs tyrosines kinases, dont la principale différence avec l'EGFR repose sur le fait que l'homo- ou hétérodimère est pré-associé au niveau de la membrane plasmique. De plus, les principales protéines adaptatrices se liant sur ces récepteurs sont les IRS (*insulin receptor substrate*), une famille composée de 4 membres (IRS 1, 2, 3, 4) et dont les deux principaux représentants sont IRS1 et IRS2 (Sun et al., 1991, 1995). SHC (*Src homology collagen*) et les protéines GRB10/14 et SH2B2 représentent d'autres protéines substrats.

B) La voie PI3K/AKT/mTOR et la délétion PTEN

La plupart des protéines constituant cette voie sont des suppresseurs de tumeurs ou à l'inverse des proto-oncogènes qui peuvent être mutés, délétés ou encore surexprimés, elles sont donc essentielles dans le développement tumoral.

1) Les acteurs de la signalisation PI3K/AKT/mTOR

(1) Les PI3K

L'effecteur primaire de la voie est PI3K, dont la famille est divisée en trois classes (I, II, III) suivant la spécificité vis-à-vis du substrat et la structure. Il s'agit d'hétérodimères constitués d'une sous-unité régulatrice p85 (α ou β), p55 (α ou γ) ou p50 α ; et d'une sous-unité catalytique p110 (α , β ou δ) (Vanhaesebroeck et al., 2012; Thorpe et al., 2015). Alors que les isoformes p110 α et β sont ubiquitaires, l'isoforme p110 δ est majoritairement exprimée dans les leucocytes (Thorpe et al., 2015). Les PI3K de classe 1 sont les plus étudiées. Constituées des sous-unités p110 et p85, elles sont activées par les récepteurs tyrosines kinases tels qu'EGFR. En absence de stimulation, la sous-unité p85 régulatrice est liée à la sous-unité catalytique p110 et l'inhibe (Thorpe et al., 2015). Après activation, la sous-unité p85 se lie directement au niveau des tyrosines phosphorylées du récepteur par son domaine SH2. La liaison au récepteur activé peut alternativement être indirecte et mobiliser des protéines adaptatrices telles que GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), GAB (*Grb2-associated binding protein*) ou encore IRS1 (*Insulin receptor substrate 1*). Au final, cela conduit à l'activation de la sous-unité catalytique. Celle-ci phosphoryle un composé

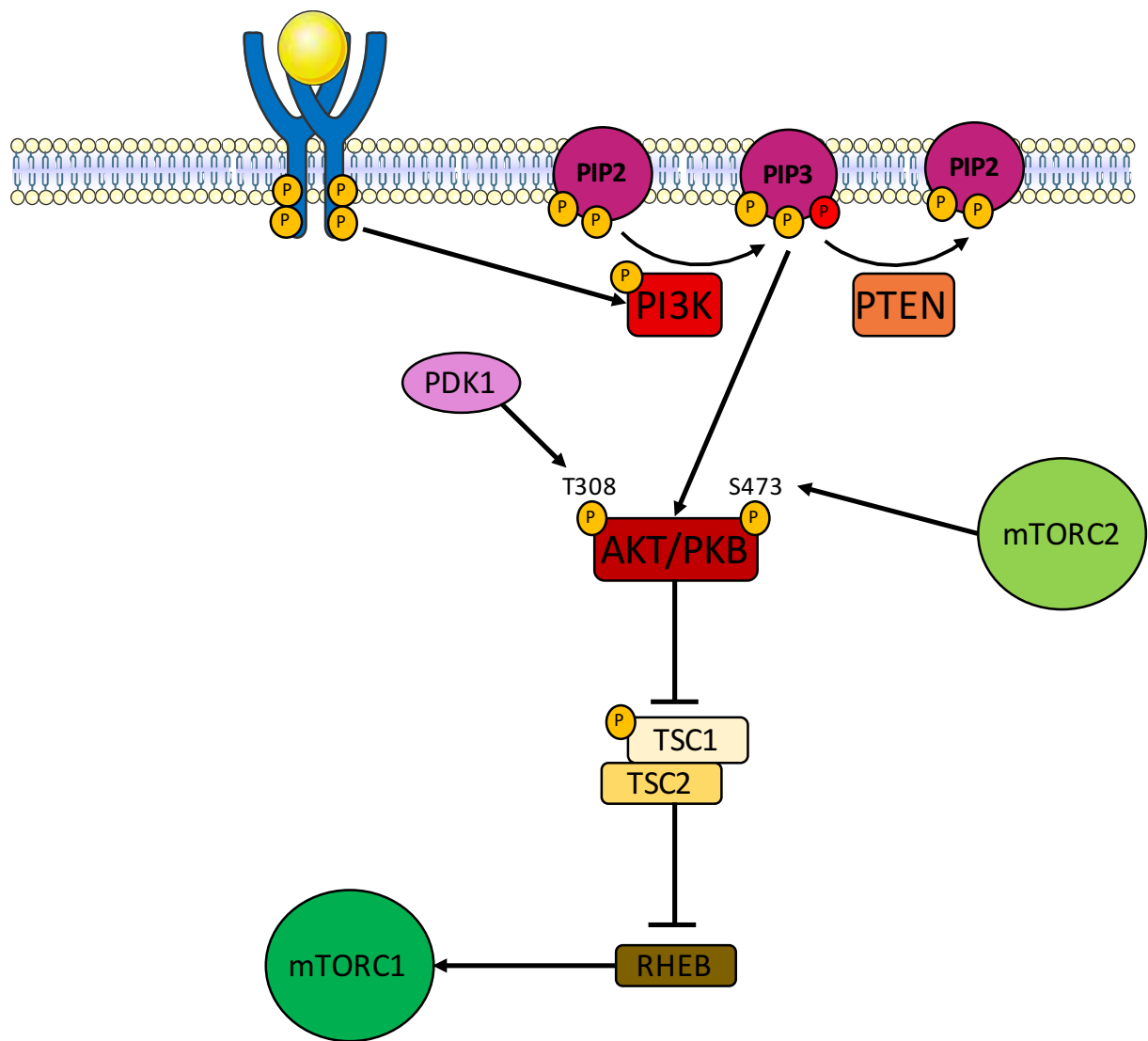


Figure 24 : La voie PI3K/AKTmTOR

Après stimulation du récepteur tyrosine kinase par un facteur de croissance, PI3K est activé par phosphorylation. Il permet ensuite la formation de PIP3 (*Phosphatidylinositol triphosphate*) à partir de la PIP2 (*phosphatidylinositol diphosphate*). PIP3 sert de point d'ancrage pour AKT/PKB, grâce à son domaine PH (*Pleckstrin Homology*), ce qui permet sa phosphorylation au niveau de la thréonine 308 et sérine 473 par PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent kinase 1*) et mTORC2 (PDK2) respectivement, permettant son activation complète. Une fois phosphorylée, AKT inhibe le complexe TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex-1/2*), ce qui permet l'activation de mTORC1 par RHEB (*Ras homolog enriched in brain*). mTORC1 peut alors agir sur ses cibles en aval et stimuler la prolifération, la survie ou encore la croissance. PTEN est une phosphatase essentielle dans le contrôle de l'activation de la voie car elle permet de déphosphoryler PIP3, et empêche ainsi l'activation de la voie en aval.

lipidique membranaire de type phosphatidylinositide, le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI4,5P2), en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI3,4,5P3) (**figure 24**). Ce composé lipidique sert ensuite de point d'ancrage pour des protéines à domaine PH (*Pleckstrin Homology*) et notamment à la protéine sérine/thréonine kinase AKT/PKB (*Protein Kinase B*) ou encore à PDK1 (Toker and Cantley, 1997).

(2) La protéine AKT/PKB

AKT/PKB est une sérine/thréonine kinase présente sous 3 formes chez les mammifères, codées par trois gènes : AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β), AKT3 (PKB γ). Ces différentes formes d'AKT ont une localisation et une fonction distincte. Akt1 est celle qui présente l'expression la plus large, avec une fonction dans la croissance et la survie cellulaire. *Akt2* est fortement exprimée dans le foie, les muscles et les adipocytes, et impliquée dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Enfin, *Akt3* présente une expression restreinte au niveau du cerveau et des testicules (Franke, 2008; Hers et al., 2011).

La relocalisation à la membrane d'AKT conduit à un changement conformationnel permettant de démasquer des résidus cibles de kinases. AKT est ainsi activée suite à sa phosphorylation au niveau de la thréonine 308 par la PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) et au niveau de la sérine 473 par la PDK2 (*phosphoinositide-dependent kinase 2*), la rendant active. Une fois phosphorylée, elle se détache de la membrane pour phosphoryler des substrats intracellulaires ou nucléaires pour réguler de nombreux processus cellulaires. AKT peut transloquer dans le noyau pour moduler l'activité de facteurs de transcription tels que CREB (*Cyclic-AMP- response element bindind protein*), E2F (*E2 factor*) ou encore NF κ B (*Nuclear factor kappa B*); et ainsi promouvoir la prolifération cellulaire ou la survie (Andjelković et al., 1997). Mais la majorité des cibles d'AKT sont cytoplasmiques. En effet, AKT favorise le cycle cellulaire en inhibant les protéines p21 et p27 responsables de l'inhibition des complexes cyclines/CDK. Elle augmente la survie cellulaire en inhibant des protéines pro-apoptotiques telles que BAD par exemple (Vanhaesebroeck et al., 2012). AKT peut également moduler la traduction et la croissance cellulaire par le biais de sa principale cible intracellulaire, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*).

(3) La protéine mTOR

mTOR est une enzyme à activité sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des PIKK (*Phosphatidyl Inositol Kinase-related kinase*) (Alayev and Holz, 2013). Elle est toujours associée à d'autres partenaires protéiques pour former les complexes mTORC1

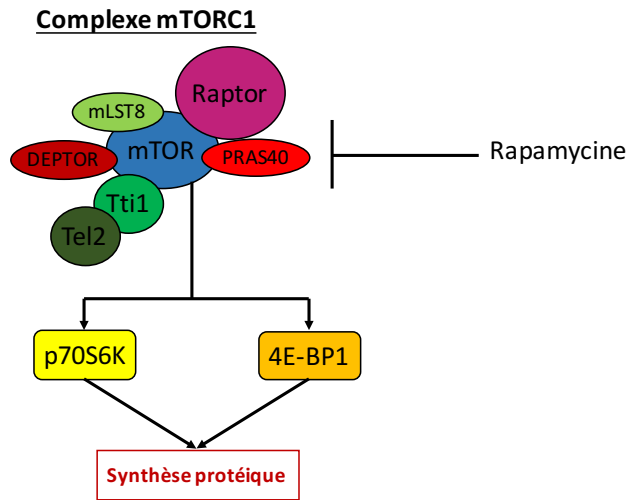


Figure 25 : Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est composé de protéines communes avec mTORC2 telles que : la kinase mTOR qui est le composé catalytique central ; mLST8 (*mammalian Lethal with Sec13 protein 8*) une « scaffold protein » ; DEPTOR (*DEP-domain-containing mTOR interacting protein*) qui est un régulateur de mTOR et le complexe Tti1/Tel2 (*KIAA0406/HCLK2*) important pour l'assemblage et la stabilité du complexe mTORC. Il possède aussi des composants spécifiques qui lui confèrent sa spécificité de substrat ou encore sa localisation. Pour mTORC1 on trouve Raptor (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*) importante pour l'assemblage du complexe et enfin PRAS40 (*Proline Rich Akt Substrate 40kDa*) qui inhibe l'activité de mTORC1 en absence de signaux de croissance.

Les cibles principales de mTORC1 sont p70S6K et 4E-BP1 qui permettent de stimuler la synthèse protéique. Contrairement à mTORC2, mTORC1 peut être inhibé par la Rapamycine.

Complexe mTORC2

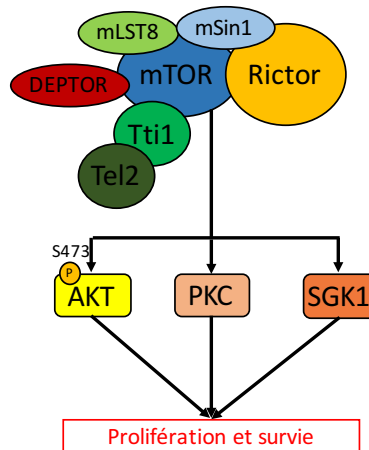


Figure 26 : Le complexe mTORC2

Le complexe mTORC2 est composé de protéines communes avec mTORC1 telles que : la kinase mTOR qui est le composé catalytique central ; mLST8 ; DEPTOR et le complexe Tti1/Tel2. Il possède aussi des composants spécifiques qui lui confèrent sa spécificité de substrat ou encore sa localisation. Pour mTORC2 il y a Rictor (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), important pour l'assemblage du complexe et mSin1 (*mammalian Stress-activated protein kinase Interacting protein*) qui contribue à la stabilité du complexe.

Les cibles principales de mTORC2 sont AKT, PKC ou encore SGK1 (*Serum and Glucocorticoid-induced protein kinase 1*) qui vont contribuer à la prolifération et à la survie cellulaire.

(*mammalian Target Of Rapamycin Complexe 1*) ou mTORC 2 (*mammalian Target Of Rapamycin Complexe 2*) (Kim et al., 2017).

▪ Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est formé de 6 protéines : mTOR, RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian Lethal with Sec13 protein 8*), DEPTOR (*DEP-domain-containing mTOR interacting protein*), TTI1/TEL2 (KIAA0406/HCLK2), PRAS40 (*Proline Rich Akt Substrate 40KDa*). Il est inhibé par la rapamycine via la chaperonne FKBP12 (**figure 25**). AKT peut activer mTORC1 soit directement par une phosphorylation activatrice de mTOR, soit indirectement en phosphorylant l'hétérodimère TSC1/TSC2 (*Tuberous sclerosis complex-2*), levant ainsi l'inhibition qu'il exerce sur la protéine Rheb et le complexe mTORC1. mTORC1 a un rôle fondamental dans le contrôle du métabolisme et de la croissance cellulaire. Par phosphorylation, il active la kinase p70S6K (*S6 Kinase 1*) et inhibe le facteur 4E-BP1 (*eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) pour stimuler la synthèse protéique. S6K phosphoryle et inhibe l'activité de PDCD4 (*Programmed Cell Death Protein 4*), qui est un inhibiteur de la traduction (Dorrello et al., 2006). S6K active également la protéine ribosomale S6 et favorise donc la biogenèse des ribosomes (Laplanche and Sabatini, 2012). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 lève l'inhibition qu'il exerce sur le facteur d'élongation eIF4-E. Cela favorise la mise en place du complexe eIF4-F permettant l'initiation de la traduction (Fingar et al., 2002). *In fine*, mTOR joue un rôle dans le contrôle de l'initiation de la traduction. De ce fait, il est finement régulé par la biodisponibilité des nutriments et plus particulièrement des acides aminés (Long et al., 2005). En effet, la présence d'acides aminés favorise la fixation de RHEB sur mTORC ; et également la relocalisation de mTORC1 par les protéines RAG, favorisant l'activation du complexe (Sancak et al., 2008).

▪ Le complexe mTORC2

Le complexe mTORC2 est composé des protéines : mLST8, DEPTOR, TTI1/TEL2, mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*) et de RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*). RICTOR est insensible à la rapamycine (Sarbasov et al., 2006) (**figure 26**). Ce complexe a un rôle pro-prolifératif et anti-apoptotique via ses cibles incluant SGK1 (*serum and glucocorticoid-induced protein kinase*), une kinase contrôlant le transport des ions et la croissance (García-Martínez and Alessi, 2008) ; et la PKC (*Protein kinase C*) impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Dos D.

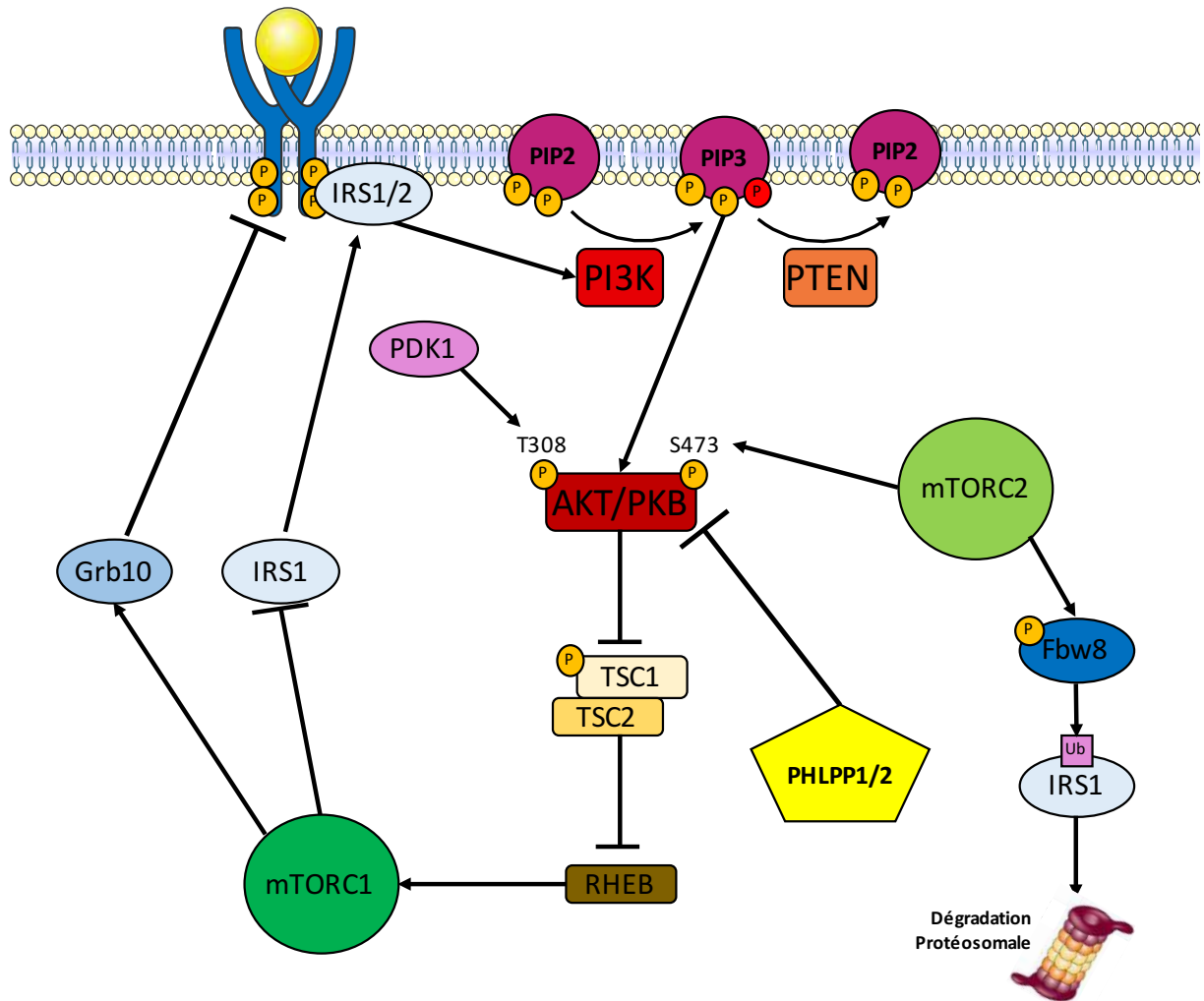


Figure 27 : Mécanismes de régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR

La régulation de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR peut se faire à plusieurs niveaux. Tout d'abord grâce à des phosphatases telles que PTEN et PHLPP1/2 qui déphosphorylent PIP3 et AKT/PKB respectivement, empêchant l'activation de la voie en aval. Ensuite, des boucles de rétrocontrôle sont mises en place avec par exemple la dégradation d'IRS1, protéine adaptatrice se liant au récepteur activé ou encore l'inhibition du récepteur *via* la production de Grb10 par mTORC1. Le complexe mTORC2 peut également conduire à la dégradation de IRS1 en phosphorylant et activant une ubiquitine E3-ligase, Fbw8, qui ubiquitine et dégrade IRS1.

GRB10 : *Growth Factor Receptor Bound protein 10*

IRS1 : *Insulin Receptor Substrate 1*

FBW8 : *F-Box and WD Repeat Domain Containing 8*

PHLPP1 : *Pleckstrin Homology domain Leucin-rich repeat Protein Phosphatases 1 and 2*

Sarbassov et al., 2004; Jacinto et al., 2004). De plus, ce complexe est capable d'agir en aval de la voie PI3K/AKT/mTOR puisqu'il est responsable de la deuxième phosphorylation sur le résidu sérine 473 d'AKT et est donc identifié comme étant PDK2.

2) Systèmes de régulation

Etant donné les rôles essentiels joués par cette voie de signalisation, plusieurs niveaux de régulation sont mis en place afin de contrôler de manière fine son activité (**figure 27**).

(1) Les phosphatases

Le premier niveau de régulation implique des phosphatases. Les deux principales sont PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome ten*) et PHLPP1/2 (*Pleckstrin Homology domain leucin-rich repeat protein phosphatases 1 and 2*).

PTEN déphosphoryle les PIP3, les convertit en PIP2, empêchant donc l'activation en aval d'AKT (Georgescu, 2010). Elle réalise l'action inverse de PI3K. Elle régule ainsi la voie de signalisation très en amont dans la cascade et exerce donc un rôle régulateur primordial. Sa mutation est associée au développement tumoral dans de nombreux cancers dont le cancer de la prostate.

PHLPP1/2 (*Pleckstrin Homology domain leucin-rich repeat protein phosphatases 1 and 2*) déphosphoryle directement AKT au niveau de la Sérine 473. Une autre phosphatase, PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), complète alors son action en enlevant le groupement phosphate du résidu thréonine 308, rendant AKT complètement inactive (Bayascas and Alessi, 2005).

(2) Les boucles de rétrocontrôle

Un autre moyen de contrôler l'activation de voies de signalisation est la mise en place de boucles de rétrocontrôle, à l'aide de protéines produites en réponse à l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR.

Une première boucle de rétrocontrôle est initiée au niveau du complexe mTORC1. En effet, l'activation de mTORC1 et de sa cible p70S6K entraîne la phosphorylation et la dégradation de IRS1, une protéine adaptatrice essentielle à la transduction de signal par les récepteurs à l'insuline. mTORC1 phosphoryle également GRB10, conduisant à l'inhibition du récepteur IGFR, bloquant en aval le recrutement de PI3K.

Une deuxième boucle implique le complexe mTORC2 : mTORC2 phosphoryle et stabilise la protéine FBW8 (*F-Box and WD Repeat Domain Containing 8*), une ubiquitine-ligase favorisant la dégradation d'IRS1.

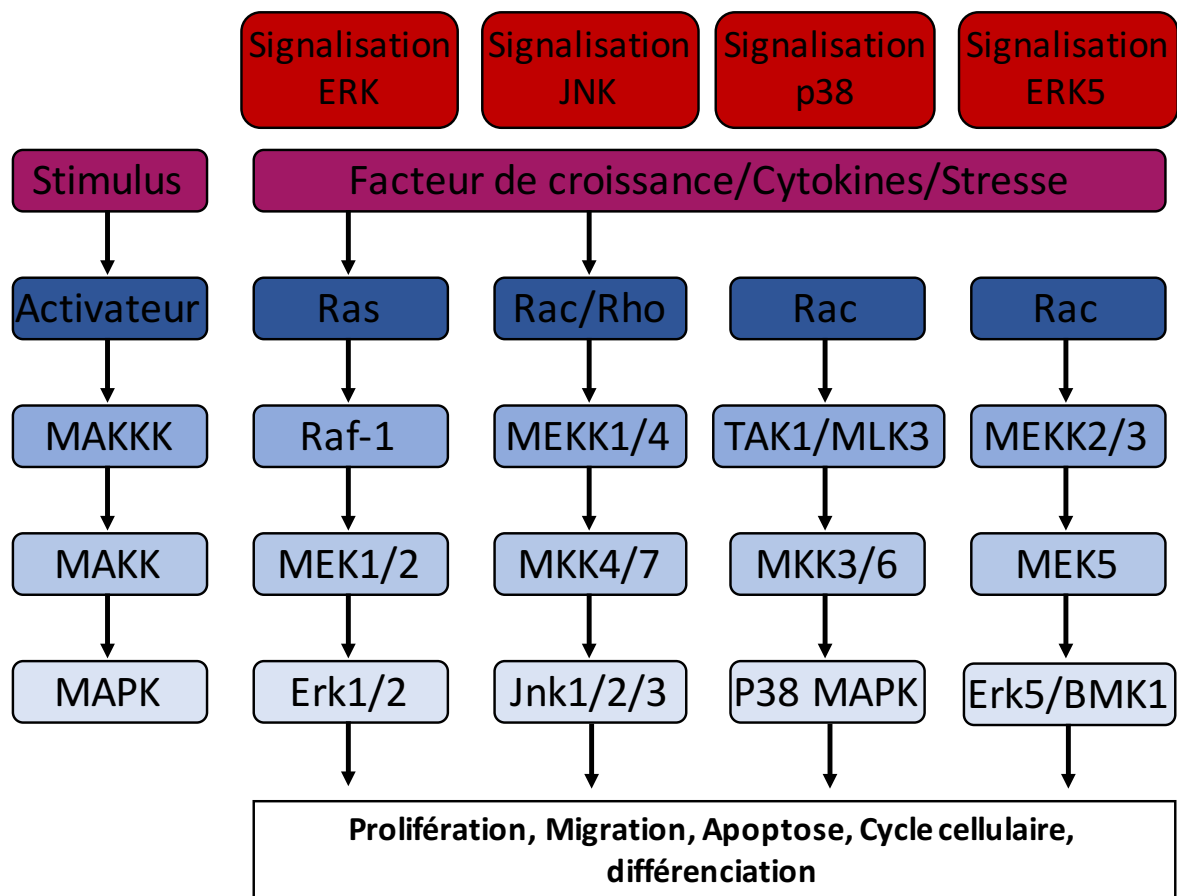


Figure 28 : La famille des protéines MAPKs

Les protéines MAPKs sont une famille de protéines à activité sérine/thréonine kinase impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, l'apoptose ou encore la différenciation cellulaire. La signalisation des MAPKs est organisée sur trois niveaux. Les MAPK sont phosphorylées et activées par les MAPK-Kinases (MAPKK), elles-mêmes phosphorylées et activées par les MAPKK-kinases (MAPKKK). Les MAPKKK sont elles activées par des protéines kinases connectées à des récepteurs de surface cellulaire ou encore des stimuli externes.

3) La voie PI3K/AKT/mTOR et le cancer de la prostate

La voie AKT/mTOR est suractivée dans 42% des tumeurs primaires de la prostate et 70 à 100% des métastases (Taylor et al., 2010; Carver et al., 2011). Cette activation aberrante est associée à un mauvais pronostic (Kreisberg et al., 2004a). Dans certains cas, cette activation est associée à une mutation de *AKT1* (Boormans et al., 2008) ou une activation de l'isoforme p110bêta de PI3K (Hill et al., 2010; Lee et al., 2010). Cependant, dans plus de 70% des cas, cette activation non contrôlée est associée à une délétion du gène *PTEN* (Ruscetti et al., 2013). *PTEN* se situe au niveau de la région chromosomique 10q23 qui est délétée dans 50 à 80% des cancers de la prostate (Salmena et al., 2008). L'inactivation de *PTEN* dans le cancer chez l'homme peut faire intervenir d'autres mécanismes tels que des mutations somatiques, l'oxydation ou encore des modifications épigénétiques comme la méthylation de son promoteur (Covey et al., 2007). Une atteinte de l'expression de *PTEN* est associée à des résistances à la chimiothérapie et à la radiothérapie tout en augmentant les risques de récidives après prostatectomie (Bedolla et al., 2007; Priulla et al., 2007). En modèle souris, une délétion de *Pten* au niveau de l'épithélium prostatique induit le développement de PIN et parfois de carcinomes invasifs, voire de métastases, soulignant le rôle essentiel qu'a l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans l'initiation de la tumorigenèse (Wang et al., 2003c).

Des études *in vitro* montrent que la perte de *Pten* entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire (Carver et al., 2011) et une résistance à l'apoptose (Sun et al., 1999). Cette perte est également associée à une dédifférenciation des cellules cancéreuses qui acquièrent des caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Or, ces étapes sont essentielles pour permettre le détachement des cellules du tissu prostatique et favoriser leur dissémination dans des tissus distants.

C) La voie RAS/MAPK

1) Généralités

Les MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) sont des enzymes qui se divisent en 4 grandes familles : RAS/MAPK/ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), BMK1/ERK5 (*Big MAP kinase-1*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et p38 (**figure 28**). Dans chacune de ces voies, on trouve une série de kinases qui s'activent en cascade. Ces kinases sont appelées MAPKKK (MAPK-kinase-Kinase), MAPKK (MAPK Kinase) et MAPK (Burotto et al., 2014). Ici nous nous intéresseront uniquement à la voie RAS/MAPK/ERK,

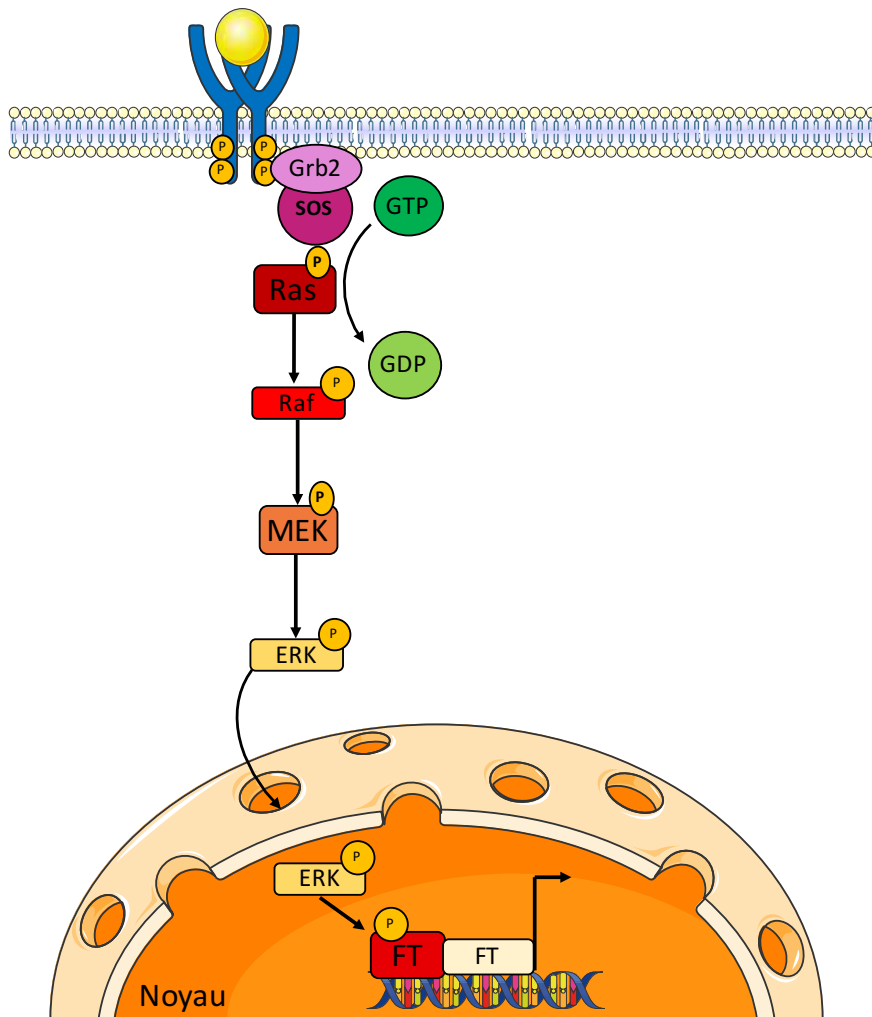


Figure 29 : La voie de signalisation RAS/MAPK

La stimulation du récepteur tyrosine kinase par un stimuli externe permet l'initiation de la signalisation grâce à l'activation de RAS, une petite GTPase. Son activation permet la dimérisation et l'activation de RAF puis l'enclenchement de la cascade de phosphorylation avec MEK (*MAPK-ERK-Kinase*), puis ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*). L'activation de ERK permet sa translocation dans le noyau où il active des facteurs de transcription (FT), ce qui conduit à une modulation de la prolifération, l'invasion, et la survie cellulaire.

principale voie impliquée dans le cancer de la prostate. La voie RAS/MAPK est impliquée dans la prolifération, la survie et la différenciation, la migration cellulaire et aussi l'angiogenèse. Son activation se fait en général *via* l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), récepteur de type tyrosine kinase dont les ligands majoritaires sont l'EGF et le TGF α .

2) Les acteurs de la signalisation RAS/MAPK

(1) Les protéines RAS

Les protéines RAS sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique, ancrées dans la membrane. Elles oscillent entre deux états : liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate) dans un état actif ; ou liées au GDP (Guanosine Di-Phosphate) dans un état inactif. L'activation de récepteurs de type tyrosine kinase peut induire, *via* la liaison de protéines adaptatrices comme GRB2, le recrutement de SOS (*Son of sevenless*) (Schlessinger, 2000)(**figure 29**). SOS est un facteur d'échange capable de libérer RAS de son GDP, le rendant apte à lier du GTP. Les RAS étant des petites GTPases, leur liaison au GTP va induire leur activité et activer notamment la voie RAS/MAPK. Les protéines RAS constituent une famille de quatre membres principaux : H-RAS, K-RAS4A, K-RAS4B, et N-RAS. La différence entre ces isoformes se situe au niveau C-terminal et permet une activation différentielle d'acteurs en aval. En effet, H-RAS active préférentiellement la voie PI3K/AKT/mTOR tandis que l'isoforme K-RAS privilégie l'activation de RAF (Fey et al., 2016).

(2) Les protéines RAF

RAF est directement en aval de RAS. C'est une sérine thréonine kinase faisant partie de la famille RAF1 constituée de : A-RAF, B-RAF et C-RAF. RAS permet l'homo- ou l'hétérodimérisation de RAF qui conduit à l'activation de son domaine kinase (Samatar and Poulidakos, 2014).

(3) Les protéines MEK et ERK

RAF a pour cibles directes les protéines sérines/thréonines kinases MEK1 et MEK2 (MAPK-ERK-kinase ou MAPK-kinase) (Akinleye et al., 2013), qui ont elles-mêmes comme substrats ERK1 et ERK2 (*extracellular signal-Regulated Kinase*). Les sérine/thréonine kinases ERK1/2 possèdent de nombreuses protéines cibles et sont donc à l'origine de nombreuses réponses cellulaires (Yoon and Seger, 2006). Par exemple, dans le cytosol, la protéine kinase RSK/p90S6K (*ribosomale S6 kinase*), une fois activée par ERK1/2, inhibe la

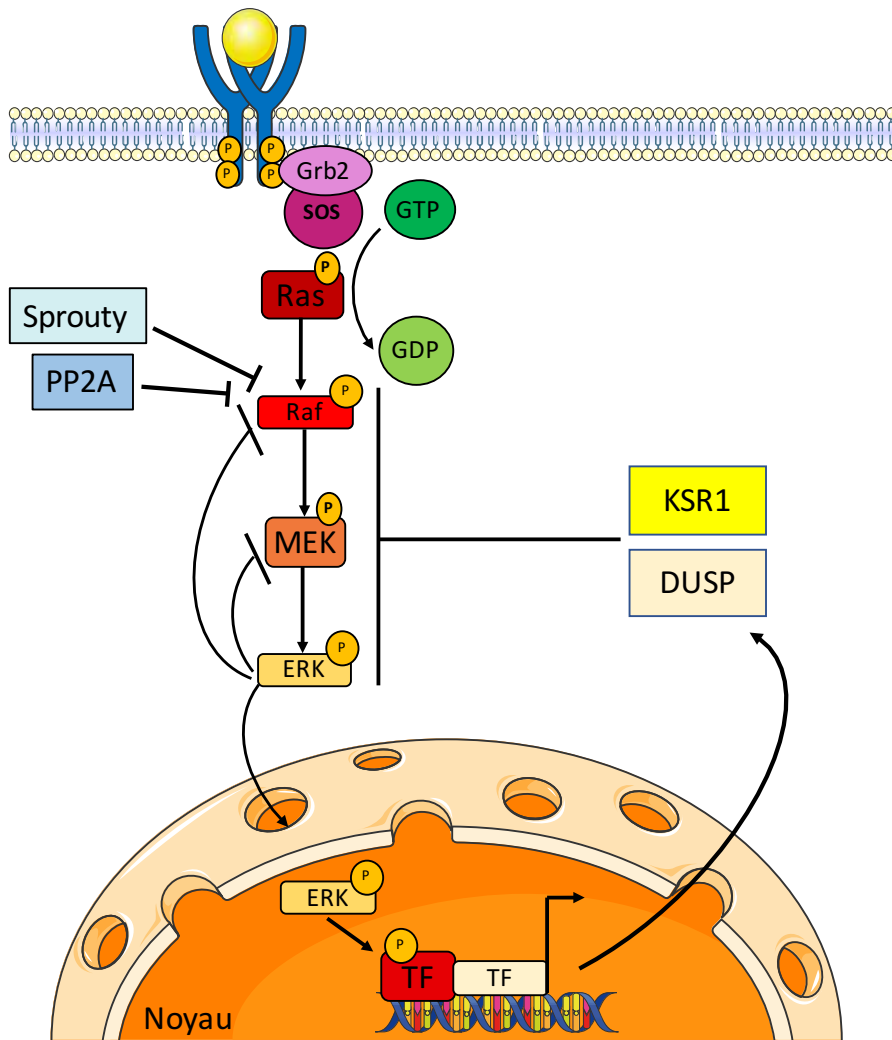


Figure 30 : Mécanismes de régulation de la voie RAS/MAPK

La régulation de la voie RAS/MAPK peut se faire directement par les protéines MAPKs avec par exemple ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) qui est capable d'inactiver RAF ou encore MEK (*MAPK-ERK-Kinase*). De plus, des protéines peuvent être produites avec DUSP (*Dual Specific Phosphatase*), une phosphatase qui déphosphoryle ERK, ou encore les protéines de la famille Sprouty et PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) qui inhibent Raf. Enfin, il y a des protéines chaperonnes telles que KSR1 (*Kinase Suppressor of RAS*), qui régulent la disponibilité des différents acteurs de la voie.

protéine pro-apoptotique Bad et ainsi l'apoptose (Hauge and Frödin, 2006). Les ERK peuvent également s'associer à des transporteurs et transloquer dans le noyau où elles agissent sur l'activité de facteurs de transcription. ERK1/2 phosphoryle ainsi ELK-1, C-ETS1, C-ETS2 ou encore MYC, ce qui conduit à l'activation de la cycline D1 ou encore de cFOS ; ce qui permet à la cellule d'avancer dans le cycle cellulaire, ERK1/2 est donc importante pour la prolifération et la survie cellulaire.

3) Systèmes de régulation

La voie RAS/MAPK est régulée à plusieurs niveaux (**figure 30**), par les protéines GAP, les protéines chaperonnes et les phosphatases ; et enfin par les boucles de rétrocontrôle.

(1) Les protéines GAP et autres chaperonnes

Les protéines de régulation GAP (GTPase activating proteins) permettent l'hydrolyse du GTP en GDP ce qui replace RAS dans sa conformation inactive.

Plusieurs protéines adaptatrices agissent comme des chaperonnes et régulent la disponibilité des formes actives des acteurs de la voie. La plus importante est la famille des KSR1 (*kinase suppressor of RAS*) qui peuvent interagir à la fois avec RAS, MEK et ERK.

(2) Les phosphatases

Des phosphatases peuvent aussi agir à plusieurs niveaux de la voie de signalisation. Notamment, les phosphatases DUSP (*Dual Specific phosphatase*), de la famille des MKPs (MAPKs phosphatases), enlèvent les groupements phosphates au niveau des MAPK. Les protéines de la famille Sprouty (Sprouty 1 à 4) et PP2A sont également impliquées dans la régulation de la signalisation MAPK, en inhibant RAF et la phosphorylation de ERK1/2, et par conséquent en empêchant la phosphorylation de leurs substrats (Hanafusa et al., 2002; Lake et al., 2016).

(3) Les boucles de rétrocontrôle

Comme pour la voie PI3K/AKT/mTOR, l'activation de la voie RAS/MAPK conduit à la production de signaux de régulation permettant d'éviter une activation aberrante et continue de la signalisation.

Les boucles de rétrocontrôles se font majoritairement par les protéines kinases se trouvant en aval. Ainsi ERK peut inactiver RAF ou MEK par exemple (Lake et al., 2016). De même, les phosphatases de la famille DUSPs sont produites suite à l'activation de la voie (Fritsche-Guenther et al., 2011).

4) La voie RAS/MAPK et le cancer de la prostate

Des mutations de *K-RAS* ont été observées au niveau des codons 12, 13, 59 et 61 avec une prévalence pour les mutations du codon 12 et 61 dans de nombreux cancers. Ainsi, la mutation du codon 12 est retrouvée dans 15 à 50% des cancers du poumons et dans 72 à 90% des cancers du pancréas (Dergham et al., 1997; Mascaux et al., 2005). Une amplification génique de *K-RAS*, est décrite dans 40% des cancers œsophagiens (Galiana et al., 1995) et 50% des cancers du sein (von Lintig et al., 2000), conduisant à une augmentation de l'activation des effecteurs en aval de RAS.

La voie de signalisation MAPK *via* ERK (p42/44) est fortement activée dans le cancer de la prostate, particulièrement dans les stades avancés, et est corrélée à un pronostic défavorable (Weber and Gioeli, 2004; Mukherjee et al., 2005). Dans le cancer de la prostate, la voie RAS/MAPK est suractivée dans 43% des tumeurs primaires et 90% des métastases (Taylor et al., 2010). Cependant peu de mutations activatrices ou altérations chromosomiques ont été retrouvées dans les échantillons cliniques (Cho et al., 2006; Taylor et al., 2010) et elles ne peuvent pas expliquer à elles seules l'activation aberrante de cette voie dans le cancer de la prostate. La dérégulation de l'activation de la voie RAS/MAPK dans le cancer de la prostate semble due principalement à une surexpression des facteurs de croissance (Culig et al., 1994; Gioeli, 2005). La production d'EGF et d'autres facteurs de croissance par les cellules cancéreuses prostatiques conduirait ainsi à une activation continue de la voie RAS/MAPK (boucle autocrine de l'EGF). Dans la prostate, l'EGF est normalement sécrété par les cellules luminales. Cependant, le récepteur EGFR est situé dans le compartiment épithélial au niveau de la membrane baso-latérale, sous les jonctions serrées, empêchant le récepteur d'être activé par cet EGF (Montano and Djamgoz, 2004). Une des hypothèses pour l'activation autocrine du récepteur est que lors de la désorganisation du compartiment épithélial qui a lieu pendant la tumorigenèse, les jonctions serrées sont perdues et les cellules malignes peuvent donc s'auto-alimenter en facteurs de croissance. Cette boucle autocrine de régulation va ainsi s'affranchir des régulations paracrines venant du stroma. La dérégulation de la voie RAS/MAPK dans le cancer de la prostate fait également intervenir les régulateurs de la famille sprouty. Leur expression est diminuée dans 40% (Sprouty 1) et 70% (Sprouty 2) des cancers prostatiques. De plus, cette diminution est corrélée à la récurrence après prostatectomie radicale, suggérant un rôle protecteur de ces protéines vis-à-vis de la dissémination métastatique (Fritzsche et al., 2006).

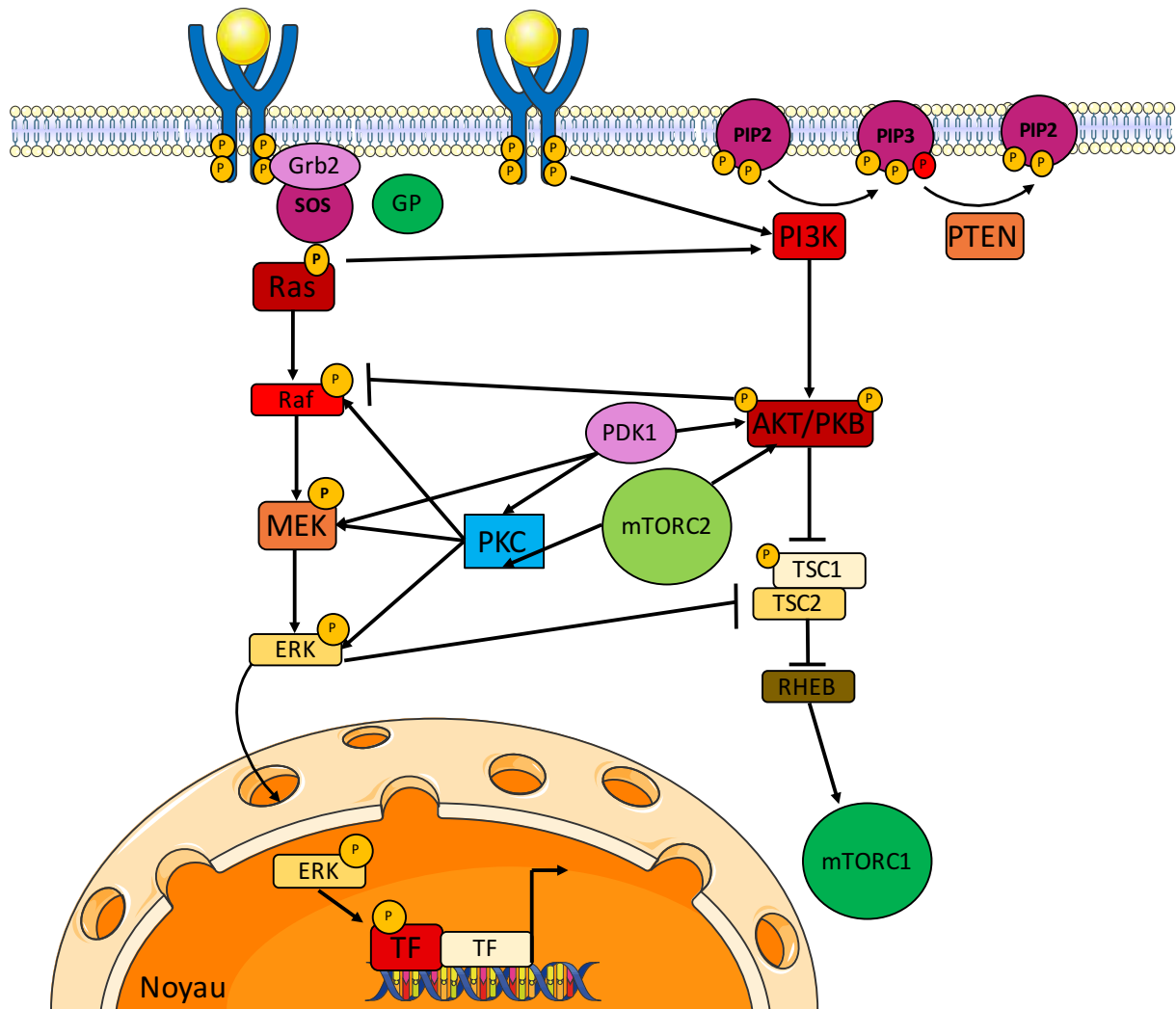


Figure 31 : Exemples de dialogues entre les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR

Les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR interagissent entre elles. Il peut s'agir d'interactions inhibitrices comme c'est le cas entre AKT/PKB ou ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) sur le complexe TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex-1/2*). Mais il peut aussi s'agir d'interactions activatrices avec ERK qui peuvent directement activer mTORC1. La PKC, activée par mTORC2 et PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent kinase 1*) peut activer RAF, MEK (*MAPK-ERK-Kinase*) et ERK. RAS peut elle activer directement PI3K (*Phosphoinositide 3 Kinase*).

Des modèles de souris présentant une activation de RAS (*Ras*^{V12} exprimé sous le promoteur probasine, spécifique de la prostate) présentent une initiation de la tumorigenèse prostatique sous forme de PIN de bas grade dans 60% des cas et une carcinogenèse dans seulement 7% des cas (Pearson et al., 2009a). Cependant, lorsqu'elle est associée à d'autres altérations comme une surexpression de *AR*, une activation de la voie WNT ou une délétion de *Pten*, cela aboutit au développement d'un phénotype tumoral plus marqué avec formation de métastases et une mortalité importante chez les souris, soulignant son rôle essentiel dans la tumorigenèse prostatique (Pearson et al., 2009a; Mulholland et al., 2012).

D) Dialogue entre les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR

Les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR sont très interconnectées ce qui peut compliquer leur étude (**figure 31**).

- Régulation de la voie RAS/MAPK par la voie PI3K/AKT/mTOR

La protéine PDK1, responsable de la phosphorylation activatrice d'AKT est capable d'activer directement MEK en le phosphorylant au niveau des résidus ser222 et ser226. PDK1 et PDK2 (mTORC2) activent la PKC (*Protein kinase C*), qui en cascade phosphoryle c-RAF, MEK1 ou encore ERK1 (Ueda et al., 1996). Les interactions peuvent se faire indirectement par l'induction de l'expression d'effecteurs et/ou de régulateurs de la voie RAS/MAPK. Ainsi, AKT inhibe GSK3, ce qui lève la répression qu'il exerce sur ERK en régulant l'expression de phosphatases. L'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR permet ainsi une activation en parallèle d'effecteurs de la voie RAS/MAPK et notamment de ERK (Aksamitiene et al., 2012). Inversement, AKT est capable de phosphoryler RAF1 sur le site Ser259 pour bloquer son recrutement à la membrane et la signalisation en aval (Moelling et al., 2002).

- Régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR par la voie RAS/MAPK

La protéine RAS est capable d'activer la protéine PI3K, *via* sa sous-unité p110, indépendamment de la sous-unité p85 (Yang et al., 2012; Komatsu et al., 2015). De plus, ERK est capable de phosphoryler directement le complexe TSC1/2 et de l'inhiber, ce qui permet d'activer mTORC1. ERK peut aussi activer directement mTORC1 en phosphorylant sa sous-unité RAPTOR (Carriere et al., 2011). Des régulations inhibitrices de RAS/MAPK sur la voie PI3K/AKT/mTOR ont également lieu avec par exemple GSK3 qui est capable d'inhiber PTEN mais qui est aussi inhibée par ERK. Ainsi, l'activation de ERK permet

Types de MMPs	MMPs	Substrats
Collagénases	MMP1	Collagène III, I, II, VII, VIII, X, gélatine, protéoglycane, ténascine, entactine
	MMP8	Collagène I, III, II, V, VIII et X, gélatine, aggrécane
	MMP13	Collagène II, I, III, IV, IX, XIV, pro-MMP9, gélatine, ténascine, fibronectine, aggrécane,
Gélatinase	MMP2	Gélatines, collagènes I, IV, V, VII, X, XI, XIV, élastine, fibronectine, laminine, aggrécane, versicane, protéoglycane, ostéonectine
	MMP9	Gélatines, collagène IV, V, VII, X, XIV, gélatine, élastine, aggrécane, versicane, protéoglycane, ostéonectine
Stromélysines	MMP3	Aggrécane, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, pro-MMP9, collagène III, IV, V, IX, versicane, protéoglycane, ténascine, ostéonectine
	MMP10	Aggrécane, fibronectine, pro-MMP8, collagène III, IV, V, gélatine, caséine, élastine, protéoglycane
	MMP11	IGFBP_1, caséine, fibronectine, gélatine, collagène IV, transferrine
MMPs membranaires	MMP14	Pro-MMP2, pro-MMP13, pro-TNF α , collagènes I, II, III, fibronectine, laminine, caséine, élastine, vitronectine, tenascine, protéoglycane, entactine, CD44, ApoE
	MMP15	Pro-MMP2, pro-TNF α , tenascine, fibronectine, perlecane, collagène I
	MMP16	Pro-MMP2, pro-TNF α , collagène III, gélatine, caséine, fibronectine, laminine 1
	MMP17	Pro-MMP2, pro-TNF α , gélatine, fibrin/fibrinogène, ADAM TS4
	MMP24	Pro-MMP2, gélatine, fibronectine, laminine-1, N-cadhérine
	MMP25	Pro-MMP2, pro-MMP9, α -1 protéinase inhibiteur, gélatine, collagène IV, fibronectine, fibrinogène/fibrine, vimentine, galectine
Matrilysine	MMP7	Aggrécane, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, X, élastine, pro-MMP9, protéoglycane, entactine, tenascine, caséine, transferrine, intégrine, oestéonectine
	MMP26	Collagène IV, gélatines, fibronectine, IGFBP-1, pro-MMP9, fibrinogène, caséine
Métalloélastase	MMP12	Elastine, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, caséine, protéoglycanes, vitronectine, entactine
Enamélysine	MMP20	Amélogénine
Les autres MMPs	MMP19	Collagène IV, gélatines, fibronectine, laminine, entactine, aggrécane
	MMP21	Gélatine, caséine
	MMP23	Gélatine
	MMP28	Caséine
	MMP27	Gélatine, Caséine

Tableau 1 : Les métalloprotéases et leurs substrats

Plusieurs classifications des métalloprotéases (MMPs) existent. Ici, elles sont classées selon leurs substrats préférentiels.

Dans le cadre du cancer de la prostate, les MMPs à ce jour décrites comme impliquées sont MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP13, MMP14, MMP15, MMP26 et MMP1 (encadrées en rouge dans le tableau). D'après *Rodriguez et al 2007*

d'augmenter l'activité de PTEN et donc de diminuer l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR (Aksamitiene et al., 2012).

Toutes ces données, bien qu'issues d'études conduites dans des modèles variés, suggèrent qu'il existe un dialogue complexe entre ces deux voies. Ainsi, le rôle de chacune des voies dans le cancer de la prostate est difficile à disséquer.

Les altérations décrites jusqu'ici dans ce chapitre concernent la cellule tumorale elle-même. Cependant, l'initiation, la progression et enfin l'invasion tumorale sont la conséquence de dialogues entre les différents types cellulaires qui constituent le microenvironnement tumoral.

III. Modifications du microenvironnement pour soutenir la croissance tumorale

Une caractéristique des cellules tumorales malignes est leur capacité à dégrader la barrière matricielle afin de coloniser les tissus environnants, puis les sites plus distants (Liotta and Kohn, 2001). Tout ceci nécessite l'implication de protéines et processus bien précis : l'expression de protéines capables de dégrader les matrices telles que les MMPs ; un changement des caractéristiques des cellules afin de permettre leur détachement du site primaire pour coloniser des sites plus distants ; et enfin la formation de nouveaux vaisseaux pour d'une part soutenir la croissance tumorale, et d'autre part favoriser la dissémination métastatique.

A) Les MMPs et la matrice extracellulaire

Les MMPs (métalloprotéases matricielles) font partie de la famille des protéases et représentent 24 endopeptidases calcium et zinc dépendantes (**tableau 1**). Les MMPs sont majoritairement des protéines sécrétées et sont constituées de 3 domaines : un domaine de signal peptidique, un domaine pro-peptide et un domaine catalytique. Le domaine pro-peptide contient des motifs cystéines permettant de maintenir les MMPs dans un statut inactif (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). L'activation de ces enzymes nécessite un clivage catalytique pour couper la liaison entre les cystéines du pro-domaine et l'ion zinc du domaine catalytique. Le domaine catalytique contient le site de liaison au Zinc ainsi qu'un résidu méthionine « Met-Turn » qui permet de soutenir cette liaison Zinc. Le domaine C-terminal « hemopexine-like » est lié au domaine catalytique par une région flexible riche en proline

dans la plupart des MMPs, et leur confère les activités d'activation, d'inhibition, de dimérisation ou encore d'ancrage (Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Kessenbrock et al., 2010). Plusieurs classifications des MMPs peuvent être faites en fonction de leur localisation (transmembranaire, cytosolique) ou encore suivant leurs substrats. Dans ce dernier cas, les MMPs ont été classées en quatre groupes principaux : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les MMPs membranaires.

La régulation de ces MMPs se fait à plusieurs niveaux (Chakraborti et al., 2003) : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel. Il existe également des inhibiteurs naturels : les TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) ; l' α 2M (*alpha2-macroglobulin*) ou encore RECK (*reversion inducing cystein protein with kazal motifs*). Il existe quatre TIMPs homologues : TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 (Benjamin and Khalil, 2012), capables de se lier aux MMPs et de les inhiber.

En plus d'être capables de cliver des éléments de la matrice extracellulaire, les MMPs sont aussi capables de cliver des cytokines, les facteurs de croissance ou encore des récepteurs, tous acteurs-clés dans la progression tumorale (Overall and López-Otín, 2002; Vandenbroucke and Libert, 2014).

Dans les tissus de cancer prostatique, une modification de la balance entre les inhibiteurs TIMPs et les MMPs est observée, avec une perte de *Timps* et au contraire une surexpression de certaines *Mmps*. En plus d'altérer la progression en facilitant les processus métastatiques, les MMPs vont agir à plusieurs niveaux : la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse ou encore la transition épithélium-mésenchyme (EMT)(Gong et al., 2014a). En effet, en dégradant les matrices, elles libèrent des facteurs de croissance tels que le TGF- β ou encore l'HB-EGF par exemple, activant la voie RAS/MAPK ou celle des SMADs par exemple (Imai et al., 1997; Suzuki et al., 1997). Plusieurs auteurs ont montré une corrélation entre le niveau de dérégulation des MMPs et le score de Gleason. Une expression augmentée des *Mmps* : -2, -3, -7, -9, -13, 14, -15 et -26 est directement corrélée avec le stade d'avancement de la maladie (Murray et al., 2012; Gong et al., 2014a). Par contre, l'augmentation de l'expression de *Mmp1* est majoritairement associée à des tumeurs de bas-grade. Les plus étudiées sont MMP1, -2, -7 et -9. La perte de *Mmp2* entraîne une diminution des métastases dans les poumons et augmente la survie de souris exprimant l'antigène T SV40 et présentant une tumorigenèse prostatique, alors qu'une perte de *Mmp9* conduit à une augmentation de l'invasion péri-vasculaire (Littlepage et al., 2010). MMP7 contribue de manière significative à l'implantation de cellules tumorales de prostate au niveau osseux et

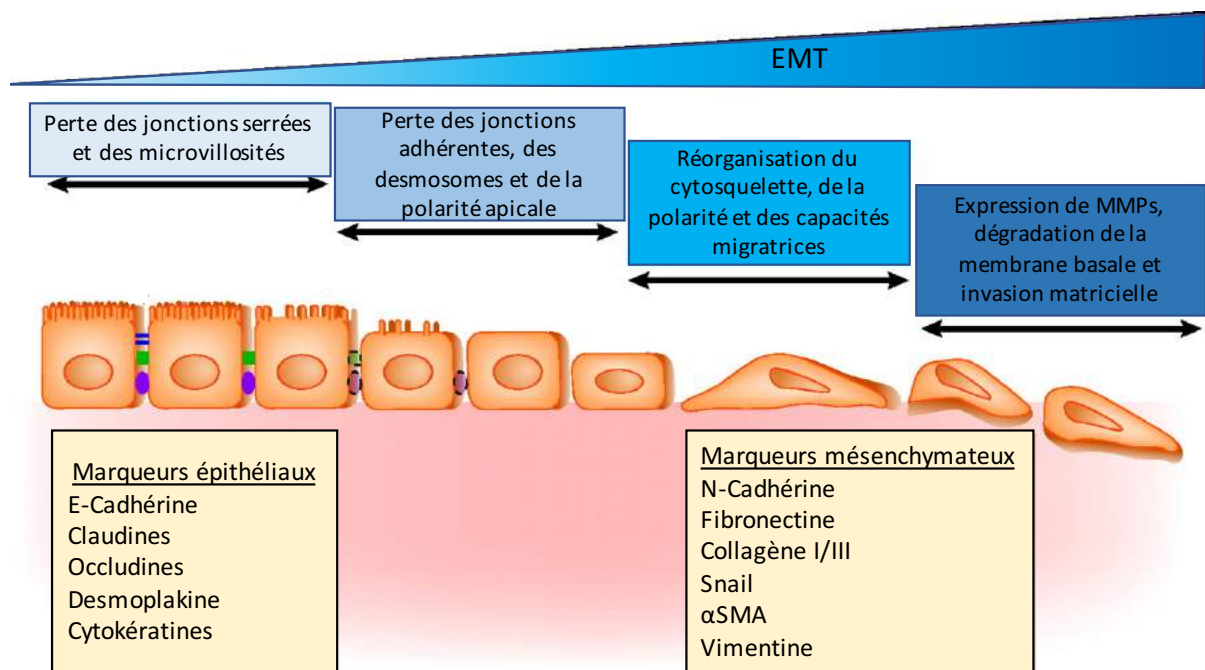


Figure 32 : La transition épithélium-mésenchyme

La transition épithélium-mésenchyme (EMT) correspond à un processus biologique conduisant les cellules à acquérir un phénotype mésenchymateux favorisant la migration, l'invasion et la survie cellulaire. Le but pour les cellules est d'acquérir des capacités migratoires et invasives afin de s'éloigner de l'épithélium d'origine et de passer dans la matrice extracellulaire. Lors de cancers, elles pourront alors utiliser le réseau lymphatique et sanguin pour former des métastases au niveau de sites distants.

Plusieurs étapes peuvent être décrites durant ce processus d'EMT. (1) Une perte des molécules d'adhésion. Parmi les marqueurs classiques de l'EMT on retrouve les changements d'expression de Cadhérines. En effet, alors que l'E-cadhérine est exprimée dans les épithélium, la N-cadhérine est caractéristique des cellules mésenchymateuses. (2) La perte des molécules d'adhésion conduit à une perte de polarité cellulaire et donc une altération de la forme des cellules, associée à une réorganisation du cytosquelette (3). (4) Les cellules vont exprimer des protéines mésenchymateuses telles que des protéines donnant des capacités de migration ou encore des protéases, conduisant à la rupture de la membrane basale, et l'invasion des cellules au niveau de la matrice extracellulaire.

D'après *Angadi and Kale, 2015*

induit une ostéolyse associée aux métastases (Thiolloy et al., 2009). A l'inverse, l'inhibition de MMPs diminue le potentiel invasif des cellules tumorales en culture.

L'ensemble de ces données a conduit à considérer les MMPs comme des cibles thérapeutiques potentielles et plusieurs essais cliniques testant l'efficacité d'inhibiteurs des MMPs ont été réalisés. Cependant, le problème majeur est que ces inhibiteurs vont interagir avec le développement normal et les processus de défense de l'hôte (Coussens et al., 2002; Overall and López-Otín, 2002). De plus, l'implication des MMPs dans le cancer est complexe puisqu'elles semblent parfois avoir un effet protecteur et agissent comme des suppresseurs de tumeurs. Enfin, ces essais n'ont pas montré de bénéfice majeur, et ont conclu à une absence de l'augmentation du taux de survie global des patients (Coussens et al., 2002).

B) La transition épithélium-mésenchyme

La plasticité entre l'épithélium et le mésenchyme joue un rôle essentiel dans la progression du cancer de la prostate à des stades métastatiques mais aussi pour la résistance aux traitements (Bitting et al., 2014; Marin-Aguilera et al., 2014). La transition épithélium mésenchyme (EMT) est décrite comme étant un processus moléculaire complexe requis durant le développement embryonnaire pour accompagner les changements morphologiques (Thiery, 2003). Les cellules épithéliales et mésenchymateuses présentent des caractéristiques différentes. En effet, les cellules épithéliales sont en contact avec l'environnement immédiat, acquièrent un axe de polarité grâce à des jonctions d'adhérences et des jonctions serrées. A l'inverse, les cellules mésenchymateuses sont faiblement structurées dans une matrice extracellulaire en 3 dimensions (Khan et al., 2015) (**figure 32**).

Le processus d'EMT correspond à une modification des cellules épithéliales leur permettant d'acquérir les capacités de migrations et d'invasions, propres aux cellules mésenchymateuses. Il est accompagné d'une modification d'expression des molécules d'adhésion. La protéine E-cadhérine, caractéristique des épithéliums est remplacée par la N-cadhérine. Cela induit à une modification des connections intercellulaires et à une perte de la polarité cellulaire. Enfin, une des dernières étapes de ce processus consiste en l'expression par la cellule de nouveaux marqueurs tels que des métalloprotéases par exemple, permettant la dégradation matricielle, essentielle pour l'invasion.

Les cellules tumorales réactivent ce processus développemental afin de promouvoir leur migration et leurs capacités invasives, mais aussi pour augmenter leur résistance à l'apoptose (Thiery, 2002; Kalluri and Weinberg, 2009). L'EMT a lieu généralement au niveau

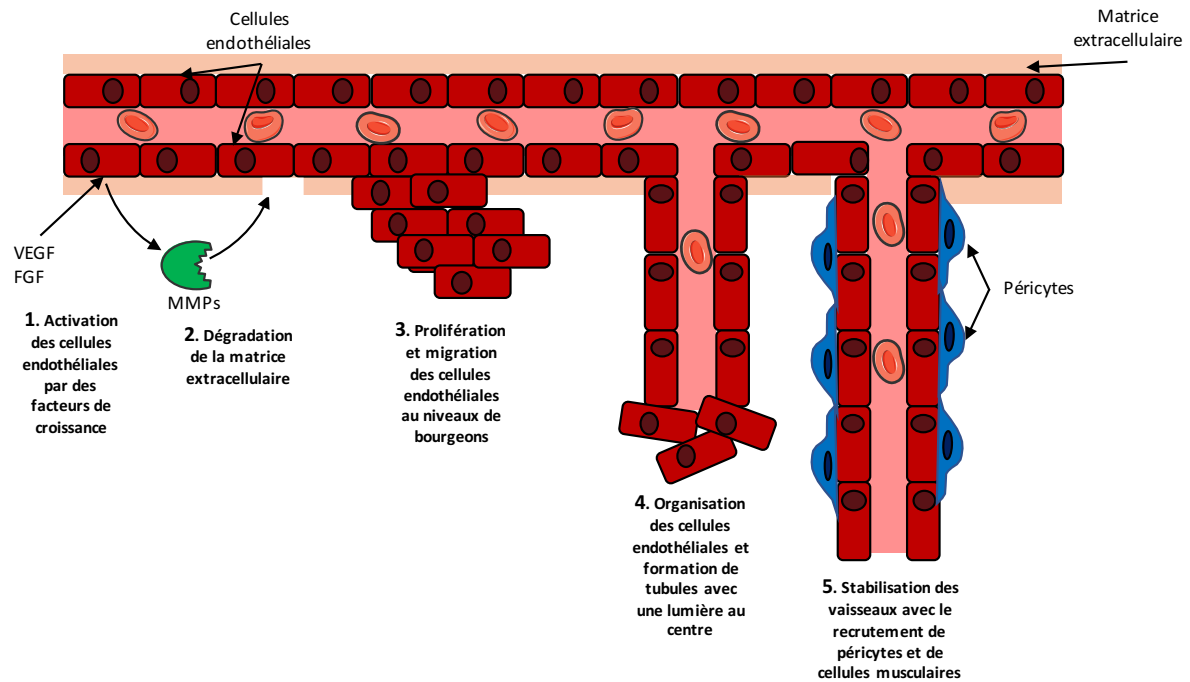


Figure 33 : L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus multi-étapes qui se déroule durant le développement normal et dans certaines maladies. Dans un premier temps, les facteurs angiogéniques se lient sur les récepteurs au niveau des cellules endothéliales, activant des voies de signalisation. Des métalloprotéases vont être produites pour dégrader la matrice extracellulaire localement. Les cellules endothéliales vont alors migrer et proliférer pour former un bourgeon. Des intégrines sont exprimées par les cellules endothéliales et permettront aux tubes de se former. Enfin, les vaisseaux formés seront stabilisés grâce au recrutement de péricytes et aussi de cellules musculaires.

de l'interface tumeur-stroma, en réponse aux molécules de signalisation paracrines sécrétées par le stroma (Nieto, 2011). Plusieurs données suggèrent l'importance de la transition épithélium-mésenchyme dans la progression du cancer de la prostate et sa dissémination métastatique (Grant and Kyprianou, 2013). L'implication des androgènes dans ce processus est controversée. En effet, les androgènes semblent jouer un rôle dans cet EMT puisqu'ils sont capables de supprimer l'expression de la E-cadhérine, une protéine impliquée dans les jonctions serrées des épithéliums, et d'activer l'expression de marqueurs mésenchymateux (Nieto et al., 2007), tels que Snail, ce qui modifie leurs capacités d'invasion et de migration (Zhu and Kyprianou, 2010). Mais d'autres études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que l'induction de l'EMT est causée par la privation des androgènes (Sun et al., 2012; Byrne et al., 2016), ou par un faible niveau d'expression de AR (Izumi et al., 2013). Un phénotype mésenchymateux est ainsi observé chez les patients ayant un faible niveau d'androgènes, que ce soit dans le tissu tumoral ou normal et ce quel que soit l'âge du patient et le grade de la tumeur (Best et al., 2005; Sun et al., 2012).

C) Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus cellulaire normal permettant la formation de vaisseaux, essentiels lors du développement ou lors de la cicatrisation. Elle implique les cellules musculaires lisses et endothéliales ainsi que des signaux locaux ou systémiques qui vont coordonner leur action. Ce processus complexe se déroule en plusieurs étapes (**figure 33**). Dans un premier temps, des signaux angiogéniques sont envoyés aux cellules endothéliales qui en réponse vont produire des enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire et la lame basale, telles que les MMPs. Puis, les cellules endothéliales vont migrer, proliférer et commencer à former des capillaires grâce à la formation d'une lumière. Cette étape est suivie par la synthèse d'une lame basale puis l'incorporation de péricytes et de cellules musculaires lisses. Parmi les signaux régulant l'angiogenèse on retrouve des activateurs tels que VEGF (*vascular endothelial growth factor*), bFGF et FGF2 (*basic fibroblast growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), l'angiogénine ou encore TGF- α et TGF- β (*transforming growth factor alpha et bêta*). Des inhibiteurs seront également exprimés afin de conserver l'homéostasie vasculaire, tels que l'angiostatine, la vasostatine ou encore l'endostatine (Lange-Asschenfeldt et al., 2001; Javaherian et al., 2011). Les pressions partielles en O₂ représentent un des régulateurs du processus angiogénique. En effet, les cellules expriment divers senseurs pour détecter les

niveaux d'oxygène tels que des NADH oxydases, eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) (Ward, 2008). Les cellules peuvent, en réponse à une diminution des niveaux d'oxygène, l'hypoxie, faire intervenir la famille de facteurs de transcription HIF (*hypoxia-inducible transcription factor*). Ces facteurs déclencheront l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire, le métabolisme et l'angiogenèse (Semenza, 2003).

Les cellules cancéreuses ainsi que les cellules du microenvironnement tumoral sont capables de produire des signaux pro-angiogéniques afin de former de nouveaux vaisseaux. Ces vaisseaux apportent l'oxygène et les nutriments essentiels à la croissance tumorale et favorisent l'extension et l'invasion des tissus adjacents. L'implication de l'angiogenèse dans le cancer de la prostate reste cependant controversée (Russo et al., 2012), même si une corrélation a été faite entre des concentrations importantes de VEGF dans le sérum de patients et la diminution de leur survie (Duque et al., 1999; Roberts et al., 2013). Des traitements anti-VEGF ont déjà été expérimentés dans le cas de cancers. Cependant, étant donné que l'angiogenèse et VEGF sont essentiels à des processus tels que la cicatrisation ou la vasoconstriction, les effets indésirables sont très importants (Verheul and Pinedo, 2007; Belcik et al., 2012).

Lignée cellulaire	ARN AR	Protéine AR	PTEN	EGFR	Capacités invasion
LNCaP	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
DU-145	Non	Non	Hétérozygote	Oui, surexprimé	Oui
PC3	Non	Non	Non	Oui, surexprimé	Oui
C4-2B	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
LAPC-4	Oui	Oui	Oui	-	Oui
LAPC-9	Oui	Oui	Non	-	Oui
VCaP	Oui	Oui	Oui	-	Oui
22Rv1	Oui	Oui	Oui	-	Oui
ARCaP (MDAPca 1)	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
RWPE-2	Oui	Oui	-	Oui + expression de Ki-Ras	-
MDAPca 2a/2b	Oui	Oui	-	-	Oui
LuCaP	-	-	-	-	Oui

Tableau 2 : Exemples de lignées cellulaires prostatiques utilisées pour l'étude du cancer de la prostate

Principales lignées cellulaires utilisées pour les études du cancer de la prostate avec leurs principales caractéristiques concernant : AR, PTEN, EGFR et leur pouvoir invasif.

D'après *Cunningham and You 2015*

CHAPITRE 3 : Modèles d'étude du cancer de la prostate

Afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints du cancer de la prostate, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la carcinogenèse prostatique. Cette meilleure compréhension concerne aussi bien les mécanismes initiateurs de la carcinogenèse que ceux conduisant à la progression vers les stades les plus tardifs et la mise en place des métastases. Enfin, un des traitements de référence du cancer de la prostate est l'hormonothérapie, permettant une réduction tumorale. Cependant celle-ci est la plupart du temps transitoire, étant suivie de l'apparition d'un cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC). Une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à ces CRPC est donc également nécessaire. C'est pourquoi différents modèles ont été mis au point afin d'étudier chaque étape du développement du cancer de la prostate. On retrouve des modèles *in vitro* avec notamment les cultures cellulaires mais aussi des modèles *in vivo* avec les modèles murins de xénogreffes ou génétiquement modifiés.

I. Modèles cellulaires et murins d'étude du cancer de la prostate

A) Les modèles in vitro

Le cancer de la prostate est un cancer hétérogène et multifocal. Plusieurs lignées cellulaires ayant des origines diverses ont donc été mises à disposition au cours des années (Sobel and Sadar, 2005a, 2005b)(**tableau 2**). Dans ce manuscrit, seules les lignées les plus utilisées seront décrites : LNCaP, PC3 et DU145. Une description rapide des modèles *in vitro* 3D sera également réalisée.

1) La lignée LNCaP

La lignée LNCaP a été isolée en 1980 à partir d'une métastase de ganglion lymphatique chez un patient atteint du cancer de la prostate, en 1980 (Horoszewicz et al., 1980). Elle exprime *AR* et la *PSA*, et est sensible aux androgènes. De plus, le récepteur des androgènes présent est muté (T877A), ce qui lui confère une affinité importante pour une variété d'androgènes autres que la testostérone (Veldscholte et al., 1990). Ces cellules présentent également une inactivation de *PTEN*, mais *P53* n'est pas altéré (Carroll et al., 1993).

La lignée LNCaP est l'archétype du stade de carcinome invasif androgéno-dépendant et donc précoce. De plus, elle peut former des métastases *in vivo* et donc être utilisée pour des études de stades tardifs de carcinogenèse prostatique (Loubeau et al., 2014).

Des dizaines de sous-lignées ont été dérivées à partir des LNCaP suite à diverses manipulations : privation d'androgènes, transfection, co-culture, xénogreffes, L'intérêt est d'obtenir des lignées représentatives d'un stade tumorigénique plus avancé avec par exemple des capacités métastatiques plus importantes. C'est le cas par exemple de la lignée C4-2B (Wu et al., 1994) qui est androgéno-indépendante et est utilisée pour l'étude de cancers métastatiques résistants à la castration.

2) La lignée DU145

La lignée DU145 a été isolée pour la première fois en 1978 à partir d'une métastase cérébrale chez un patient atteint du cancer de la prostate (Stone et al., 1978). Ces cellules présentent une indépendance aux androgènes, avec une absence d'expression de *AR* et de la *PSA*. Elles présentent aussi une expression hétérozygote de *P53* et *PTEN* (Bajgelman and Strauss, 2006; Fraser et al., 2012). Comparées à la lignée LNCaP, les DU145 présentent également de nombreuses altérations et sont donc représentatives d'un stade plus tardif de la pathologie. Elles peuvent être utilisées pour l'étude des cancers de la prostate résistants à la castration et pour des expériences de xénogreffes où elles donnent des métastases au niveau de la rate, des poumons et du foie.

3) La lignée PC3

La lignée PC3 a été isolée de métastases vertébrales en 1979 chez un patient atteint du cancer de la prostate (Kaighn et al., 1979). Comme les DU145, ces cellules sont indépendantes des androgènes avec une absence d'expression de *AR* et de la *PSA*. Elles présentent par contre une déficience pour *PTEN* ainsi qu'une expression aberrante de *P53*. Elles expriment fortement l'*EGFR* et le *TGF- α* (Ching et al., 1993). Cependant, les analyses réalisées avec ces cellules montrent qu'elles ont un phénotype caractéristique de carcinomes neuroendocrines ou à petites cellules plutôt que d'adénocarcinomes (Tai et al., 2011). En xénogreffe, les PC3 peuvent conduire au développement de métastases *in vivo* et peuvent donc être utilisées pour des études des stades tardifs du cancer de la prostate.

Comme pour les LNCaP, des dizaines de sous-lignées ont été dérivées à partir des PC3. C'est le cas des PC3M qui présentent un pouvoir métastatique plus important que les PC3 originelles (Pettaway et al., 1996).

4) Autres lignées

Des lignées cellulaires prostatiques immortalisées mais non transformées, et donc non tumorales existent. C'est le cas des cellules RWPE-1 (Webber, 1979), BHP1 (Hayward et al., 1995), pRNS-1-1 (Lee et al., 1994) ou encore PIN (Wang et al., 1999). Ces lignées servent à l'étude du développement et de la croissance de l'épithélium prostatique normal. Elles peuvent également être utilisées pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des PIN ou BHP.

5) Avantages et inconvénients liés à l'utilisation de ces lignées

Ces lignées cellulaires ont un grand intérêt pour l'analyse d'interactions moléculaires ainsi que d'altérations des cellules cancéreuses. Elles sont toutes bien caractérisées, simples à obtenir, à manipuler et à analyser (expression ou inhibition de gènes, expression de marqueurs fluorescents, ...). Leur principal inconvénient est qu'elles ne peuvent pas reproduire un processus pathologique tel qu'on peut le retrouver dans l'organisme entier. En effet, des interactions cellulaires complexes ont lieu dans le microenvironnement tumoral et jouent un rôle clef dans l'initiation et la progression du cancer. De plus, le cancer de la prostate est caractérisé par un développement lent ce qui rend compliqué l'établissement de lignées cellulaires à partir de tumeurs primaires. La plupart des études sont réalisées avec des lignées dérivées de métastases, ce qui ne permet pas l'étude des mécanismes précoces de la tumorigenèse prostatique. Il serait également intéressant d'augmenter le nombre de lignées dérivées de patients afro-américains car très peu sont disponibles à la communauté scientifique alors que c'est la population la plus touchée et que l'origine ethnique semble importante pour la carcinogenèse prostatique. Enfin, l'utilisation de ces lignées à des fins de recherche nécessite des passages en série *in vivo* ou *in vitro* afin de produire une population avec une cohérence phénotypique. Ces passages vont néanmoins faire perdre l'hétérogénéité cellulaire initiale des cellules tumorales et induire une dérive cellulaire, les rendant de moins en moins représentatives de la nature du cancer de la prostate.

6) Les modèles *in vitro* 3D

Les modèles *in vitro* 3D sont des modèles de cancers présentant une complexité plus importante que les lignées 2D présentées précédemment. Le premier modèle de ce type a été présenté en 2009, où les auteurs ont mis en culture des cellules souches intestinales sur du matrigel en présence d'un mélange complexe de facteurs de croissance mimant

l'environnement intestinal physiologique (Sato et al., 2009). A partir de ces cellules, une structure épithéliale hautement polarisée avec la présence de cryptes prolifératives et de villosités s'est formée.

Pour le cancer de la prostate, plusieurs modèles 3D ont été développés, qui peuvent être scindés en deux catégories : les sphéroïdes dérivant de lignées cellulaires tumorales (Ma et al., 2017) et les organoïdes issus de tumeurs primaires et de métastases de cancer de la prostate (Puca et al., 2018). L'avantage de ces structures est qu'elles conservent la morphologie cellulaire, ainsi que les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Les organoïdes ont en plus l'avantage de conserver les altérations génétiques des tumeurs prostatiques puisqu'ils se développent à partir de cellules isolées chez le patient (Gao et al., 2014a). De plus, ils présentent des structures différenciées telles que des acini et se rapprochent donc de la structure prostatique physiologique. Cela ouvre des perspectives quant à leur utilisation pour réaliser des tests thérapeutiques et ainsi s'orienter vers une médecine personnalisée. En effet, l'intérêt majeur de ces modèles est qu'ils peuvent être utilisés pour réaliser des cribles thérapeutiques rapides en s'affranchissant des modèles *in vivo* (Fong et al., 2014; Mosaad et al., 2018).

Cependant, bien que plus complexes que les modèles 2D, ces cultures 3D ne peuvent pas reproduire la physiologie telle qu'on la retrouve dans un modèle *in vivo*.

B) Les modèles in vivo

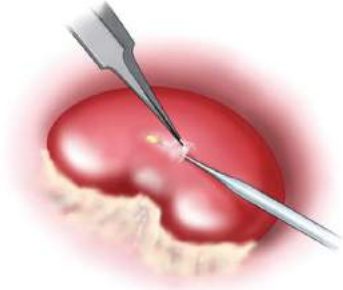
Contrairement aux cellules en culture, les modèles *in vivo* permettent une étude plus globale, avec la prise en compte des différentes interactions que les cellules néoplasiques peuvent développer avec le stroma et plus généralement avec le microenvironnement tumoral. Les premiers modèles *in vivo* utilisés ont été le rat et le chien (Dunning, 1963; Axiak and Bigio, 2012). Ils ont l'avantage de développer des cancers de la prostate spontanément. Cependant, la fréquence et la survenue de ces cancers est aléatoire, ce qui n'est pas optimal pour réaliser des expérimentations. C'est pourquoi actuellement, des modèles sont générés chez la souris et peuvent être de deux types : les modèles xénogreffes et les modèles génétiques.

1) Les modèles xénogreffes

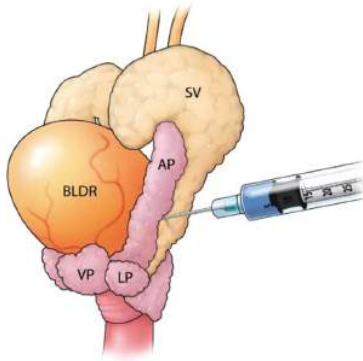
Il s'agit d'un modèle dans lequel une transplantation de cellules issues d'une lignée cellulaire de cancer de la prostate humain est effectuée dans une souris. Cette transplantation



Le modèle de xénogreffe sous-cutané
Avantages - Simple - Croissance correcte des tumeurs - Possibilité de réaliser des études de traitements
Inconvénients - Peu de développement métastatique - Environnement sous-cutané très différent de l'environnement prostatique



Le modèle de transplantation dans la capsule rénale
Avantages - Taux de succès important - Développe des métastases
Inconvénients - Environnement très différent de l'environnement prostatique - Niveau technique élevé



Le modèle orthotopique
Avantages - Développement de la tumeur dans l'environnement prostatique - Développe des métastases
Inconvénients - Niveau technique élevé

Tableau 34 : Les modèles xénogreffes

Il existe trois types de modèles xénogreffes différents : sous-cutané, orthotopique et dans la capsule rénale. Le choix du modèle dépend à la fois de la question biologique posée mais également des compétences techniques de l'expérimentateur.

D'après McLean et al., 2017

peut se faire de trois manières : en sous-cutané, en orthotopique ou dans la capsule rénale (SRC, *SubRenal Capsule*) (**figure 34**).

Les modèles de xénogreffes en sous-cutané ont été introduits dès les années 1970 et sont longtemps restés parmi les plus utilisés pour l'étude du cancer. Le tissu sous-cutané présente une vascularisation faible, ce qui rend la prise de ces greffes variable et plutôt faible (van Weerden and Romijn, 2000). L'environnement sous-cutané reste physiologiquement très différent de l'environnement prostatique. Les xénogreffes ainsi générées correspondent plus à un modèle de culture 3D qu'à de véritables tumeurs prostatiques (Wang et al., 2005).

Le modèle de transplantation au niveau de la capsule rénale est le plus récent car il a été introduit en 2005 (Wang et al., 2005). Dans ce tissu très vascularisé, le développement tumoral présente un taux de succès important. Cette technique est principalement utilisée pour l'étude des tumeurs primaires car elle induit un très faible taux de métastases. L'inconvénient majeur de ce modèle est que la tumeur n'est pas implantée dans son tissu natif et ne peut donc pas reproduire les interactions avec le milieu environnant tel qu'on le retrouve dans le cancer de la prostate.

Enfin, les modèles orthotopiques correspondent à l'introduction de cellules de cancer prostatique dans la prostate de souris, et se rapprochent le plus de ce qui peut exister en pathologie humaine. Cette technique existe depuis les années 1990 et a l'avantage d'être pertinente concernant les interactions entre le tissu implanté et l'organe d'origine. Elle permet de générer plus facilement des métastases (Stephenson et al., 1992), et autorise à la fois l'étude du processus tumorigénique et du processus métastatique. En effet, il est possible d'injecter des cellules androgéno-dépendantes telles que les LNCaP, et suite à la castration de la souris, de mimer la réponse tumorale observée lors de thérapies.

2) Avantages et inconvénients des modèles xénogreffes

Ces modèles permettent des analyses rapides et relativement peu chères des mécanismes liés au développement précoce et parfois jusqu'au stade métastatique du cancer de la prostate. De plus, le développement tumoral se fait dans un organisme entier où les mécanismes physiologiques impliqués dans la carcinogenèse sont présents. Cependant, leur principal inconvénient est que les xénogreffes nécessitent l'utilisation de souris immunodéficientes afin que les cellules humaines transplantées ne soient pas détruites par le système immunitaire de la souris. Le microenvironnement dans lequel se développe la tumeur est donc anormal, d'autant plus qu'il est établi que le système immunitaire joue un rôle majeur dans le développement du cancer. Ces modèles ne permettront pas non plus l'étude de

Nom du modèle	Altération génétique	Phénotype	Métastases
Pten ^{-/-}	Délétion d'une séquence codante de <i>Pten</i>	6 semaines : PIN Semaines 9 à 29 : carcinome invasif	Oui
Pten ^{-/-} ;p53 ^{-/-}	Délétion de <i>Pten</i> et de <i>p53</i>	11 semaines : carcinomes 28 semaines : létalité	Non
Pten ^{-/-} ;Smad4 ^{-/-}	Délétion de <i>Pten</i> et de <i>Smad4</i>	7 semaines : PIN de bas grade 11 semaines : carcinomes invasifs 32 semaines : létalité	Oui
Pten ^{-/-} ;p53 ^{-/-} ;Smad4 ^{-/-}	Délétion de <i>Pten</i> , <i>p53</i> et <i>Smad4</i>	17 semaines : létalité	Oui
TRAMP	Expression de l'antigène SV40 petit/grand t	8-12 semaines : hyperplasie 18 semaines : maladie métastatique	Oui
Hi Myc	Expression forte de <i>Myc</i>	3 mois : PIN 6 mois: cancer invasif	Non
Lo Myc	Expression faible de <i>Myc</i>	6-12 mois : PIN >12 mois : cancer invasif	Non
LADY	Expression de l'antigène SV40 T	10-15 semaines : dysplasies 15-22 semaines : carcinomes	Oui
MPAKT	Expression de <i>Myr-HA-Akt1</i>	PIN très tôt à la naissance Pas de développement de carcinome à plus de 78 semaines	Non

Tableau 3 : Exemples de modèles génétiques murins utilisés pour l'étude du cancer de la prostate

Le choix du modèle génétique dépend des aspects moléculaires que l'on veut étudier. Tous ne développent pas de cancer à la même vitesse, et certains n'évolueront pas jusqu'aux stades métastatiques.

D'après *Cunningham and You 2015*

l'immunobiologie du cancer de la prostate. De plus, le cancer de la prostate est caractérisé par sa grande hétérogénéité. Or, lors de ces transplantations, une seule lignée cellulaire est injectée avec une unique combinaison de défauts génétiques, il y a donc une perte de cette hétérogénéité. Pour pallier cela, d'autres modèles ont depuis été développés avec notamment les modèles PDX (*patient-derived xenograft models*). Dans ces modèles, un fragment de tissu tumoral prostatique humain est directement greffé dans une souris immunodéficiente (Lin et al., 2014). Même si des souris au système immunitaire affecté doivent être utilisées, ces modèles reflètent mieux la génétique du cancer de la prostate avec son hétérogénéité puisque le tissu implanté possèdera directement une partie de la tumeur avec ces différents types cellulaires. Une des utilisations de ces modèles est le test de nouvelles thérapies de manière rapide ; mais aussi l'étude des mécanismes de résistance aux thérapies (Tentler et al., 2012).

3) Les modèles génétiques

De nombreux modèles génétiques ont été établis depuis les années 1990 (**tableau 3**). Ils ont été générés par délétion de tout ou d'une partie d'un gène suppresseur de tumeur, ou par insertion de copies d'un oncogène. Leur excision ou leur expression respective est réalisée spécifiquement dans l'épithélium prostatique. Contrairement à la plupart des modèles xénogreffes, la progression tumorale se fait donc dans un environnement prostatique avec un système immunitaire intact. Parmi les modèles existants, le modèle PB-Cre4x*Pten*^{loxp/loxp} est actuellement l'un des plus utilisés.

Le modèle PB-Cre4x*Pten*^{loxp/loxp} a été introduit en 2003. Il est caractérisé par une activation constitutive de la voie PI3K/AKT et présente un développement tumoral de la prostate similaire à ce qu'on peut observer chez l'homme avec présence de néoplasies intraépithéliales de bas grade et de haut grade, des carcinomes et parfois des métastases au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques (Wang et al., 2003c; Kwak et al., 2013). Un système Cre/Loxp est utilisé dans ces souris afin d'avoir un contrôle spatio-temporel de la délétion de *Pten*. La cre recombinase est une nucléase issue d'un bactériophage qui est capable de reconnaître des séquences conservées, les sites Loxp. Elle pourra ensuite exciser toute l'information génétique codée entre deux de ces sites (Abremski and Hoess, 1984). Dans le modèle *Pten*^{-/-}, la cre se trouve sous la dépendance d'un promoteur spécifique de la probasine, couplé à deux éléments de réponse au récepteur des androgènes (ARR2PB^{-Cre4}). Grâce à l'allèle *Pten*^{loxp/loxp}, il est donc possible d'inactiver le gène *Pten* spécifiquement au niveau de l'épithélium prostatique. Ce modèle peut ensuite être utilisé pour générer des modèles bigéniques comme par exemple avec ceux porteurs d'une délétion pour *Nkx3.1* ou

p27^{kip1} (Di Cristofano et al., 2001; Kim et al., 2002b) ou ceux surexprimant *K-Ras* (Mulholland et al., 2012) ou *Myc* (Clegg et al., 2011). Le choix des altérations géniques utilisées devra tenir compte des objectifs de l'expérimentation. En effet, tous les modèles ne développent pas de métastases par exemple.

La souris présente une organisation histologique de la prostate différente de celle de l'homme. La prostate humaine est organisée autour de l'urètre en 3 zones : centrale, de transition et périphérique. Les lobes murins, présents par paires, sont morphologiquement différents des zones prostatiques humaines (Lee et al., 2011) et ne présentent pas tous la même sensibilité aux androgènes, reflet des niveaux d'expression du récepteur des androgènes. Les lobes ventraux sont ceux qui expriment le taux le plus élevé de AR et ils régressent entièrement en cas de castration. Les lobes latéraux et dorsaux expriment des taux plus faibles de AR et, bien qu'ils répondent aux androgènes, la privation hormonale induit une régression moindre de l'épithélium. Les lobes antérieurs accolés aux vésicules séminales n'ont pas d'équivalent anatomique dans la prostate humaine. Cette différence de sensibilité aux androgènes entre les lobes peut avoir un impact dans les modèles établis car le promoteur spécifique de la prostate le plus utilisé est celui de la probasine, qui est un gène androgéno-régulé. Les lobes ventraux seront donc plus sensibles à l'excision de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'expression d'oncogènes. Outre la prostate en elle-même, le compartiment stromal est également différent. Il est en effet très mince chez la souris, comparé au stroma fibromusculaire dense de l'homme.

Enfin, seul un nombre limité de mutations peut être étudié en simultané chez la souris, du fait de la complexité de la gestion des lignées mutantes et du faible nombre d'animaux générés. L'étude des interactions qui peuvent exister entre les différentes voies de signalisation qui sont altérées au cours de la tumorigenèse est donc plus complexe dans ce modèle. Dans ce contexte, le modèle *Drosophile* se place comme une alternative intéressante pour l'étude des mécanismes moléculaires complexes mis en jeu lors du développement du cancer de la prostate.

Table 1 | **Categories of human disease genes well suited to analysis in *Drosophila melanogaster****

Disease	Human gene symbol	Fly gene symbol	Gene product	References
Dysmorphology				
Synpolydactyly	<i>HOXD13</i> [‡]	<i>Abd-B</i> [§]	Transcription factor	140–142
Single bone in zeugopod	<i>HOXD9–HOXD13</i> (heterozygous deletion)	<i>Abd-B</i> [§]	Transcription factor	143,144
Hand-foot-genital syndrome	<i>HOXA13</i> or heterozygous <i>HOXA11–13</i> deletion	<i>Abd-B</i> [§]	Transcription factor	145–149
Aniridia	<i>PAX6</i>	<i>ey</i> [§] , <i>toy</i> [§]	Transcription factor	150–153
Townes-Brooks syndrome	<i>SALL1</i>	<i>salms</i> [§] , <i>salr</i> [§]	Transcription factor	154–156
Saethre-Chotzen syndrome	<i>TWIST1</i>	<i>tw</i> [§]	Transcription factor	133
Pfeiffer syndrome	<i>FGFR1</i> , <i>FGFR2</i>	<i>hth</i> [§]	RTK	157
Apert syndrome	<i>FGFR2</i>	<i>hth</i> [§]	RTK	157
Crouzon syndrome	<i>FGFR3</i>	<i>hth</i> [§]	RTK	157
Saethre-Chotzen syndrome-like	<i>FGFR3</i> , gain-of-function?	<i>hth</i> [§]	RTK	133
Alagille syndrome	<i>JAG1</i>	<i>Ser</i> [§] , <i>DI</i> [§]	Notch ligand	158
Spondylocostal dysostosis	<i>DLL3</i>	<i>DI</i> [§]	Notch ligand	159
Primary congenital glaucoma	<i>CYP11B1</i>	<i>Cyp18a1</i> [§]	Cytochrome P450	108,109
Cardiac disease				
Congenital heart disease	<i>NKX2-5</i>	<i>tin</i> [§]	Transcription factor	160–163
	<i>GATA4</i>	<i>pnr</i> [§]	Transcription factor	163–165
Holt–Oram syndrome	<i>TBX5</i>	<i>Doc1–Doc3</i> [§]	Transcription factor	166–168
DiGeorge syndrome	<i>TBX1</i>	<i>org-1</i> [§] , <i>bi</i> [§]	Transcription factor	169
Venous malformations	<i>TEK</i>	<i>hth</i> [§]	RTK	170
Neurological				
Spinocerebellar ataxia	<i>SCA1</i> (also known as <i>ATXN1</i>) <i>SCA2</i> (also known as <i>ATXN2</i>) <i>SCA6</i> (also known as <i>CACNA1A</i>) <i>SCA14</i> (also known as <i>PRKCG</i>) <i>SCA17</i> (also known as <i>TBP</i>)	<i>CG4547</i> <i>CG5166</i> <i>cac</i> [§] , <i>Ca-α1D</i> [§] <i>inaC</i> [§] , <i>Pkc53E</i> <i>Tbp</i> [§]	Transcription cofactor? Unknown Ca ²⁺ ion channel Ca ²⁺ -dependent PKC TATA binding protein	27,30,171
Huntington disease	<i>HD</i>	<i>huntingtin</i> [§]	Axonal transport?	30,172–174
Spinal and bulbar muscular atrophy 3	<i>AR</i>	<i>ERR</i> , <i>svp</i> [§]	Androgen receptor	27,171
Parkinson disease	<i>PARK2</i>	<i>park</i> [§]	E3-ubiquitin ligase	49–51
	<i>PARK5</i> (also known as <i>UCHL1</i>)	<i>Uch</i>	Ubiquitin pathway	28–30
	<i>PARK7</i>	<i>dj-β</i> , <i>CG6646</i>	Androgen-R regulator?	
	<i>NR4A2</i>	<i>Hr38</i> [§]	Nuclear hormone receptor	
	<i>MAPT</i>	<i>tau</i> [§]	Microtubule binding	30,175
	<i>PINK1</i>	<i>CG4523</i> [§]	PTEN-induced kinase	176
Alzheimer disease	<i>PSEN1</i> , <i>PSEN2</i> <i>APP</i>	<i>Psn</i> [§] <i>App</i> [§]	γ-Secretase Signalling, axonal transport?	27–30,66
Fragile X syndrome	<i>FMR1</i>	<i>Fmr1</i> [§]	Translational regulator	72,177,178
Angelman syndrome	<i>UBE3A</i>	<i>ubx3A</i> [§]	E3-ubiquitin ligase	179,180
Cancer				
Tuberous sclerosis	<i>TSC1</i> , <i>TSC2</i>	<i>tsc1</i> [§] , <i>tsc2</i> [§]	GAP for RHEB in TOR pathway	86,181–184
Endometrial carcinoma	<i>PTEN</i>	<i>Pten</i> [§]	Negative regulator PI3K	86,92
No known disease mutations in homologue	<i>LATS1</i>	<i>wtb</i> [§] (also known as <i>lats</i>)	Cyclin regulation?	94,95
Renal cancer lines	<i>SAV1</i>	<i>sav</i> [§]	Cyclin regulation?	96
No known disease mutations in homologue	<i>MST1</i> , <i>MST2</i> (also known as <i>STK3</i>)	<i>hpo</i> [§]	Cyclin regulation?	97
Bladder and colorectal cancer	RAS family genes	<i>Ras85D</i> [§]	RTK signalling	185
No known disease mutations in homologues	<i>SCRIB</i> , <i>LLGL1</i> , <i>DLG1</i>	<i>scrib</i> [§] , <i>l(2)g</i> [§] , <i>dlg1</i> [§]	Cell polarity, metastasis in the presence of RAS-V12	
B-cell leukaemia	<i>CCND1</i>	<i>CycD</i> [§]	Cell cycle	93
Melanoma	<i>CDK4</i>	<i>Cdk4</i> [§]	Cell cycle	
Retinoblastoma	<i>RB1</i>	<i>Rbf</i> [§] , <i>Rbf2</i>	Cell cycle	
Hepatocellular carcinoma	<i>TP53</i>	<i>hth</i> [§] (e<10 ⁻¹⁰)	Cell cycle	
Ectodermal dysplasia	<i>TP73L</i>	<i>hth</i> [§] (e<10 ⁻⁷)	Cell cycle	

*An extended version of this table with additional disease categories can be found online. All e-values <10⁻⁴⁰ unless otherwise indicated. †Mild heterozygotes and strong null phenotypes. GAP, GTPase-activating protein; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; PTEN, phosphatase and tensin homologue; RAS-V12, a constitutively active form of RAS; RHEB, RAS homologue enriched in brain; RTK, receptor tyrosine kinase; TOR, target of rapamycin. ‡D. *melanogaster* genes for which mutant as well as wild-type alleles have been isolated.

Tableau 4 : Pathologies humaines pour lesquelles la drosophile est un modèle d'étude

La quantité importante d'orthologues de gènes chez la drosophile (>70%) permet une large gamme d'études de pathologie humaines.

Bier, 2005

II. Le modèle drosophile

A) Intérêt de l'utilisation de la drosophile dans l'étude de pathologies humaines

La drosophile (*Drosophila melanogaster*) est un modèle de référence pour les études génétiques et de développement. C'est notamment dans ce modèle que le lien entre la délétion de *Notch* et des défauts de développement a été établi ; et on sait maintenant que *Notch* est aussi pertinent dans le cancer (Poulson, 1945, 1950). Cela a conduit à la recherche et l'identification de gènes et de voies de signalisation impliquées dans le développement de la drosophile et dont la dérégulation peut également être retrouvée dans le cancer (Lewis, 1978; Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Dès les années 1900s, la drosophile a été l'un des premiers systèmes expérimentaux à montrer une mutation létale récessive, *Lethal 7*, causant des tumeurs malignes transplantables (Stark, 1919). Dans les années 1960/1970, les généticiens ont identifié chez la drosophile plusieurs mutants développant des tumeurs malignes conduisant à une létalité (Gateff and Schneiderman, 1969; Gateff, 1978). C'est pourquoi la drosophile est de plus en plus utilisée pour l'étude de pathologies humaines. En effet, même si la drosophile semble de prime abord extrêmement éloignée de l'homme, les mécanismes biologiques fondamentaux ainsi que les voies de signalisation sont conservées entre cette espèce et l'Homme.

Le génome de la drosophile a été entièrement séquencé et annoté en 2000, révélant 13600 gènes (Adams et al., 2000), contre 22500 chez l'homme. Il présente peu de redondances génétiques comparé aux modèles mammifères ce qui facilite les études de perte de fonctions. De plus, environ 70% des gènes identifiés comme étant mutés, délétés ou encore amplifiés et associés à des pathologies humaines ont un orthologue chez la drosophile (Bernards and Hariharan, 2001; Bier, 2005). Le rôle physiologique de certains de ces gènes chez la drosophile a été étudié afin de pouvoir générer les modèles correspondants de pathologies humaines (**tableau 4**).

La drosophile présente en outre de nombreux autres avantages : un cycle de développement court (10 jours à 25°C) (**figure 35**), avec de nombreux descendants, une anatomie bien décrite et une grande disponibilité d'outils génétiques. De plus, son élevage représente un faible coût et elle est facile de manipulation.

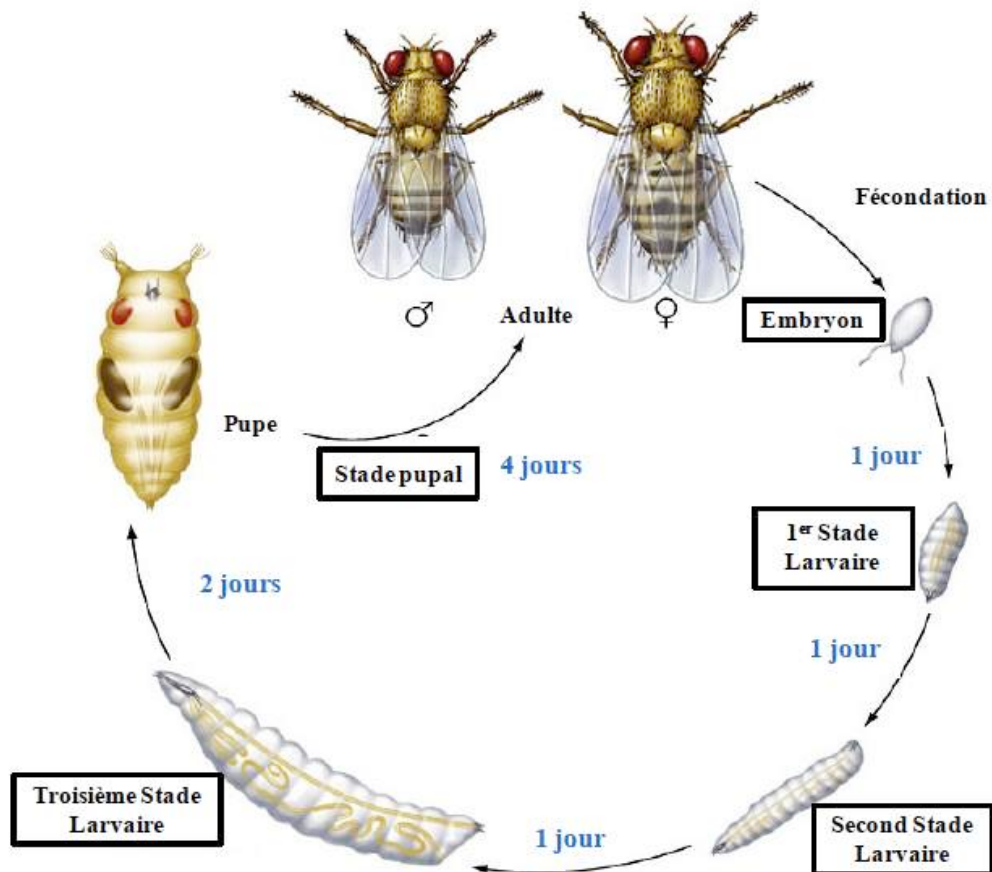


Figure 35 : Cycle de développement de la drosophile

La durée moyenne de développement de la drosophile est de 10 jours à 25°C. Il se fait en différentes étapes : un stade embryonnaire d'environ 24h où a lieu la gastrulation et la neurulation, trois stades larvaires durant lesquels les organes formés pendant l'embryogenèse se développent ainsi que plusieurs ébauches des organes adultes : les disques imaginaux. Puis, durant le stade pupal, la plupart des tissus formés lors des stades précédents sont détruits par histolyse. La mouche adulte se forme alors à partir des disques imaginaux. L'éclosion a lieu après 4 jours de pupaison.

(Source internet : www.easternct.edu)

B) Outils génétiques

La manipulation de l'expression de gènes chez la drosophile est permise par l'existence d'une vaste quantité de lignées transgéniques contenant des délétions, des insertions d'éléments P, des inversions, des duplications ou encore des systèmes d'expression d'ARN interférents. Ces différentes lignées sont disponibles (Stock Centers Bloomington, VDRC, ...) et référencées sur Flybase (<http://flybase.org>).

1) Les transposons

Les transposons sont des éléments présents naturellement notamment dans le génome de la drosophile, et qui ont été détournés de leur fonction primaire afin de pouvoir insérer des séquences d'intérêt dans le génome. En effet, ils ont la particularité de pouvoir se déplacer dans le génome et de s'insérer grâce à une enzyme codée par le transposon lui-même, la transposase, qui reconnaît une séquence d'une trentaine de nucléotides au niveau des extrémités du transposon (Engels et al., 1990). L'élément transposable P est génétiquement modifié afin qu'il ne puisse plus se déplacer de manière autonome. La séquence du gène d'intérêt (gène muté, ARNi, ...) est insérée à la place de la séquence de la transposase. Il est ensuite inséré dans le génome de manière aléatoire ou dirigée avec des sites d'insertions identifiés. Son site d'insertion est important car s'il s'insère dans un gène, il pourra en altérer l'expression.

L'utilisation de ces transposons permet la génération d'une grande quantité de lignées de mouches présentant des altérations sur divers gènes, facilitant leur étude.

2) Les systèmes binaires

Des outils tels que le système UAS/GAL4 permettent un contrôle de l'expression de gène de manière tissu-spécifique. GAL4 est un facteur de transcription issu de la levure dont la séquence codante peut être insérée dans le génome de la drosophile grâce à un élément P en aval de la région promotrice d'un gène à l'expression restreinte au type cellulaire objet de l'analyse. Il sera ainsi produit de manière cellules/tissus spécifiques. Le GAL4 néo-synthétisé se fixera au niveau d'une séquence UAS (*Upstream activator Sequence*) que l'on aura placée en amont de la séquence codant pour une protéine d'intérêt. Ceci permettra une expression génique spécifique selon le patron d'expression de la protéine GAL4 (Brand and Perrimon, 1993).

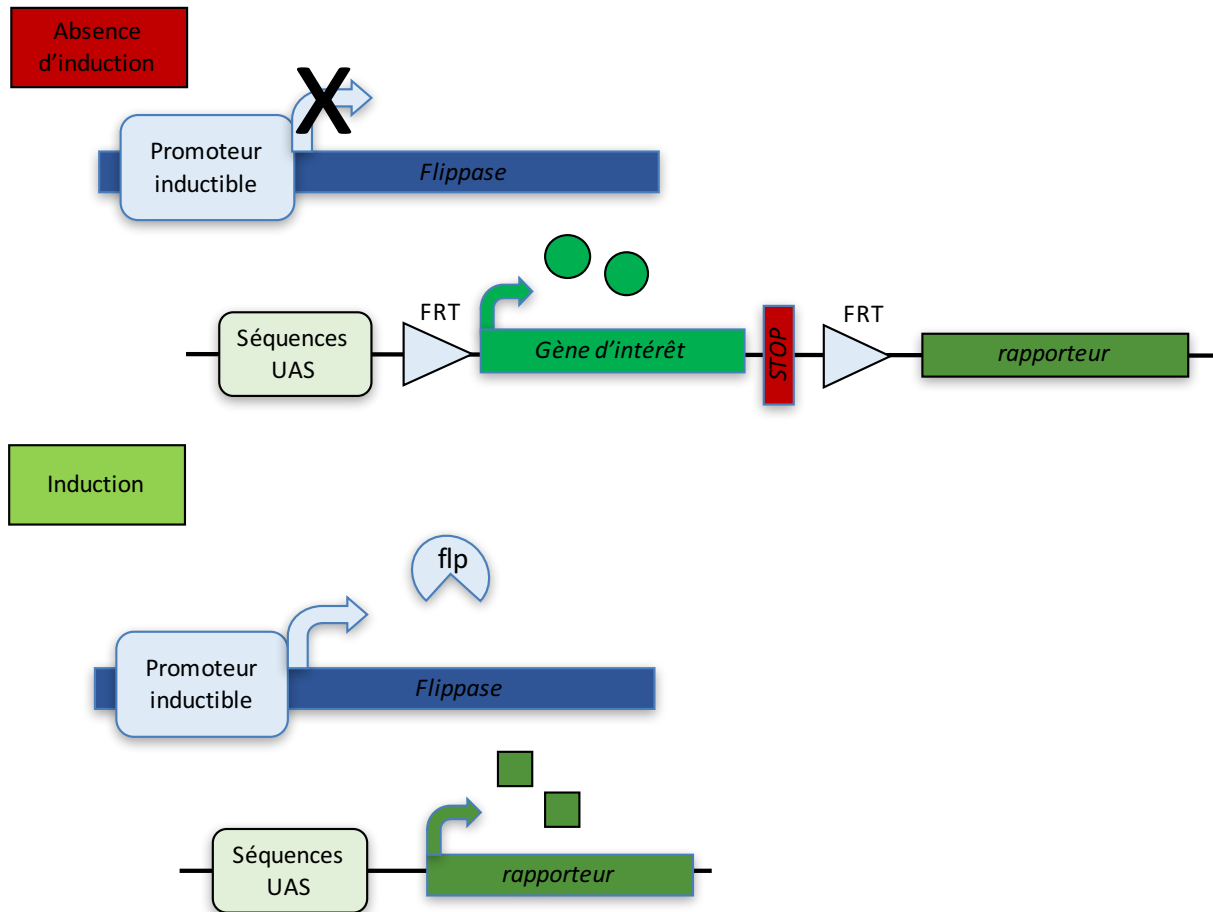


Figure 36 : Le système mosaïque Flippase/FRT

En absence d'induction, la flippase n'est pas produite. La séquence d'intérêt, flanquée de deux sites FRT est exprimée. La présence d'un STOP transcriptionnel après cette séquence empêche l'expression du gène rapporteur.

Lors d'une induction, la flippase est produite et reconnaît les sites FRT. Elle excise la région génomique se trouvant entre les deux sites FRT, ce qui conduit à l'élimination de la séquence d'intérêt et du STOP transcriptionnel. L'efficacité de la recombinaison peut être suivie grâce à l'expression du gène rapporteur (GFP par exemple).

Afin de pouvoir moduler l'expression temporelle du gène d'intérêt, le système UAS/GAL4 a été modifié, en le combinant par exemple à l'utilisation de GAL80 qui est un inhibiteur naturel de GAL4. Une version mutante thermosensible, GAL80^{ts} a été créée (McGuire et al., 2004) afin de contrôler son action inhibitrice. A basse température (ou température restrictive), GAL80^{ts} se lie à GAL4 et empêche sa liaison sur les séquences UAS. A une température supérieure ou égale à 29°C (température permissive) GAL80^{ts} se trouve inactivée et permet à GAL4 de se fixer sur les séquences UAS et d'induire l'expression du gène en aval (McGuire et al., 2003).

3) Les systèmes mosaïques

L'étude de certaines mutations peut poser des problèmes à cause d'une létalité induite importante. Dans ce contexte, la technique de mosaïque génétique proposée par Xu et Rubin a été une grande avancée (Xu and Rubin, 1993). Cette technique est basée sur une recombinaison mitotique *in vivo* avec le système FLP(flippase)/FRT(*FLP recognition target*)(Golic and Lindquist, 1989). Il s'agit d'un système similaire à Cre/Loxp où la flippase est une recombinase qui est capable de reconnaître les séquences FRT, qui sont des séquences répétées inversées. La flippase permet ainsi la recombinaison entre deux sites FRT et peut exciser toute séquence d'intérêt flanquée de deux sites FRT. Afin de permettre un contrôle temporel de l'expression de la flippase ; son gène est placé en amont du promoteur *Hsp70* (**figure 36**). Lors d'un choc thermique de la mouche entière (37°C), les cellules exprimant suffisamment de flippase pourront réaliser la recombinaison. Plus le temps du choc thermique est long, plus la quantité de flippase produite est importante et plus le nombre de cellules réalisant la recombinaison est important ; ceci permet d'avoir un niveau de mosaïcisme maîtrisé par l'expérimentateur. Cette technique a permis de réaliser des cribles génétiques en présence de mutations de gènes affectant des mécanismes biologiques essentiels. L'expression mosaïque permet l'induction de clones somatiques de cellules mutantes dans un tissu vivant sain et ainsi la coexistence de cellules avec différents génotypes dans un seul organisme. De plus, cette technique permet d'induire de multiples populations cellulaires reflétant l'hétérogénéité tumorale.

Grâce à cette technique, la drosophile se place comme un modèle intéressant pour l'étude du cancer, initié dans un tissu sain à la suite de l'altération d'un faible nombre de cellules. Concernant le cancer de la prostate, elle permet en plus de reproduire l'hétérogénéité telle qu'on la retrouve dans la pathologie.

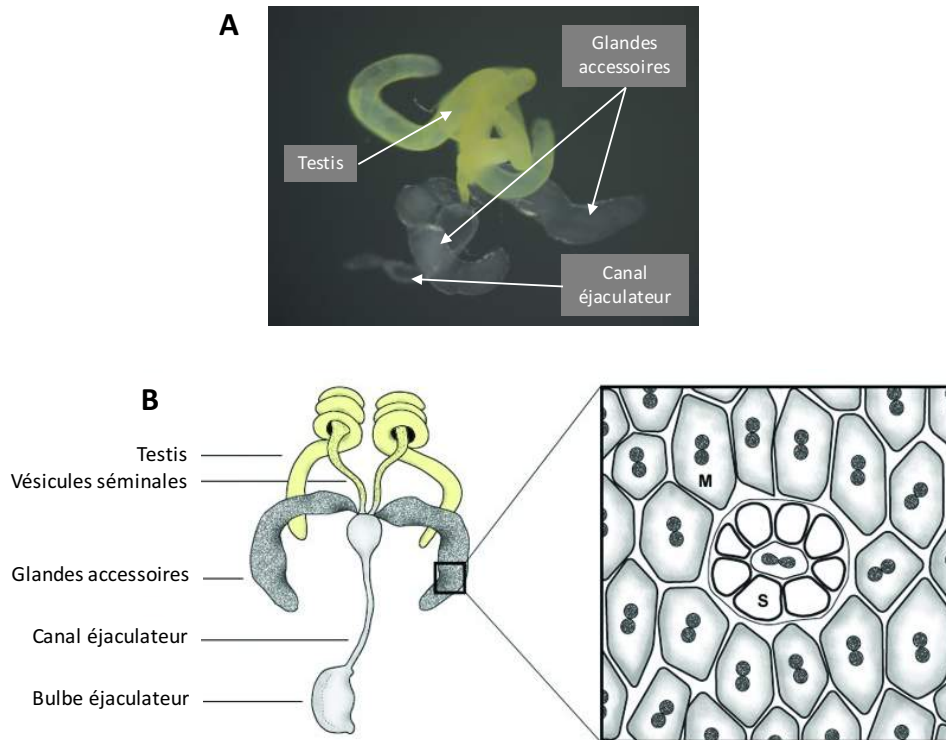


Figure 37 : Structure du tractus génital mâle et des glandes accessoires de la drosophile

Le tractus génital mâle se compose de 2 testis, un canal déférent, un canal éjaculateur, un bulbe éjaculateur et deux glandes accessoires.

A) Photo du tractus génital mâle. Une mutation du gène *yellow* permet de visualiser les testis en jaune.

B) Les glandes accessoires sont constituées de deux types de cellules épithéliales binucléées : les cellules primaires (M) et les cellules secondaires (S). Les cellules secondaires sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules de sécrétion dans le cytoplasme.

D'après Schnakenberg et al., 2012

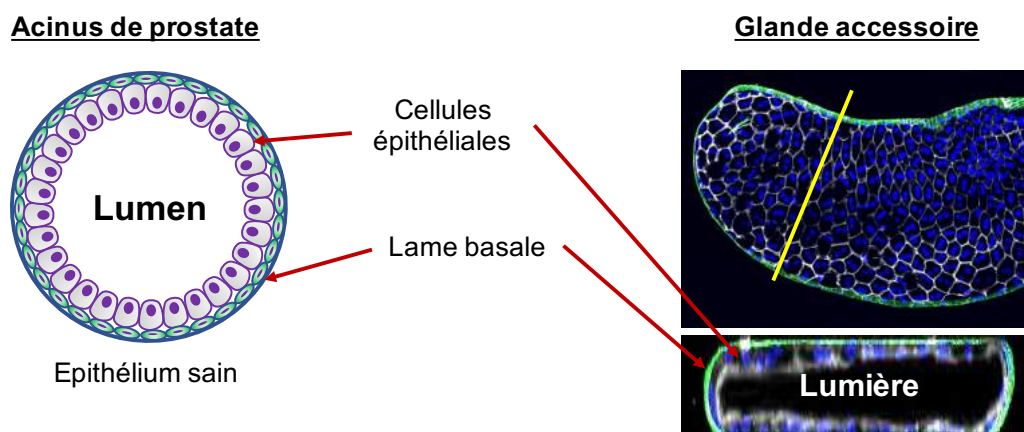


Figure 38 : La structure de l'épithélium de la glande accessoire est similaire à l'acinus prostatique

L'acinus prostatique et la glande accessoire sont composés d'un compartiment épithélial avec : les cellules épithéliales basales et luminales pour la prostate, et les cellules primaires et secondaires pour la glande accessoire. Ce compartiment épithélial repose sur une lame basale, visible dans la glande accessoire grâce à l'expression de *collagène IV* couplée à la GFP.

C) L'intérêt du modèle drosophile dans l'étude du cancer de la prostate

1) Anatomie du système reproducteur

Le système reproducteur chez la drosophile est constitué de structures dont les fonctions sont similaires à celles retrouvées chez l'homme : deux vésicules séminales, deux testis et un canal éjaculateur, et deux glandes accessoires (Schnakenberg et al., 2012) (**figure 37**). Les cellules du canal éjaculateur, du bulbe éjaculateur, des vésicules séminales et des glandes accessoires sont sécrétrices et permettent la production du fluide séminal comme cela existe chez l'homme.

(1) Description des glandes accessoires

Les glandes accessoires sont considérées comme un équivalent fonctionnel de la prostate. Leur rôle principal est de sécréter différentes protéines qui entrent dans la composition du liquide séminal telles que des protéases ou des glycoprotéines (Wolfner, 1997; Walker et al., 2006; Rylett et al., 2007; Wilson et al., 2017a), des protéines sécrétrices riches en cystéines (Krätzschmar et al., 1996; Udby et al., 2005; Ernesto et al., 2015) et des lectines (Ram and Wolfner, 2009; Garénaux et al., 2015). De plus, parmi les protéines identifiées dans le fluide séminal chez la drosophile, on retrouve des protéases (Findlay et al., 2008, 2009) à l'instar de l'homme chez qui les protéases et inhibiteurs de protéases sont très abondants dans le fluide séminal (Laflamme and Wolfner, 2013). Enfin, comme chez l'homme, les protéines sécrétées par les glandes accessoires peuvent moduler la résistance aux bactéries et l'immunité (Peng et al., 2005; Short et al., 2012), notamment dans le tractus génital femelle. Chez la drosophile, les protéines sécrétées ont quelques fonctions supplémentaires. Elles agissent sur l'efficacité de la ponte (élevée les jours suivant l'accouplement) mais aussi sur le comportement de la femelle. Elles induisent notamment une diminution de sa réceptivité pour un autre mâle durant quelques jours (Wolfner, 1997). C'est le cas des protéines Sex-peptide (SP ou Acp70A, *Accessory gland protein 70A*), l'Ovuline (Acp26Aa (Herndon and Wolfner, 1995)) et CG33943 (Ram and Wolfner, 2007), produites par les cellules primaires et transférées à la femelle lors de l'accouplement (Chen et al., 1988).

Les glandes accessoires ont une structure semblable à celle d'un acinus dans la prostate humaine (**figure 38**). Chaque glande est composée d'un épithélium monostratifié comportant environ 1000 cellules délimitant une lumière. Cet épithélium est constitué de deux types cellulaires : les cellules primaires ou primordiales plates et hexagonales, représentant

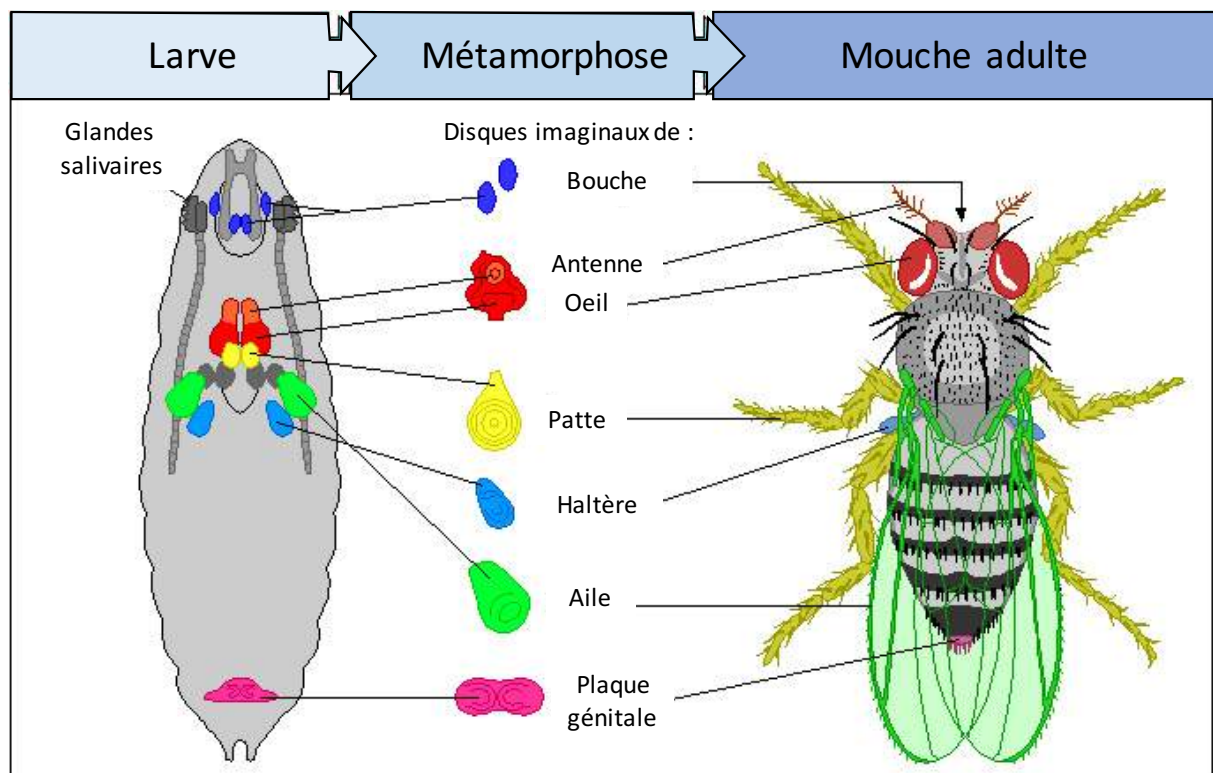


Figure 39 : Les disques imaginaux, précurseurs des structures adultes

A l'exception du disque imaginal génital, les disques imaginaux se présentent par paires. Ils se développent tout au long du stade larvaire et sont à l'origine des structures cuticulaires adultes.

Source internet : http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_02/fig2_6.jpg

96% des cellules épithéliales sécrétrices et les cellules secondaires peu nombreuses (<4%), sphériques et majoritairement situées à l'extrémité de la glande (Bairati, 1968; Kalb et al., 1993). Les cellules de cet épithélium ont la particularité d'être binucléées. En effet, la dernière mitose est incomplète : elle se fait sans cytokinèse lors du stade pupal, environ 50h après la formation de la pupa (Taniguchi et al., 2014).

Le compartiment épithélial est entouré d'une couche de cellules musculaires striées mononucléées (Susic-Jung et al., 2012). Lors de l'accouplement, la contraction du tissu musculaire permet l'expulsion du liquide accumulé dans la lumière de la glande vers le canal éjaculateur puis la femelle (Gilchrist and Partridge, 2000).

(2) Le développement des glandes accessoires

L'organogenèse chez la drosophile se fait à partir des disques imaginaux durant le stade larvaire (**figure 39**). Il s'agit d'amas de cellules répartis tout le long de la larve, qui seront à l'origine des différentes structures de l'adulte : les yeux, les pattes, les ailes, les antennes ou encore les structures génitales. Alors que la plupart des disques imaginaux se présentent en paires, il n'y a qu'un seul disque génital au niveau postérieur des larves. Il est à l'origine de l'intestin postérieur et des différents organes génitaux, dont les glandes accessoires.

Peu d'études sont disponibles dans la littérature concernant le développement de ces glandes accessoires. Elles seraient dérivées de cellules mésodermiques qui migrent dans la larve au niveau du disque imaginal génital (Ahmad and Baker, 2002). Pour cela, plusieurs signaux sont nécessaires dont le facteur FGF (*Branchless* chez la drosophile), qui permet aux cellules mésodermiques exprimant le récepteur au FGF de migrer vers ce disque imaginal génital (Ahmad and Baker, 2002; Thomson and Marker, 2006). En effet, une perte d'expression de *fgf* est associée à une absence de migration de ces cellules exprimant *fgfr*. Le deuxième facteur bien décrit est le facteur de transcription Paired (Prd), appartenant à la famille Pax. En son absence, les glandes accessoires sont très réduites voire inexistantes, indiquant qu'il est primordial pour le développement de ces organes (Xue and Noll, 2000, 2002). Il est également important chez l'adulte, où il est très exprimé dans les cellules primaires et secondaires, et où il assure le maintien de l'état différencié (Xue and Noll, 2002).

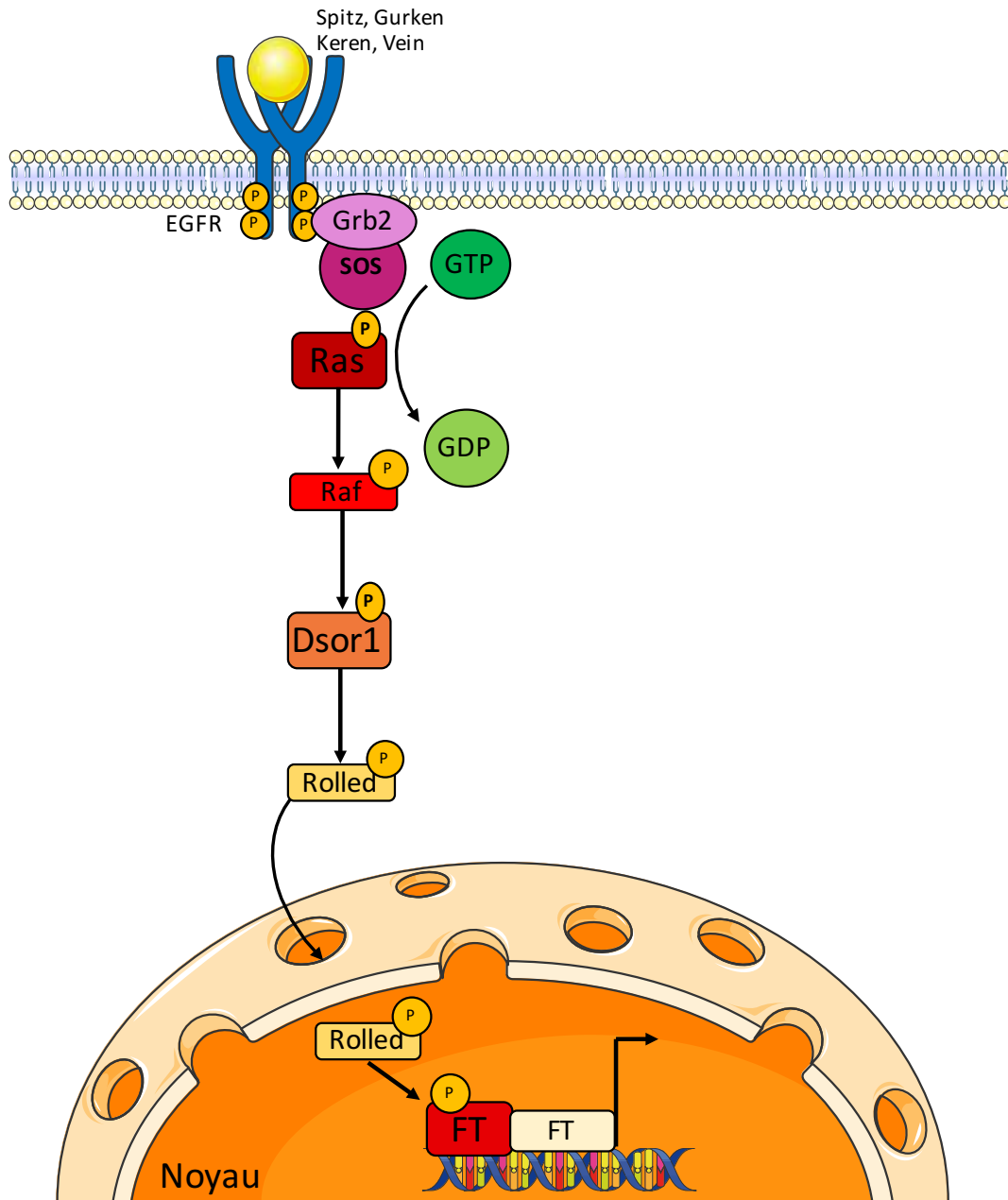


Figure 40 : La voie RAS/MAPK chez la drosophile

La fixation d'un des quatre ligands (spitz, keren, vein ou gurken) sur le récepteur EGFR, conduit à l'activation de la voie RAS/MAPK en aval. Elle est constituée d'effecteurs similaires à la signalisation chez l'homme : GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound protein 2*), SOS (*Son of sevenless*), RAS, RAF, DSOR1 (MEK), Rolled (ERK).

Au final, l'activation de ERK permet l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la survie, la prolifération ou encore la différenciation.

2) Conservation des mécanismes généraux impliqués dans le cancer de la prostate

Comme chez les mammifères, la mise en place d'un processus tumorigénique chez la drosophile implique une dérégulation de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *Scribble*, *Disc large* ou encore *Merlin* soutient la prolifération cellulaire (Bilder et al., 2000; McCartney et al., 2000; Gardiol et al., 2006). D'autre part une suractivation de la signalisation Hippo entraîne une augmentation de l'expression de la Cycline E, favorisant le cycle cellulaire ; et de DIAP1 un inhibiteur de l'apoptose (Hay and Guo, 2003). Il est donc possible de moduler la balance prolifération/apoptose dans cet organisme et d'étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de carcinogenèse. De plus, des mécanismes de régulation permettant le maintien de l'intégrité du génome sont présents chez la drosophile. C'est par exemple le cas pour la protéine P53, qui induit l'apoptose des cellules défectueuses (Sogame et al., 2003). Les dialogues présents chez les mammifères entre les voies de signalisation et les différents systèmes de régulation sont au moins partiellement conservés chez la drosophile.

Comme décrit dans le chapitre précédent, deux voies de signalisation majeures sont dérégulées dans le cancer de la prostate : les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR, bien conservées chez la drosophile.

(1) La voie RAS/MAPK

La signalisation RAS/MAPK représente une des cascades de signalisation les mieux conservées au sein des organismes. Elle est impliquée dans la survie, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire (Shilo, 2003). Comme chez les mammifères, la liaison d'un ligand sur le récepteur tyrosine-kinase entraîne sa dimérisation, puis le transfert de l'information au niveau cytoplasmique (**figure 40**). L'activation de la voie se fait par l'EGFR chez la drosophile, *via* quatre ligands différents : Vein, Spitz, Gurken et Keren (Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993; Reich and Shilo, 2002). Spitz représente le ligand principal, même s'il a une structure plus similaire au TGF- α chez les mammifères. L'expression de Gurken est restreinte à la lignée germinale où il est impliqué dans la détermination de l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral dans l'embryon (González-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995). Spitz, Keren et Gurken sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires qui devront être clivés par une protéase de la famille Rhomboid, Rhomboid-1, pour être sécrétés et actifs (Urban et al., 2002). Rhomboid-1, joue un rôle de facteur limitant dans l'activation des ligands de l'EGFR chez la drosophile : son expression corrèle avec l'activation de la voie

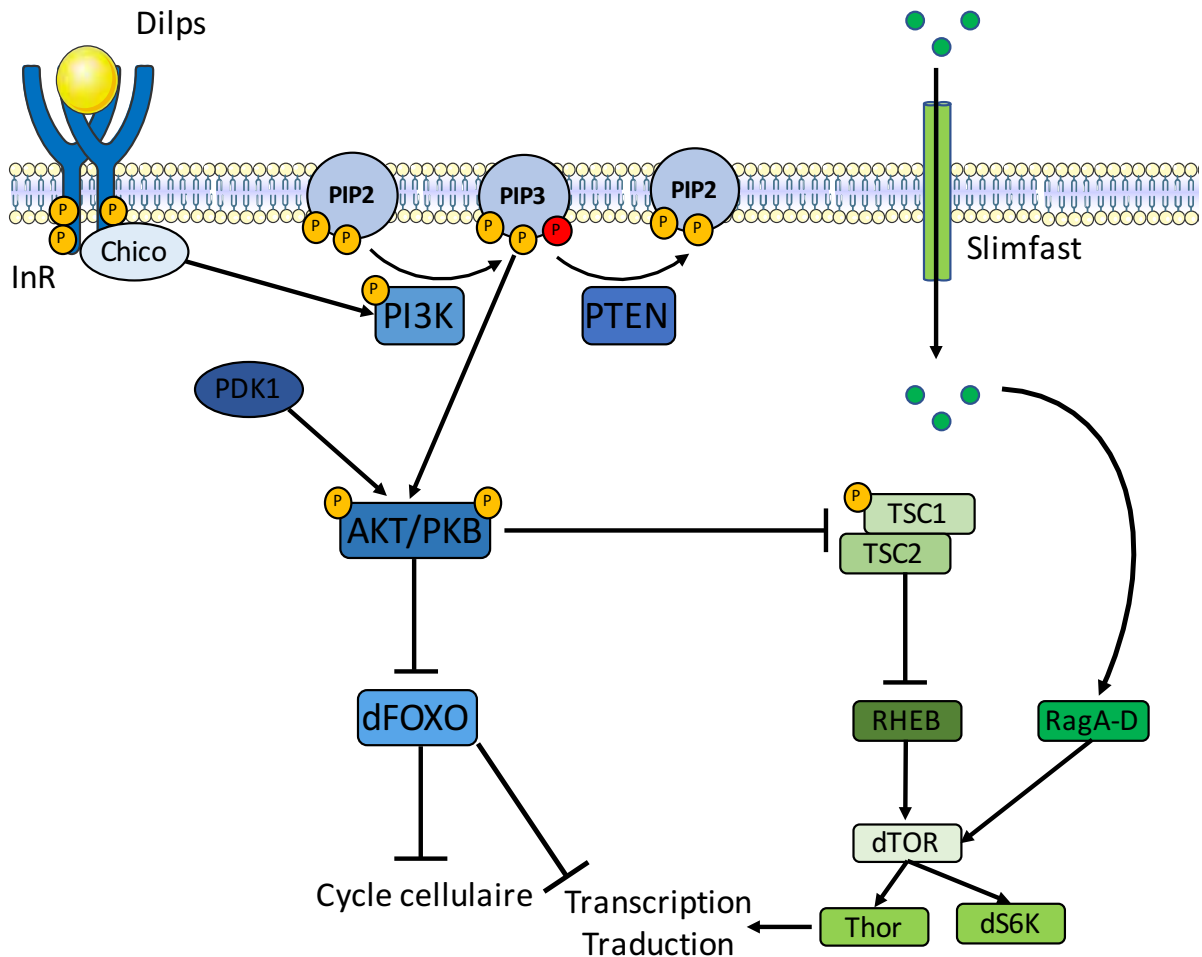


Figure 41 : La signalisation insulinique et la signalisation TOR chez la drosophile

Quand la concentration en acides aminés est élevée, les dILPS (*drosophila Insulin Like Peptide*) sont sécrétées dans le cerveau. Les dILPS se fixent sur le récepteur à l'insuline (InR) au niveau des tissus périphériques et enclenchent la signalisation en aval : Chico, puis PI3K, qui permet le recrutement d'AKT et de PDK1. AKT inhibe dFoxo et favorise donc la traduction, la transcription et l'avancée dans le cycle cellulaire. En plus de cette voie canonique, AKT réprime le complexe TSC1/TSC2, conduisant à la levée de répression sur RHEB et donc sur dTOR. De plus, les acides aminés sont capables d'entrer dans la cellule grâce à des protéines Slimfast (SLC7A family) et d'activer dTOR *via* la protéine RagA-D GTPase.

In fine, l'activation de la voie de signalisation InR/TOR permet de moduler la transcription, la traduction et également le cycle cellulaire et donc de favoriser la croissance.

RAS/MAPK tandis que l'expression de *Spitz* est ubiquitaire (Bier et al., 1990; Gabay et al., 1997). Une autre protéine importante dans la maturation des ligands est Star, puisqu'elle permet leur trafic du réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi où ils sont clivés par Rhomboïd (Lee et al., 2001). Au contraire, Vein est lui constitutivement sécrété et impliqué dans l'activation de l'EGFR dans des tissus tels que les ailes, ou les pattes (Simcox et al., 1996; Yarnitzky et al., 1997). Après activation de l'EGFR, à l'instar de ce qui existe chez les mammifères, le recrutement de GRB2 puis de Sos permettra l'activation de la cascade de signalisation en aval qui comprend RAS, RAF, MEK (Dsor1), ERK (Rolled).

La régulation de la voie implique l'expression d'une protéine antagoniste, Argos, sécrétée par les cellules suite à une activation importante de cette voie (Shilo et al., 2005). Argos inhibe l'activité de l'EGFR en séquestrant Spitz et en formant ainsi un complexe inactif. Il permet ainsi de limiter la diffusion du ligand. Deux autres protéines peuvent réguler l'activation de la voie. Tout d'abord Kekkou, qui est une protéine transmembranaire qui forme des complexes inactifs avec EGFR (Ghiglione et al., 1999). Sprouty, elle, est une protéine cytoplasmique capable d'inhiber la voie canonique RAS/MAPK à plusieurs niveaux, à l'instar du rôle de ses orthologues chez l'humain (Casci et al., 1999).

(2) La signalisation insulinaire et la signalisation TOR

Chez la drosophile, le contrôle de la croissance et du métabolisme se fait *via* deux voies de signalisation : la voie de signalisation IIS (*Insulin/Insulin like growth factor signaling*) (**figure 41**) et la voie de signalisation TOR.

(a) La signalisation insulinaire IIS

Chez la drosophile, la voie PI3K/AKT est hautement conservée et principalement activée *via* le récepteur insulinaire. Comme chez l'homme elle a un rôle fondamental dans le contrôle du métabolisme, la croissance cellulaire ou encore la longévité (Partridge and Gems, 2002).

Le récepteur à l'insuline (InR) est l'homologue des récepteurs InR et IGF1-IR chez les mammifères. Les ligands de ce récepteur sont les dILPS (*Drosophila insulin like peptides*), au nombre de huit, qui ont une expression spatio-temporelle différente (Kannan and Fridell, 2013). De plus, seules les dILPS 1 à 7 activent la voie canonique de l'insuline et favorisent la croissance cellulaire. Comme chez les mammifères, la liaison du ligand conduit à une cascade d'autophosphorylation au niveau du récepteur à l'insuline et la mise à disposition de domaines de liaison SH2 au niveau C-terminal. Cela permet le recrutement d'une protéine adaptatrice, Chico, qui est l'orthologue d'IRS1-4. Chico active alors la signalisation

PI3K/AKT en aval (Poltilove et al., 2000; Oldham and Hafen, 2003). La principale cible d'AKT est dFOXO (*forkhead box, subgroup « O »*), impliquée dans la régulation de l'expression de gènes du cycle cellulaire ou encore du métabolisme (Eijkelenboom and Burgering, 2013). Alors que quatre FOXO (FOXO 1, 3, 4, 6) ont été décrits chez les mammifères, il n'y en a qu'un chez la drosophile. Quand AKT n'est pas activé, dFOXO active la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la sénescence (Brunet et al., 1999). Une fois phosphorylée par AKT, dFOXO est piégé dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 et ne peut donc plus agir au niveau nucléaire, ce qui favorise la survie cellulaire.

L'activité de la voie est régulée par des mécanismes de rétrocontrôle. Par exemple, la transcription du récepteur à l'insuline est sous le contrôle de dFOXO. En effet, l'activation de la voie induit une diminution de sa transcription, et donc une diminution de la sensibilité des cellules aux dILPS (Puig and Tjian, 2005).

(b) La signalisation TOR

La voie de signalisation TOR régule la croissance et le développement en fonction du statut nutritionnel (Zhang et al., 2000; Colombani et al., 2003). Au niveau du corps gras elle est capable d'évaluer le niveau de nutriments disponibles dans l'hémolymph : quand la concentration en acides aminés circulants est élevée, le corps gras sécrète alors l'hormone stunted qui active la sécrétion des ligands dILPS par le cerveau de la drosophile, augmentant l'activité de la voie de signalisation IIS dans les autres cellules (Géminard et al., 2009; Delanoue et al., 2016). De plus, les acides aminés sont capables d'entrer dans la cellule grâce aux transporteurs SlimFast et d'activer mTOR, indépendamment des dILPS, grâce à la protéine RasA-D GTPase (Colombani et al., 2003; Kim et al., 2008). dS6K a été le premier composant de la voie TOR identifié chez la drosophile. C'est un homologue de S6K chez les mammifères, en aval de TOR comme le montre sa sensibilité à la rapamycine, et il présente des fonctions similaires (Stewart et al., 1996; Watson et al., 1996) en stimulant la croissance (Barcelo and Stewart, 2002). La drosophile possède également un homologue des 4E-BP1-3, THOR/d4E-BP, qui interagit avec deIF4E afin de d'empêcher l'initiation de la traduction des ARNm. Cette liaison est modulée par la phosphorylation de THOR, qui dépend à la fois de la signalisation par l'insuline, et la voie TOR, mise en évidence par sa sensibilité à la rapamycine.

La régulation de la signalisation TOR dépend de TSC1/2 (*Tuberous sclerosis 1/2*) qui forme un complexe inhibant cette signalisation. Des mutants pour *Tsc1* et *Tsc2* montre en

effet des défauts dans la taille des cellules mais aussi leur nombre (Gao and Pan, 2001; Tapon et al., 2001). De plus, le complexe TSC1/2 peut être inhibé par AKT. L'activation de la voie insulinique permet donc la levée d'inhibition de la voie TOR (Shim et al., 2013).

Le développement du cancer de la prostate implique des événements intrinsèques aux cellules épithéliales, qui pourraient être des altérations des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR que nous pouvons reproduire en modèle drosophile. Cependant, le microenvironnement tumoral permet également d'influer sur la tumorigénèse. Pour être un modèle pertinent, la drosophile doit donc pouvoir reproduire les modifications microenvironnementales observées lors de la pathologie humaine, telles que l'altérations des matrices extracellulaires ou l'angiogénèse.

(3) Le microenvironnement tumoral

Les cellules tumorales, pour survivre, doivent maintenir un niveau en nutriments et en oxygène suffisant (Hanahan and Folkman, 1996). Chez la drosophile, le transport de nutriments ne se fait pas grâce à un système sanguin qui est ici absent, mais par l'intermédiaire de l'hémolymphe. Il s'agit d'un liquide circulatoire dont le rôle est similaire à celui du sang et du liquide interstitiel chez les vertébrés. Ce liquide est propulsé dans toute la drosophile grâce au cœur. Ainsi, le système circulatoire chez la drosophile est ouvert et permet les échanges directs avec les organes internes. Le transport de l'oxygène nécessite lui un système sophistiqué : le système trachéal, un réseau de tubules de cellules épithéliales. Ce système agit comme un senseur des niveaux d'oxygène externe et de l'activité métabolique dans les organes et permet ainsi de s'adapter aux changements environnementaux. Durant le développement, le branchement et la croissance des trachées peut être induite en réponse à l'hypoxie et à l'expression de *Fgf* (*breathless*, *btl*), dépendant de HIF1/Sima (Mortimer and Moberg, 2009; Qiao et al., 2015). C'est également le cas dans des modèles de tumorigénèse chez la drosophile, où des faibles niveaux en oxygène conduisent à une néo-trachéogénèse (Grifoni et al., 2015). La mise en place de ces trachées nécessite une modification des matrices, permise par l'expression des métalloprotéases, *Mmps*.

Chez la drosophile, deux gènes *Mmps* sont présents : *DmMmp1* et *DmMmp2* (Llano et al., 2000, 2002; Page-McCaw et al., 2003) et possèdent des fonctions distinctes. MMP1 est impliqué dans l'élongation des trachées ainsi que dans la régulation du rythme circadien (Glasheen et al., 2010; Depetris-Chauvin et al., 2014). MMP2 est requis pour la régulation de la signalisation WNT régulant les cellules souches, et dans les processus d'ovulation (Wang

and Page-McCaw, 2014; Deady et al., 2015). Ces protéines ont aussi des fonctions communes puisqu'elles régulent la croissance des motoneurones, la cicatrisation de l'épiderme, la coagulation ou encore la dégradation de la membrane basale lors de la métamorphose (Miller et al., 2007; Srivastava et al., 2007; Stevens and Page-McCaw, 2012). Il n'y a pas d'homologie évidente entre les 2 MMPs de la drosophile et celles décrites chez l'homme. Cependant, étant donné leur faible nombre chez la drosophile, il est aisé de les déléter et d'analyser leur fonction ; et ainsi de se soustraire de la redondance fonctionnelle observée chez les mammifères.

3) Modèles de cancers chez la drosophile

La conservation des mécanismes cellulaires fondamentaux entre la drosophile et les mammifères permet l'utilisation du modèle drosophile pour l'étude de différents aspects liés au développement du cancer, qu'il s'agisse de l'étude de l'acquisition de nouvelles capacités par les cellules des disques imaginaux, de l'étude du pouvoir métastatique des tumeurs générées dans cet animal ou encore de la génération de modèles de criblage pharmacologique.

Les disques imaginaux sont les structures embryonnaires capables de générer les organes adultes. Contrairement aux cellules de l'adulte qui sont quiescentes, les cellules des disques imaginaux ont une capacité proliférative intacte. Ils sont programmés, « déterminés » pour donner certaines structures. Cependant, il arrive qu'un disque ne donne pas un organe conforme à sa détermination originelle, auquel cas on parle de transdétermination (Hadorn, 1968). Ceci indique un changement du destin cellulaire sans pour autant avoir de réversion vers le stade embryonnaire (dédiﬀérenciation) (Hadorn et al., 1970). L'utilisation des disques imaginaux est donc intéressante dans l'étude du cancer où les cellules épithéliales acquièrent de nouvelles capacités pour envahir et métastaser sans présenter de dédiﬀérenciation complète.

La drosophile est également un modèle intéressant pour l'étude des capacités invasives des cellules tumorales. En effet, une des expériences de référence pour cela est la transplantation tumorale : des tumeurs primaires sont récupérées sur un premier individu puis transplantées dans l'abdomen d'une mouche adulte femelle. Quelques jours plus tard, la présence de cellules tumorales au niveau de l'abdomen mais aussi du thorax, de la tête, des pattes, des ailes, des muscles, du cerveau, de l'intestin et des ovaires, sera considérée comme une preuve des capacités migratrices des cellules (Woodhouse et al., 1998; Pagliarini and Xu, 2003). De plus, si des cellules tumorales sont trouvées au niveau des ovarioles dans l'ovaire de la femelle, cela indiquera que les cellules ont des capacités invasives. En effet, pour

coloniser les ovarioles, les cellules doivent traverser deux lames basales et donc réactiver l'expression de protéines telles que les métalloprotéases (Miles et al., 2011).

Enfin, le modèle de la drosophile peut être intéressant pour réaliser des études pharmacologiques. En effet, même si la souris est plus proche génétiquement et physiologiquement de l'humain, la drosophile est un modèle plus simple dans lequel les mécanismes de l'homéostasie cellulaire sont conservés avec un niveau de redondance génique limité. Le criblage de molécules à potentiel médical peut se faire rapidement et à moindre coût pour des maladies spécifiques à l'aide de phénotypes visibles (Gladstone and Su, 2011; Gao et al., 2014b), et peut constituer une première approche avant le passage à un modèle mammifère.

Des modèles de pathologies humaines existent déjà chez la drosophile. C'est notamment le cas pour l'étude du gliome ou encore du cancer du poumon (Read et al., 2009; Levine and Cagan, 2016). Ces deux modèles ont été établis *via* des modifications de l'activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR. Ils montrent l'apparition de néoplasies ayant des capacités invasives et dont la croissance peut être modulée par l'utilisation d'inhibiteurs des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR.

Au vu de toutes ces données, l'utilisation de la drosophile apparait comme un modèle approprié pour étudier les mécanismes moléculaires qui pourraient être responsables du développement des adénocarcinomes dont le cancer de la prostate.

Projet de recherche

La formation du cancer de la prostate suit un processus classique qui peut se résumer en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. Son évolution est la conséquence d'une succession d'altérations géniques (pertes de fragments chromosomiques, fusions de gènes ou mutations), d'activation ou d'inhibition de voies de signalisation, et d'une modification du microenvironnement (Shen and Abate-Shen, 2010). Deux voies de signalisation majeures qui sont altérées dans le cancer de la prostate sont les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR. Elles sont impliquées dans le contrôle de processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la croissance ou encore la différenciation cellulaire. Des analyses d'échantillons humains montrent que la suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR est retrouvée dans les phases tardives et majoritairement consécutive à une perte d'hétérozygotie de *PTEN*, inhibiteur de la voie (Whang et al., 1998; Ruscetti et al., 2013). Peu de mutations des effecteurs de la voie RAS/MAPK ont été décrites et celles-ci ne peuvent pas expliquer à elles seules l'activation aberrante de cette voie. Elle pourrait résulter d'une dérégulation de l'expression de facteurs de croissance (GIOELI, 2005). De plus, ces voies peuvent être co-dérégulées et semblent coopérer lors du développement du cancer de la prostate et dans les phases de résistance thérapeutique. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la co-dérégulation de ces voies lors du développement du cancer de la prostate sont mal connus. Des modèles d'études *in vitro* et *in vivo* existent mais ne permettent pas une étude optimale des dialogues moléculaires existants entre les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR.

Dans ce contexte, et afin d'étudier le rôle respectif des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR dans le tumorigenèse prostatique, nous avons développé un modèle original de tumorigenèse prostatique dans les glandes accessoires, équivalents fonctionnels de la prostate. Les glandes accessoires ont une structure similaire aux acini, unités fonctionnelles de la prostate : une couche de cellules épithéliales sécrétrices reposant sur une lame basale, avec au centre une lumière dans laquelle se déversent les sécrétions. L'utilisation de ce modèle au cours de ma thèse avait deux objectifs :

1- Déterminer si une suractivation de la voie RAS/MAPK ou PI3K/AKT/TOR peut induire un phénotype tumorigénique en utilisant le modèle drosophile.

Pour cela nous avons exprimé de manière clonale une protéine RAS constitutivement active (RAS^{V12}), pour activer la voie RAS/MAPK, ou une protéine AKT myristoylée pour activer constitutivement la voie PI3K/AKT/TOR dans les glandes accessoires.

2- Décrypter les mécanismes impliqués dans la co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR dans le cancer de la prostate.

Pour répondre à ce deuxième objectif, nous avons recherché quels acteurs étaient à l'origine de l'activation de chaque voie, et déterminé comment ils pouvaient permettre la co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR et nous avons pu mettre en avant le rôle primordial de deux facteurs de croissances dans ce contrôle : dEGF (spitz) et dIGF1 (Ilp6). Nous avons également déterminé le rôle clé d'une metalloprotéase, MMP1, dans la tumorigenèse de la glande accessoire.

Résultats

ARTICLE 1

Autocrine activation of EGFR and IR drives epithelial tumor promotion in *Drosophila* accessory gland

Amandine Rambur, Corinne Lours-Calet, Claude Beaudoin, Vincent Mirouse, Amalia Trousson, Jean-Marc Lobaccaro, Silvère Baron, Laurent Morel & Cyrille de Jossineau.

Soumis à PNAS.

Le développement du cancer de la prostate est un processus multi-étape où l'accumulation d'altérations génétiques confère aux cellules un avantage sélectif. Elles conduisent à des dérèglements au niveau de voies de signalisation impliquées dans la croissance, la prolifération ou encore dans la mort cellulaire et la réparation de l'ADN. La majorité des études se sont focalisées sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR puisque la délétion de PTEN (*Phosphatase and TENsin homlog*) est l'altération la plus fréquente dans le cancer de la prostate (Whang et al., 1998; Salmena et al., 2008). Cependant, une suractivation de la voie RAS/MAPK est fréquemment retrouvée dans les tumeurs primaires et dans presque toutes les métastases (Taylor et al., 2010), bien qu'aucune mutation activatrice ou d'altérations chromosomiques majeures ne soient décrites pour cette voie (Cho et al., 2006; Taylor et al., 2010). Une coopération entre les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR pourrait être essentielle pour la promotion et la progression de la maladie puisqu'elles sont systématiquement co-dérégulées au niveau des métastases (Kinkade et al., 2008b; Taylor et al., 2010). Cependant, peu de données sont disponibles concernant le rôle respectif de ces voies dans la tumorigenèse prostatique particulièrement dans ses phases précoces. De plus, leurs interactions au niveau moléculaire restent mal comprises.

Plus de 95% des cancers de la prostate ont une origine épithéliale. Nous avons donc développé un modèle de tumorigenèse chez la *Drosophila*, dans les glandes accessoires qui sont l'équivalent fonctionnel de la prostate (Ito et al., 2014; Wilson et al., 2017a). La drosophile est un modèle génétique puissant où plus de 70% des gènes impliqués dans des maladies humaines présentent des orthologues (Bier, 2005) et où les voies de signalisation telles que RAS/MAPK et PI3K/AKT sont conservées (Scanga et al., 2000; Shilo, 2003). De plus, nous avons choisi d'utiliser un système d'induction clonale pour induire les modifications génétiques que nous avons étudiées. Ainsi, seules de rares cellules ont été

modifiées, et sont entourées de cellules épithéliales normales. Cette technique permet de mimer au mieux l'initiation, phase où une cellule subirait une modification génétique qui conduirait le développement tumoral.

Nos résultats montrent que les deux voies de signalisations RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR sont impliquées dans le processus tumorigénique, avec un rôle plus tardif de la voie PI3K/AKT/TOR.

Autocrine activation of EGFR and InR drives epithelial tumor promotion in *Drosophila* accessory gland

Short title: EGFR/InR activation drives epithelial tumorigenesis

Authors

Amandine Rambur, Corinne Lours-Calet, Claude Beaudoin, Vincent Mirouse, Amalia Trousson, Jean-Marc Lobaccaro, Silvère Baron, Laurent Morel & Cyrille de Jossineau.

Université Clermont Auvergne, GReD, CNRS, UMR 6293, INSERM U1103, 28 place Henri Dunant, BP38, 63001 Clermont-Ferrand, France

Significance statement

Cancer progression has been linked to the alteration of many genes, resulting in the activation of crucial signaling pathways such as the RAS/MAPK or the PI3K/AKT/mTOR pathways. However, the roles of these pathways in early tumorigenesis remain unclear. Here we show that in a *in vivo* model of epithelial tumorigenesis in the *Drosophila* accessory gland, tumorigenesis can be initiated by RAS/MAPK, but not PI3K/AKT/mTOR pathway. However, tumor promotion and progression rely on both pathways that are nonetheless co-recruited. At the molecular level, this co-recruitment depends on the production of EGFR and IR ligands by the tumor cells, defining a double autocrine loop that sustains the tumorigenic process.

Abstract

Cancers of different origins share common hallmarks such as aberrant activation of signaling pathways due to multiple gene alterations. For example, analyses of human prostate cancer specimens have revealed the importance of the RAS/MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways for late stages of this disease, to sustain the tumor growth and progression. However, human and biological data lack to understand the molecular mechanisms that are implicated in earlier stages of tumorigenesis, i.e. induction and promotion. We have assessed the potential roles of the RAS/MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in early epithelial tumorigenesis *in vivo*, in the *Drosophila* accessory gland. Only RAS/MAPK pathway is able to initiate

tumorigenesis in this model. However, both RAS/MAPK and AKT/TOR pathways are activated in tumors and both are required for tumor promotion. At the molecular level, the two pathways are co-activated *via* EGFR and IR ligands production by tumor cells, depending on ERK activation. This defines a double autocrine feedback loop that sustains the tumorigenic process. Taken together, these data show that initiation and promotion probably rely on complex interplays between signaling pathways that are already implicated in later phases of tumorigenesis.

Introduction

Cancer development is a multistep process where accumulation of genetic defects gives to tumor cells a selective advantage. This goes through activation of pathways implicated for example in growth and proliferation, and inhibition of pathways implicated for example in apoptotic cell death and DNA repair. Many studies have focused on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: a most frequent defect in prostate tumor is the deletion of *PTEN*, the Phosphatase and TENsin homolog which role is to negatively regulate this pathway (Whang et al., 1998; Salmena et al., 2008) and reproducing the same genetic alteration in mouse model leads to prostate tumorigenesis (Trotman et al., 2003; Wang et al., 2003b). The RAS/MAPK pathway is also essential for cancer development due to its implication in proliferation, angiogenesis, cell survival and differentiation. In most cancers, aberrant activation of the pathway is gained *via* direct alteration of *Ras*, a major oncogene and effector of the pathway. *Ras* has been found mutated in 50% of lung cancer (Mascaux et al., 2005), 72 to 90% of pancreas cancer (Dergham et al., 1997) and is amplified in breast and esophageal cancer (Galiana et al., 1995; von Lintig et al., 2000). In prostate cancer, RAS/MAPK pathway is activated in many primary tumors and in almost all metastases (Taylor et al., 2010), even though no leading activating mutation or chromosomal alteration is described for this pathway (Cho et al., 2006; Taylor et al., 2010). When added, genetic alterations for one or another member of the pathway account for 25% of all primary tumors, as it is for the PI3K/AKT/mTOR pathway (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015). A cooperation between these two pathways could be essential for the promotion and the progression of this disease (Kinkade et al., 2008a; Taylor et al., 2010), but human and biological data are lacking to understand the respective role of each pathway especially in early phases of tumorigenesis, and how they could interact together at the molecular level.

Because more than 95% of prostate cancer are epithelial carcinoma, we have decided to assess the potential roles of RAS/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathway in early tumorigenesis, *in vivo*, in the epithelium of *Drosophila* accessory glands, the functional equivalent of prostate (Ito et al., 2014; Wilson et al., 2017b). *Drosophila* is a powerful genetic model where more than 70% of genes implicated in human diseases display orthologs (Bier, 2005), and where signaling pathways such as RAS/MAPK and PI3K/AKT/mTOR are well conserved (Scanga et al., 2000; Shilo, 2003). *Drosophila* has already proven its pertinence as cancer model for brain (Read et al., 2009; Read, 2011), lung (Levine and Cagan, 2016), and colon (Bangi et al., 2016). Our results demonstrate that both pathways participate to the tumorigenic process, with a later role for the PI3K/AKT/mTOR pathway.

Results

RAS/MAPK, but not PI3K/AKT/TOR activation, induces epithelial cell delamination.

Our strategy has been to modify the activity of the RAS/MAPK and/or the PI3K/AKT/TOR pathways in clones of accessory gland epithelial cells. In adult flies, GFP expression (control) typically produces clones of 2 cells that are of same shape and size than surrounding cells (**Fig 1A, B + Fig S1A**). Hyperactivation of PI3K/AKT/TOR pathway by either complete loss of *PTEN* tumor suppressor or expression of an active myristoylated form of AKT induces a phenotype of mild overgrowth (**Fig 1C, 1D, 1F, S1B**). Conversely, expression of an RNAi directed against PI3K or TOR induces a strong decrease in epithelial cell size (**Fig 1E + Fig S1C**). This indicates that, as in other tissues, there is a strong correlation between PI3K/AKT/TOR activation and cell growth (Zhang et al., 2000). However, in contrast with mouse models, activation of the PI3K/AKT/TOR pathway alone is not sufficient to induce epithelial tumorigenesis in the accessory gland. In prostate cancer, PTEN loss and consecutive PI3K/AKT/mTOR pathway activation is associated with other deregulations such as RAS/MAPK pathway activation. Clonal expression of an active form of RAS (GFP-RAS^{V12} expressing clones) induces various phenotypes. In the epithelium, clones can display moderate overgrowth and increase in nuclei size (**Fig 1J**). Interestingly, these clonal cells show spatial rearrangement as they become able to grow in multiple layers (**Fig 1J'**). They however keep their identity as they express normal to high levels of epithelial markers such as Fasciclin III. Clones are also able to completely leave the epithelium and to expand either outside the gland (**Fig 1G, 1H**), or, in rare cases, in the lumen of the gland (**Fig 1I**). Clones are then composed of numerous cells that can display up to 40 times their normal size (**Fig**

S1D), showing that their growth is abnormally activated. Their nuclei are largely oversized too (**Fig S1D**), indicating a probable phenomenon of endoreplication.

RAS/MAPK activation drives tumorigenesis. These giant cells remain binucleated, a feature of accessory glands epithelial cells (**Fig 2A**). However, they are mostly devoid of plasmatic membrane staining for all the epithelial markers we tested: Fasciclin III, Coracle and E-cadherin (**Fig 2B-D'**). As fasciclin III and E-Cadherin are adhesion molecules, their absence suggests that clonal cells lost physical contact with surrounding epithelial cells, a phenomenon associated with neoplastic growth in human (Fawcett and Harris, 1992) and tumor growth in drosophila (Pagliarini and Xu, 2003). This also suggests that RAS^{V12} expressing cells are able to undergo epithelium to mesenchyme transition (EMT), which is considered as a key tumorigenic event in the prostate (Nauseef and Henry, 2011). More, P-SRC, a marker associated with cell migration (Baumgartner et al., 2008), is present at the membrane of these cells that can be regarded as tumor cells (**Fig 2E**). In our model, we also detect overgrown ectopic trachea using two different antibodies directed against Gasp and MMP1 (**Fig 2F-G'**). Gasp, which is implicated in the opening of tracheas during their growth (Tiklová et al., 2013), is strongly expressed in low diameter tracheas at the surface of tumors (arrow in **Fig 2F'**), but at weaker level in the bigger tracheas (**Fig 2F**). This shows that these ectopic tracheas are almost entirely mature, i.e. functional, but also still growing, a phenomenon that doesn't normally occur in adult flies. MMP1 is also detected at high levels in tracheas (**Fig S2A-A'**), as in embryo and larva in which it is involved in tracheal development (Page-McCaw et al., 2003; Glasheen et al., 2010). In our model, MMP1 staining furthermore reveals that an arborescence of tracheas grows inside the tumors from the tracheas that are normally situated at the surface of the accessory glands (**arrow in Fig 2G-G'**). This shows that not only tracheas are growing actively, but also in tight coordination with tumors, revealing a phenomenon of neo-tracheogenesis. In drosophila, tracheal system provides oxygen to tissues, and growth of this system relies on hypoxic activation by Drosophila HIF homolog sima (Centanin et al., 2008). Therefore, oncogenic expression have been associated to traces of neo-tracheogenesis in this model, which have led to the conclusion that neo-tracheogenesis is the counterpart of neo-angiogenesis in cancer (Grifoni et al., 2015). Together, our results demonstrate that overactivation of RAS/MAPK signaling pathway in clones of accessory gland epithelial cells induces a robust phenomenon of tumorigenesis.

PI3K/AKT/TOR pathway participates to cell delamination and tumor formation. In RAS^{V12} clones, cell hypertrophy and nuclear expansion are reminiscent of PI3K/AKT/TOR

pathway activation. As expected, RAS^{V12} tumors display phosphorylation of RAS target dERK (Rolled). They also display TOR target 4E-BP hyperphosphorylation (**Fig 3A-B**), showing that both RAS/MAPK and PI3K/AKT/TOR signaling pathways are overactivated in the clonal cells. At the molecular level, ERK is a member of the canonical RAS/MAPK pathway. Co-expression of ERK RNAi in the Ras^{V12} expressing cells induces a significant decrease of invasive tumor frequency (*i.e.* clones that left the epithelium to form external masses) (**Fig 3C**), showing that the canonical RAS/MAPK pathway is implicated in the formation of tumor. In the same way, co-expression of TOR RNAi in the Ras^{V12} expressing cells significantly decreases invasive tumor frequency (**Fig 3D**), showing that the PI3K/AKT/TOR pathway is also implicated in the formation of tumor. The same results are obtained when targeting PI3K (**Fig 3E**), confirming with a second member of the PI3K/AKT/TOR pathway its role in accessory gland tumorigenesis. Furthermore, myr-AKT expressing clones display 4E-BP (**Fig 3F-F'**), but not dERK phosphorylation (**Fig 3G-G'**), showing that a failure to recruit both pathways associates with lack of tumorigenesis in the accessory gland. From our data, we conclude that Ras^{V12} induced tumorigenesis relies on primary activation of the canonical RAS/MAPK pathway but also on secondary activation of PI3K/AKT/TOR pathway.

Tumor formation relies on a double autocrine activation loop to recruit the two pathways. Contrary to mammals, there is no evidence of cross-activation of the PI3K/AKT/TOR and the RAS/MAPK pathways in drosophila, so activation of these pathways mostly relies on growth factors. Interestingly, RAS^{V12} clones overexpress Spitz (Spi, or dEGF), an EGF/TGF α homolog and ligand of Drosophila EGFR (Rutledge et al., 1992)(**Fig 4A**). Strikingly, suppression of Spitz by RNAi expression in RAS^{V12} clones reduces tumor formation (**Fig 4B**), showing that expression of this ligand sustains RAS^{V12}-driven tumorigenesis in the accessory gland. Moreover, if clonal overexpression of a secreted form of Spitz (Spitz_{sc}) in epithelial cells (Duchek and Rørth, 2001) mostly induces a high rate of mortality during pupal stage, the remaining adult flies can display tumors exhibiting the same hallmarks of cell overgrowth and loss of epithelial markers as in RAS^{V12} induced tumors (**Fig 4C**). These results are in agreement with an EGFR-dependent autocrine feedback loop. EGFR is a major effector in prostate cancer and is targeted by multiple therapeutic approaches (Barton et al., 2001). EGFR is upstream of both RAS/MAPK and PI3K/AKT/TOR pathways in mammals (Jorissen et al., 2003), but could be more specific to RAS/MAPK pathway in drosophila (Brown et al., 2007). Co-expression of an EGFR RNAi in RAS^{V12} clones decreases tumor formation (**fig 4F**), but epithelial clones can be composed of many cells,

suggesting that cell division is less affected than cell migration in this context. Hyperphosphorylation of dERK (**Fig 4D-D'**) is still detected, showing that RAS^{V12} still displays overactivation of the RAS/MAPK cascade in the RAS^{V12}/EGFR RNAi cells. On the contrary, P-E4-BP staining is never detected in these clones, and cells stay smaller than in RAS^{V12} expressing cells (**Fig 4E-E'**), showing a lack of recruitment of the PI3K/AKT/TOR pathway in these clones. To further study the role of EGFR signaling in accessory gland tumorigenesis, a constitutively active form of EGFR, EGFR λ , is expressed. It leads to the formation of tumors that display the same hallmarks as in RAS^{V12} induced tumors (**Fig 4G**). Furthermore, we observe that PI3K/AKT/TOR pathway recruitment, as for RAS^{V12} expression, occurs only in external cell masses (**Fig 4H**). This suggests that PI3K/AKT/TOR pathway is not recruited directly by EGFR, but *via* a molecular intermediate. In *Drosophila*, PI3K/AKT pathway is mainly recruited by Insulin Receptor (Brogiolo et al., 2001). Interestingly, co-expression of RAS^{V12} with a dominant negative form of InR (InR DN) decreases invasive tumor frequency (**Fig 4I**). Seven ligands are known to activate InR. RAS^{V12} clonal expression in the accessory gland induces overexpression of one ligand, Ilp6, also known as IGF1-like (**Fig 4J and data not shown**). This ligand is implicated in accessory gland tumorigenesis, as co-expression of Ilp6 RNAi in RAS^{V12} clones decreases invasive tumor frequency (**Fig 4L**), defining a second autocrine loop to promote accessory gland tumorigenesis. Finally, overexpression of Ilp6 mRNA is detected in accessory glands that clonally express RAS^{V12} or EGFR λ but neither in glands co-expressing ERK RNAi with RAS^{V12} or RAS RNAi with EGFR λ (**Fig 4J-4K**). This shows that Ilp6 mRNA overexpression depends on the activation of the classical EGFR/RAS/MAPK pathway.

Collectively, our data show that accessory gland tumorigenesis relies on a double autocrine loop, the first one depending on Spitz and its receptor EGFR to amplify RAS/MAPK pathway activation, the second one depending on RAS/MAPK dependent production of Ilp6 that can recruit the PI3K/AKT/TOR pathway via InR activation (**Fig 5**).

Discussion

As more than 95% of prostate cancers are of epithelial origin and are thought to mainly arise from a single cell (Humphrey, 2012), our particular strategy has been to introduce a single genetic alteration in few clones of randomly selected, mostly differentiated, cells. This faithfully reproduces what is thought to happen in the early stages of tumor formation in

patients, and our data support the view that *Drosophila* accessory gland represents a simple, potent, new model of prostate tumorigenesis, that could also be used for other epithelia as presence of tumors was detected in other organs (**Fig S3**).

While aberrant activations of RAS/MAPK and PI3K/ATK/TOR signaling pathways are associated to promotion and progression of cancer such as prostate adenocarcinoma, their implication in the early steps of the disease and how they interact are not fully understood. Our results demonstrate that both pathways are implicated in epithelial cell delamination and tumor formation in the *Drosophila* accessory gland. Due to limited crosstalk between the two pathways in *drosophila*, we can show that isolated deregulation of PI3K/AKT/TOR signaling is not sufficient to induce tumorigenesis, but participates to this phenomenon as it is secondarily activated by EGFR/RAS/MAPK pathway. This later role correlates with human data where PI3K/AKT/mTOR pathway is more altered in CRPC (castration resistant prostate cancer) than in local adenocarcinoma (Robinson et al., 2015) and is associated with prostate cancer progression (Kinkade et al., 2008a; Cancer Genome Atlas Research Network, 2015). In the accessory gland, we also show that tumorigenesis relies on the autocrine activation of EGFR and InR that are upstream of the two pathways. This demonstrates in a physiological model the importance of autocrine loops in tumorigenesis, a phenomenon that has been proposal for the autocrine EGF regulation loop in prostate (Wilding et al., 1989; Tillotson and Rose, 1991). It also indicates that RAS/MAPK - but not PI3K/AKT/mTOR - pathway activation, could be the initiator of these loops. If studies describing earlier activation of RAS/MAPK in human prostate cancer samples (Malik et al., 2002; Kreisberg et al., 2004b) are coherent with this assertion, more analyses have to be done to confirm it as, in mouse model, it is largely assumed that overactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway is the main driver of prostate tumorigenesis (Trotman et al., 2003; Wang et al., 2003b). Finally, our results convincingly demonstrate that existence of functional autocrine loops also explain how the step of initiation, where a single genetic event is thought to occur (Abate-Shen and Shen, 2000), can lead to tumorigenesis: the activation of multiple pathways in the absence of multiple genetic alterations can be gained by these autocrine loops to start the tumorigenic process, that will in later stages be sustained by more alterations accumulating in the genes of the signaling pathways.

Materials and methods

Fly stocks and experimental crosses

y,w,HS:flp122/+;Act:FRTstopFRTGal4,UAS:GFP/CyO flies from V. Mirouse lab allowed conditional clonal expression of GFP. When combined to UAS:Ras^{V12} flies (4847) or UAS:EGFR λ top (59843), they allowed conditional clonal co-expression of GFP and Ras^{V12} (GFP-Ras^{V12} flies) or EGFR λ top (GFP-EGFR λ flies). GFP-Ras^{V12} and GFP-EGFR λ flies were then crossed with following stocks to realize experiments: UAS:nlsGFP (4775), UAS:RNAiTOR (35578), UAS:RNAiSpi (34645), UAS:RNAiPI3K (61182), UAS:MyrTomato (32221), UAS:RolledRNAi (34855), UAS:EGFR λ top (59843), UAS:RNAiRas (106642) UAS:InRK1409A DN (8252), UAS:Ilp6RNAi (33684), UAS:s-Spi (58436) (Bloomington Drosophila Stock Center) and UAS:RNAiEGFR (43267) (Vienna Drosophila Resource Center). y,w,HS:flp122/+;Act:FRTstopFRTGal4,UAS:GFP/CyO;UAS-myr-AKT/TM3Sb were also used to induce AKT/TOR pathway activation (GFP-MyrAkt flies). Other stocks used: HS:flp122/+;FRT40A,PTENC494/FRT40A,Ubi:nlsRFP.

Conditional expression induction

Briefly, condition of use of the flippase (flp)/FRT system was determined to produce an average of 4-6 clones per accessory gland ($\approx 1\%$ of total number of epithelial cells). Flippase-dependent recombination was induced during pupal stage by 12 minutes (for GFP-Ras^{V12} and GFP-EGFR λ flies) or 20 minutes (for GFP-MyrAkt flies) heat-shock at 37°C. Flies were then kept at 25°C until the end of pupal stage. Males were collected at emergence from pupae 3 to 3,5 days after heat shock and kept for another 3 days at 25°C before dissection.

Immunohistochemistry and imaging

Accessory glands were dissected in 1X PBS or 1X PBS containing phosphatase (Orthovanadate 1mM, β -glycerophosphate 20mM and NaF 1mM) for the detection of phosphorylated proteins. They were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde, washed once with 1X PBS and three times with 1X PBS containing 0,2% Triton (PBS-T) for permeabilisation. The samples were blocked for 10 min with 0,5% of bovine serum albumin in PBS-T and incubated overnight at 4°C in primary antibodies diluted in the same blocking solution. The tissues were then washed twice for 5 min with PBS-T and incubated for 1h at room temperature in secondary antibody diluted 1:1000 in blocking solution. Added with secondary antibodies, DAPI (Di AminidoPhenylIndol, Life Technology) 1:1000 was used to stain DNA and Alexa568-phalloidin (A12380, Life Technology) or Alexa633-phalloidin (A22284, Life Technology) 1:10000 were used to reveal F-actin. Following two washes in PBS-T, the samples were then mounted in Vectashield (H-1000, Vector Laboratories) and

visualized using a Leica SP5 or SP8 confocal microscope. Image stacks were processed in ImageJ or Imaris software.

We used the following antibodies: Mouse Coracle (1:300, #C566.9 DHSB), mouse Fasciclin III (1:400, #7610 DHSB), mouse E-Cadherin (1:1000, #DCAD2 DHSB), rabbit P-4E-BP1 (1:200, 2855S Cell Signaling), rabbit P-ERK (1:500, 4370S Cell Signaling), goat GFP (1:1000, #5450 Abcam), mouse GASP (1/5, 2A12 DHSB), mouse MMP1 (1/100, 14A3D2 DHSB ; 1:10 #3A6B4 #3B8D12 #5H7B11 DHSB), rat Spitz (1:100, DHSB), rabbit P-Src (1:500, #44-660G Invitrogen), secondary antibodies coupled to different fluorophores 488 (1:1000, Life Technology), Cy5 or Cy3 (1:1000, Jackson Immunology).

RNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR (Real-time Quantitative PCR)

RNA were isolated from accessory glands dissection, by Trizol-extracted total accessory glands (Invitrogen). Reverse transcription was performed by using SuperScript IV Reverse Transcriptase kit (ThermoFisher Scientific). Quantitative PCR was performed using on the LC480. *rpl32* was used for the normalization.

Primers for qRT-PCR analysis were:

Dilp6 (Okamoto et al., 2009):

Forward: 5'-TGCTAGTCCTGGCCACCTTGTTTCG-3'

Reverse: 5'-GGAAATACATCGCCAAGGGCCACC-3'

Rpl32 (Stephano et al., 2018):

Forward: 5'-TTGGCTTCGGTTTCCGGCAAG-3'

Reverse: 5'-ATCGATCCGACTGGTGGCGGAT3'

Cells and nuclei size

Nuclei and nucleus volume were determined from 3D reconstruction with Imaris software. Cells area was determined with direct measure of contour cells in Image J Software.

Invasive tumor frequency

During dissection, direct observation under binocular microscope allowed to visualize the presence of tumors at the surface of the accessory glands. Tumor frequency was determined as the percentage of flies that displayed at least one tumor on their accessory glands. Following preliminary tests, it is important to note that we designed the experiments to obtain a similar number of UAS in all the flies we tested to avoid Gal4 titration effect.

Statistical analyses

All experiments were done a minimum of four times (n, biological replicates) on numerous glands (technical replicates). Statistical analyses (n = 4) were performed using Graph Pad Prism 6 or R software. Data are shown as means $\pm$ SEM. P-values were obtained from Mann Whitney's test for comparison of cells, mRNA levels or nuclei sizes and from Chi² test for invasive tumor frequency.

Acknowledgements

We thank N Anglaret, L Babkina, H Gauchez, E Gomez, A de Haze, S de Joussineau, F Pellissier and J-P Saru for technical help; N Goué for statistics; P Pouchin and C Vachias for imaging; ICCF and Fly facility platforms for imaging and fly care; DHSB, BDSC and VDRC for providing antibodies and fly stocks; *Drosophila* GReD teams members for sharing their lab; Irina Mangin and J-L Couderc for scientific help. This work was supported by CNRS, INSERM, Université Clermont Auvergne, GReD and Région Auvergne (Cancer Auvergne Prostate).

Figures:

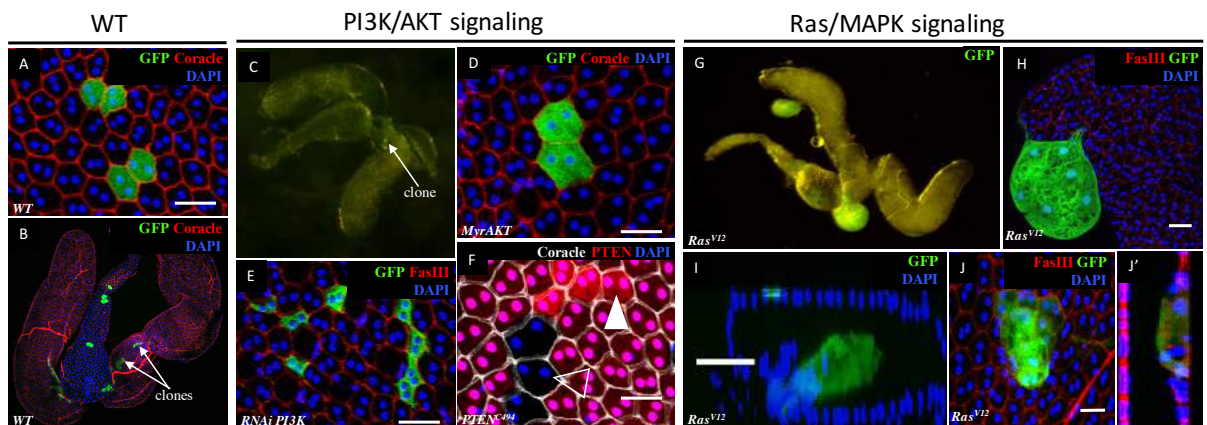


Figure 1 : Ras/MAPK pathway but not PI3K/AKT pathways induces tumor formation in accessory glands

(A to B) *GFP* expressing clones show no phenotype of overgrowth, as quantified in FigS1A.

(C to D) *GFP*, *Myristoylated-Akt* expressing clones

(E) *GFP*, *RNAi PI3K* expressing clones

(F) Generation of *PTEN*^{+/+} cells (white arrow, high expression of nlsRFP) and *PTEN*^{-/-} cells (empty arrow, no nlsRFP) in *PTEN*^{+/+} accessory gland.

(G to J) *GFP-Ras*^{V12} expressing clones display various phenotypes reminiscent of tumorigenesis

(I) Transversal optical section of an accessory gland with an intra-limbal clone, scale bar: 50 μ m

(J') Transversal optical section reveals epithelium thickening at the level of the clone in imaged (J).

Scale bar : 30 μ m

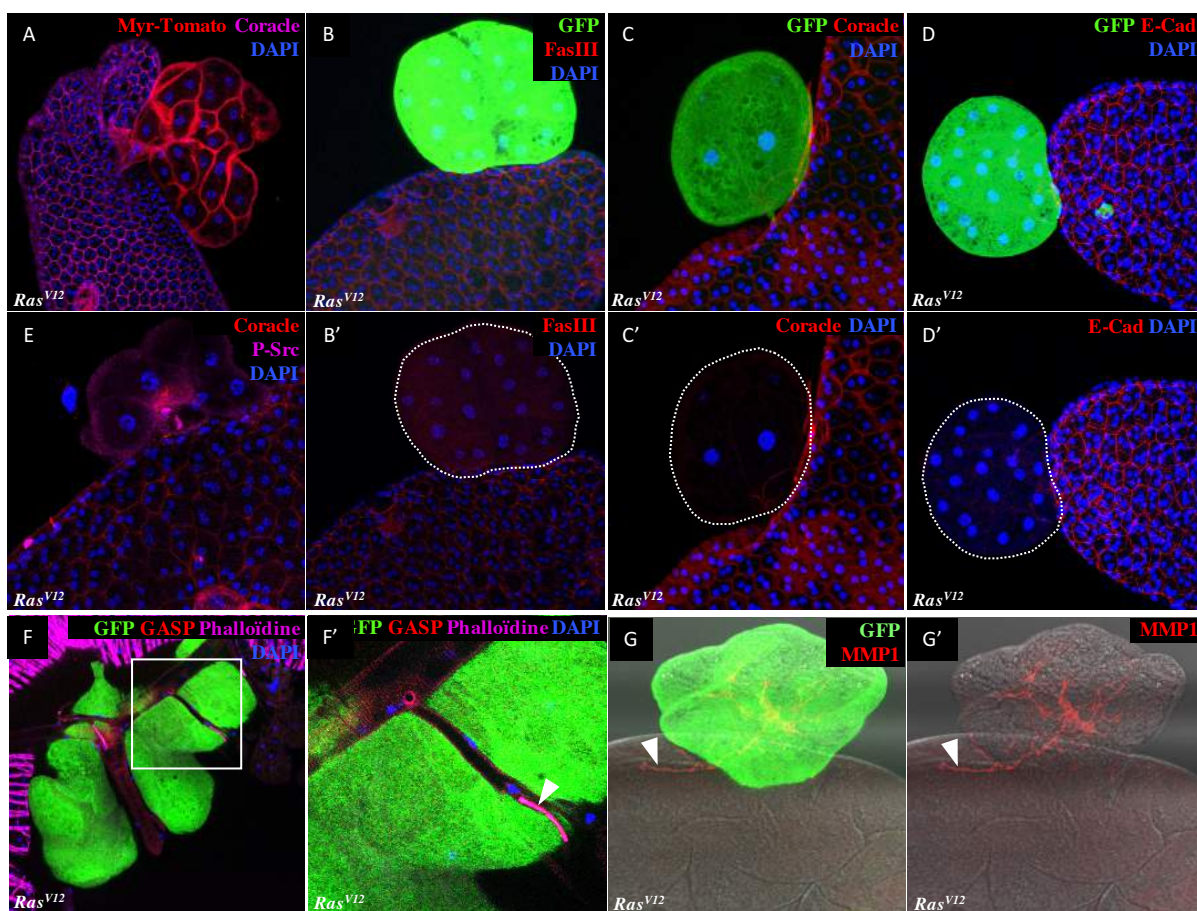


Figure 2 : Tumors induced by Ras^{V12} recapitulate hallmarks of cancer

$GFP-Ras^{V12}$ expressing clones display hallmarks of cancer.

(A) Visualisation of the tumor cell membranes with myr-tomato.

(B to D') Epithelial markers

(E) Mesenchymal markers

(F to G') Tracheogenesis induced by Ras^{V12} expression

(F) Gasp staining reveals trachea network associated with tumors. (F') Zoom of the boxed section in (F) ; note the strong deposition along the low diameter trachea (white arrowhead).

(G to G') MMP1 staining reveals an arborescence of trachea into the tumor and from accessory gland tissue (white arrowhead).

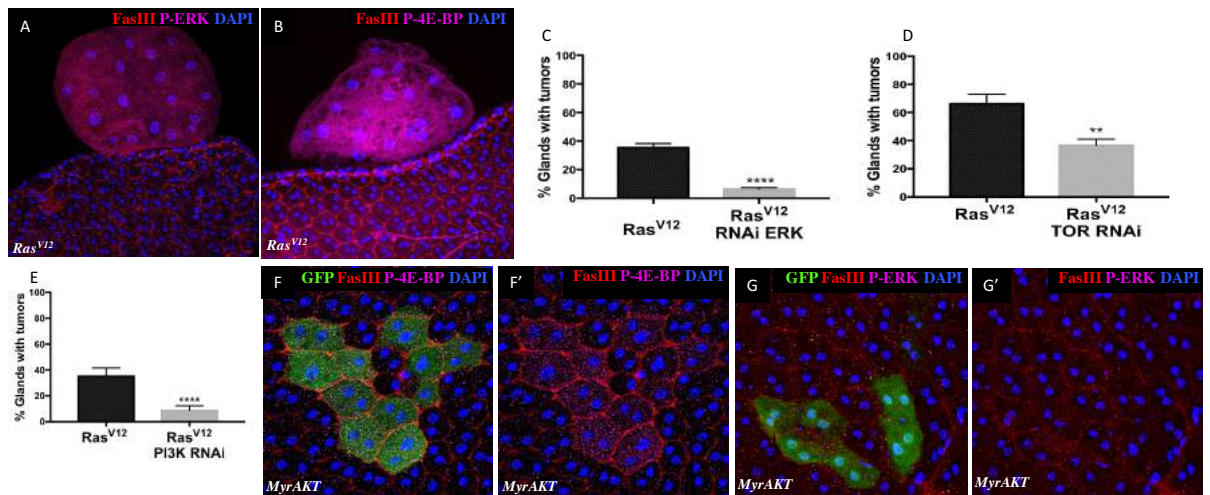


Figure 3 : Ras/MAPK and PI3K/AKT pathways are both essential in tumorigenesis induced by Ras/MAPK pathway activation

(A to B) *GFP-Ras^{V12}* expressing clones display strong phosphorylation of ERK and 4E-BP.

(C to E) Invasive tumor frequency of *Ras^{V12}*, *RNAi ERK* (C); *Ras^{V12} RNAi TOR* (D); *Ras^{V12} RNAi PI3K* (E); compared to *Ras^{V12}* alone. (** < 0,01 ; **** P < 0,0001).

(F to G') *GFP-MyrAkt* expressing clones display phosphorylation of 4E-BP (F') but not ERK (G')

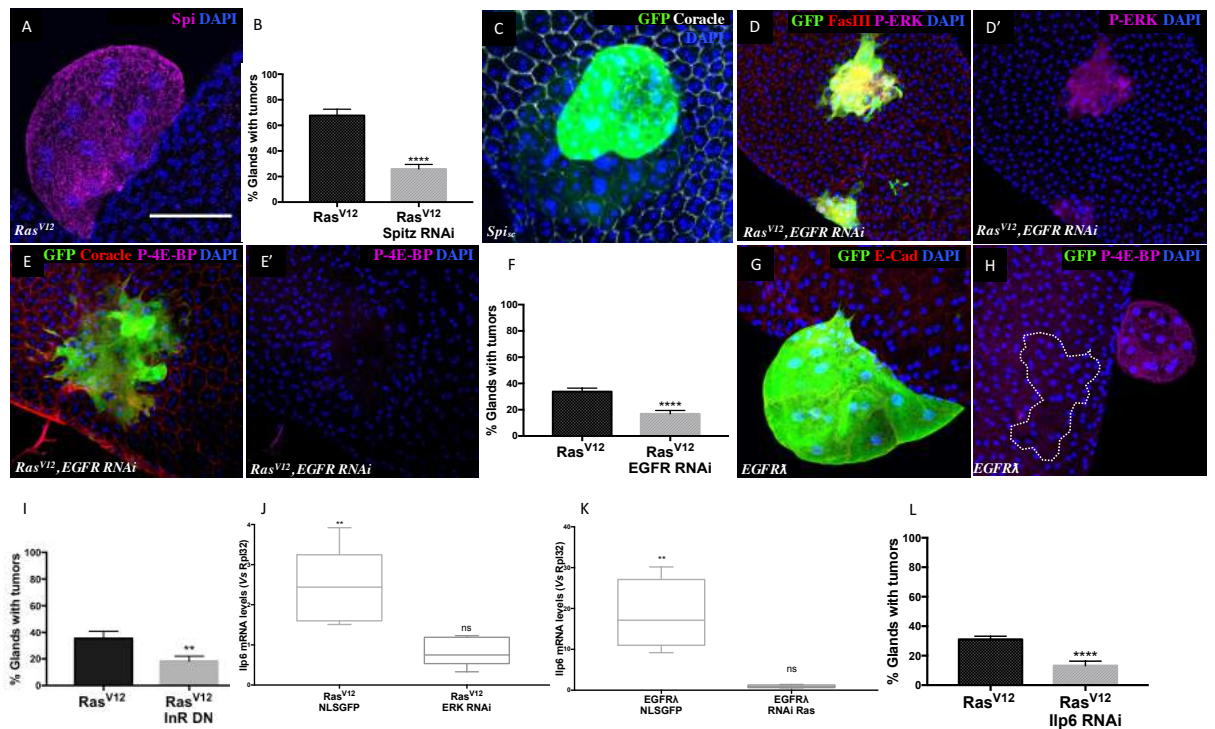


Figure 4 : Ras/MAPK and PI3K/AKT pathways are co-activated via EGFR and IR ligands production by tumor cells, depending on ERK activation

(A) Spitz is expressed in *GFP-Ras^{V12}* expressing clones.

(B) Invasive tumor frequency of *GFP-Ras^{V12}*, *RNAi Spitz* compared to *Ras^{V12} nlsGFP* expressing clones

(C) *Spi_{sc}* expression induced tumors formation

(D to E') *Ras^{V12} RNAi EGFR* expressing clones display phosphorylated ERK (D') but no 4E-BP (E')

(F) Invasive tumor frequency of *GFP-Ras^{V12}*, *RNAi EGFR* compared to *Ras^{V12} nlsGFP* expressing clones

(G to H) *GFP-EGFR Δ* expressing clones display phosphorylated 4E-BP in external cell mass only (H)

(I) Invasive tumor frequency of *GFP-Ras^{V12}*, *InR DN* compared to *Ras^{V12} nlsGFP* expressing clones

(J) mRNA levels of *Ilp6* in *Ras^{V12} NLSGFP* and *Ras^{V12} ERK RNAi* expressing accessory glands, compare to *nlsGFP* controls.

(K) mRNA levels of *Ilp6* in *EGFR Δ NLSGFP* and *EGFR Δ Ras RNAi* expressing accessory glands, compare to *nlsGFP* controls.

(L) Invasive tumor frequency of *GFP-Ras^{V12}*, *Ilp6 RNAi* compared to *Ras^{V12} nlsGFP* expressing clones.

** P<0,01 ; **** P<0,0001

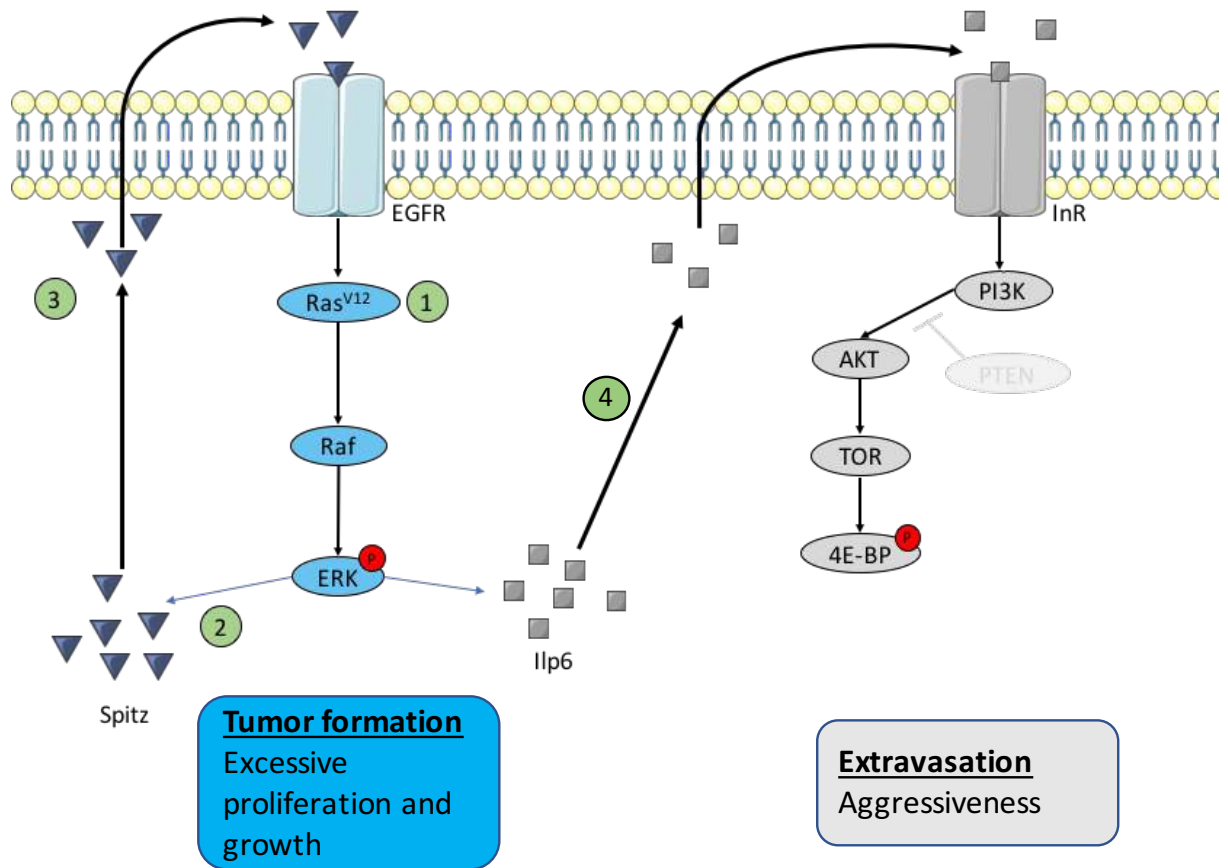


Figure 5 : Hypothetic model of Ras/MAPK and PI3K/AKT pathway crosstalks

The accessory gland tumorigenesis relies on a double autocrine loop, the first one depending on Spitz and its receptor EGFR to amplify Ras/MAPK pathway activation (1-3), the second one depending on Ras/MAPK dependent production of Ilp6 that can recruit the PI3K/AKT/TOR pathway via InR activation (4).

Supplemental data:

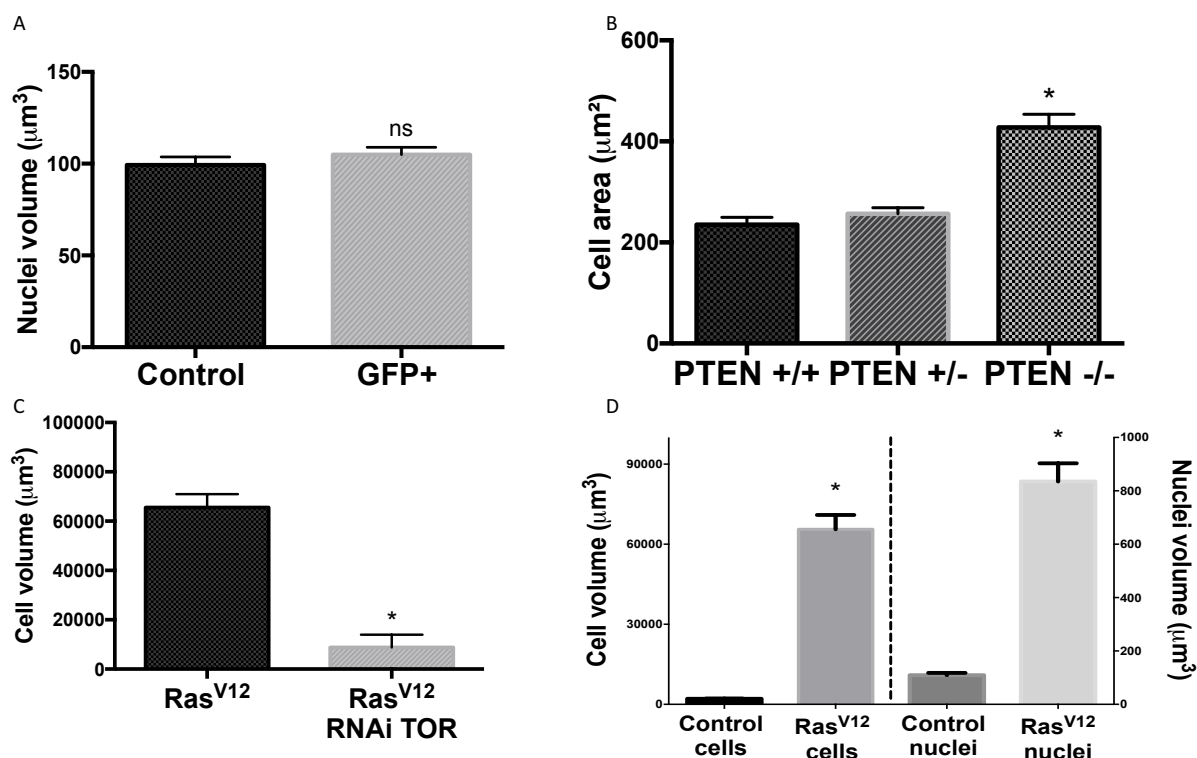


Figure S1 : Ras/MAPK and PI3K/AKT pathways modulations induced variations in cells and size

(A) *GFP* expressing clones show no phenotype of overgrowth, ns : non significant

(B) Area of *PTEN*+/+, *PTEN*+/- and *PTEN*-/- cells (* $P < 0.0001$)

(C) Cell volumes of *GFP-Ras*^{V12}, *RNAiTOR* and *GFP-Ras*^{V12}, *nlsGFP* expressing clones (* P -value $< 0,05$).

(D) Comparison of cell and nuclei volumes of *GFP-Ras*^{V12} and *GFP* expressing clones (* $P < 0,0001$)

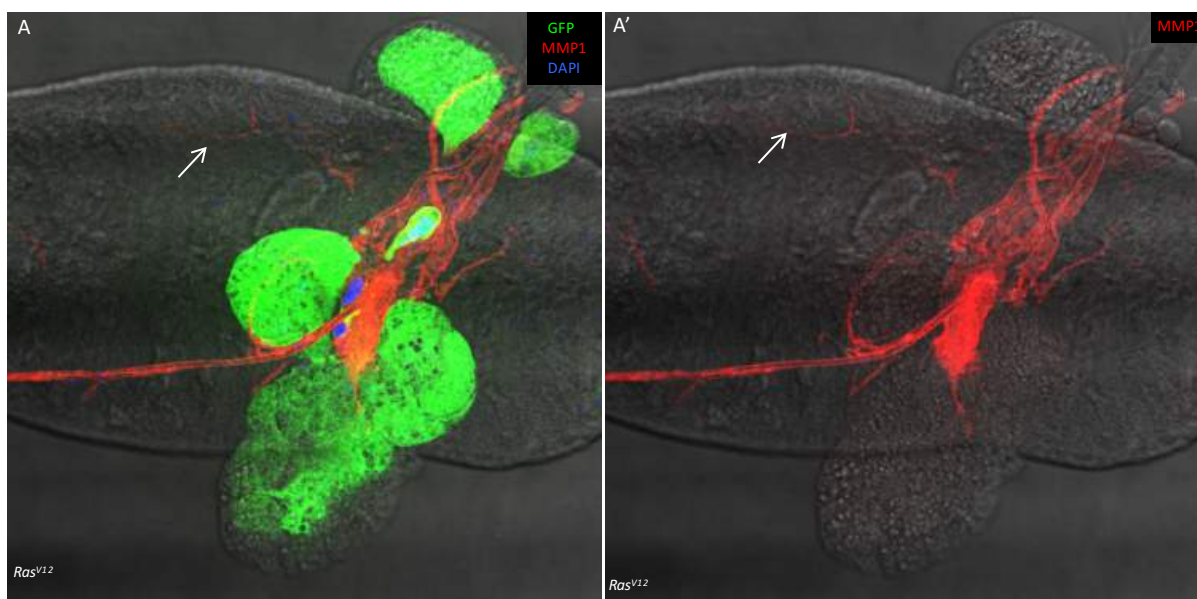


Figure S2 : Overgrown tracheas express high levels of MMP1 and connect to tumours.

(A and A') Pseudo-Bright field shows the gland.

(A) GFP indicates *Ras^{V12}* expressing-cells. MMP1 is not expressed in tumours but reveals the tracheas. Example of a normal sized trachea at the surface of the gland is indicated by a white arrow.

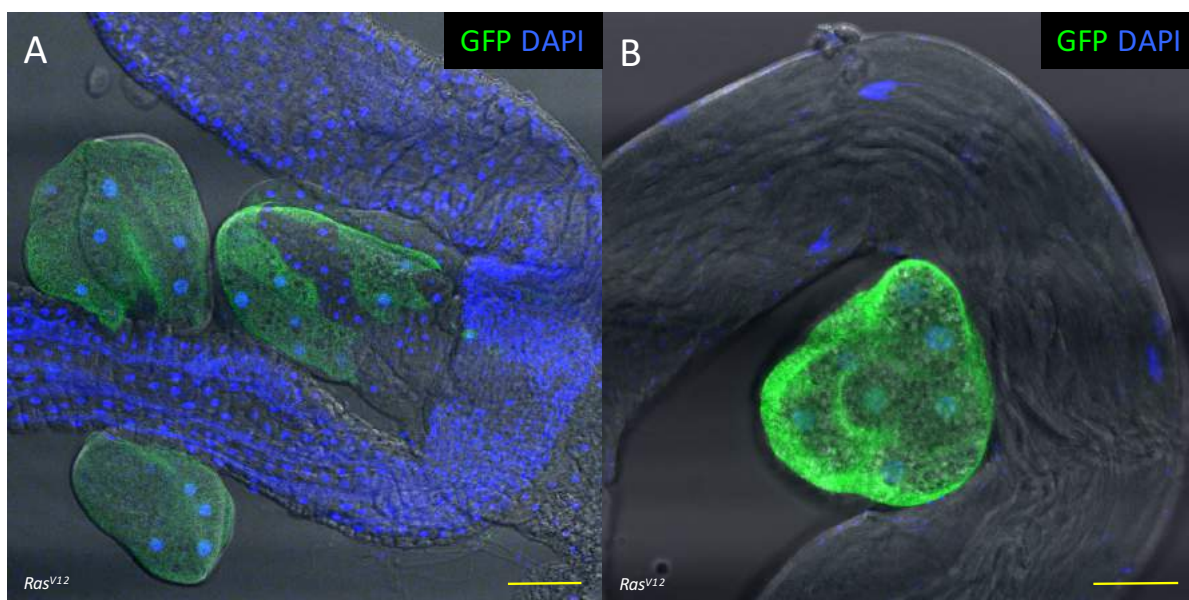


Figure S3 : RasV12 expression induces tumour growth in other tissues.

A and B) Pseudo-Bright field shows the tissue. GFP indicates *RasV12* expressing-cells. A) tumours at the surface of the gut. B) Tumour at the surface of the testis. Scale bars : 50 mM.

References

- Abate-Shen C, Shen MM. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14:2410–34.
- Bangi E, Murgia C, Teague AGS, Sansom OJ, Cagan RL. 2016. Functional exploration of colorectal cancer genomes using *Drosophila*. *Nat Commun* 7:13615.
- Barton J, Blackledge G, Wakeling A. 2001. Growth factors and their receptors: new targets for prostate cancer therapy. *Urology* 58:114–122.
- Baumgartner M, Radziwill G, Lorger M, Weiss A, Moelling K. 2008. c-Src-mediated epithelial cell migration and invasion regulated by PDZ binding site. *Mol Cell Biol* 28:642–55.
- Bier E. 2005. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9–23.
- Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. 2001. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11:213–21.
- Brown KE, Kerr M, Freeman M. 2007. The EGFR ligands Spitz and Keren act cooperatively in the *Drosophila* eye. *Dev Biol* 307:105–113.
- Cancer Genome Atlas Research Network A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, Annala M, Aprikian A, Armenia J, Arora A, Auman JT, Balasundaram M, et al. 2015. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 163:1011–25.
- Cancer Genome Atlas Research Network TCGAR. 2015. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 163:1011–25.
- Centanin L, Dekanty A, Romero N, Irisarri M, Gorr TA, Wappner P. 2008. Cell autonomy of HIF effects in *Drosophila*: tracheal cells sense hypoxia and induce terminal branch sprouting. *Dev Cell* 14:547–58.
- Cho N-Y, Choi M, Kim B-H, Cho Y-M, Moon KC, Kang GH. 2006. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 119:1858–1862.
- Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, Crissman JD, Sarkar FH. 1997. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 21:127–43.
- Duchek P, Rørth P. 2001. Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. *Science* 291:131–3.
- Fawcett J, Harris AL. 1992. Cell adhesion molecules and cancer. *Curr Opin Oncol* 4:142–8.
- Galiana C, Lozano JC, Bancel B, Nakazawa H, Yamasaki H. 1995. High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus. *Mol Carcinog* 14:286–93.
- Glasheen BM, Robbins RM, Piette C, Beitel GJ, Page-McCaw A. 2010. A matrix metalloproteinase mediates airway remodeling in *Drosophila*. *Dev Biol* 344:772–783.
- Grifoni D, Sollazzo M, Fontana E, Frolidi F, Pession A. 2015. Multiple strategies of oxygen supply in *Drosophila* malignancies identify tracheogenesis as a novel cancer hallmark. *Sci Rep* 5:9061.
- Humphrey PA. 2012. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology* 60:59–74.

- Ito S, Ueda T, Ueno A, Nakagawa H, Taniguchi H, Kayukawa N, Miki T. 2014. A genetic screen in *Drosophila* for regulators of human prostate cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun* 451:548–555.
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP., Ward CW, Burgess AW. 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284:31–53.
- Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, Yan J, Foster TH, Gao H, Sun Y, Ouyang X, Gerald WL, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. 2008. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 118:3051–64.
- Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, Ghosh PM. 2004. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 64:5232–6.
- Levine BD, Cagan RL. 2016. *Drosophila* Lung Cancer Models Identify Trametinib plus Statin as Candidate Therapeutic. *Cell Rep* 14:1477–1487.
- Lintig FC von, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. 2000. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62:51–62.
- Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JI. 2002. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8:1168–71.
- Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert A-P, Noel S, Lafitte J-J, Sculier J-P. 2005. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 92:131–139.
- Nauseef JT, Henry MD. 2011. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nat Rev Urol* 8:428–439.
- Okamoto N, Yamanaka N, Yagi Y, Nishida Y, Kataoka H, O'Connor MB, Mizoguchi A. 2009. A Fat Body-Derived IGF-like Peptide Regulates Postfeeding Growth in *Drosophila*. *Dev Cell* 17:885–891.
- Page-McCaw A, Serano J, Santé JM, Rubin GM. 2003. *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev Cell* 4:95–106.
- Pagliarini RA, Xu T. 2003. A Genetic Screen in *Drosophila* for Metastatic Behavior. *Science* (80-) 302:1227–1231.
- Read RD. 2011. *Drosophila melanogaster* as a model system for human brain cancers. *Glia* 59:1364–76.
- Read RD, Cavenee WK, Furnari FB, Thomas JB. 2009. A *Drosophila* Model for EGFR-Ras and PI3K-Dependent Human Glioma. *PLoS Genet* 5:e1000374.
- Robinson D, Allen EM Van, Wu Y-M, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera J-M, Montgomery B, Taplin M-E, Pritchard CC, Attard G, Beltran H, Abida W, et al. 2015. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell* 162:454.
- Rutledge BJ, Zhang K, Bier E, Jan YN, Perrimon N. 1992. The *Drosophila* spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev* 6:1503–17.
- Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. 2008. Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell*

133:403–414.

Scanga SE, Ruel L, Binari RC, Snow B, Stambolic V, Bouchard D, Peters M, Calvieri B, Mak TW, Woodgett JR, Manoukian AS. 2000. The conserved PI3'K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*. *Oncogene* 19:3971–3977.

Shilo BZ. 2003. Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res* 284:140–9.

Stephano F, Nolte S, Hoffmann J, El-Kholy S, Frieling J von, Bruchhaus I, Fink C, Roeder T. 2018. Impaired Wnt signaling in dopamine containing neurons is associated with pathogenesis in a rotenone triggered *Drosophila* Parkinson's disease model. *Sci Rep* 8:2372.

Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, et al. 2010. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell* 18:11–22.

Tiklová K, Tsarouhas V, Samakovlis C. 2013. Control of Airway Tube Diameter and Integrity by Secreted Chitin-Binding Proteins in *Drosophila*. *PLoS One* 8:e67415.

Tillotson JK, Rose DP. 1991. Endogenous secretion of epidermal growth factor peptides stimulates growth of DU145 prostate cancer cells. *Cancer Lett* 60:109–12.

Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Cristofano A Di, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Dyke T Van, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. 2003. Pten Dose Dictates Cancer Progression in the Prostate. *PLoS Biol* 1:e59.

Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, Thomas G V., Li G, Roy-Burman P, Nelson PS, Liu X, Wu H. 2003. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4:209–221.

Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, Said JW, Isaacs WB, Sawyers CL. 1998. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5246–50.

Wilding G, Valverius E, Knabbe C, Gelmann EP. 1989. Role of transforming growth factor - α in human prostate cancer cell growth. *Prostate* 15:1–12.

Wilson C, Leiblich A, Goberdhan DCI, Hamdy F. 2017. The *Drosophila* Accessory Gland as a Model for Prostate Cancer and Other Pathologies. *Current Topics in Developmental Biology*, p 339–375.

Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. 2000. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 14:2712–24.

ARTICLE 2

Tumor extravasation in *Drosophila* accessory glands relies on ERK-dependent, temporary expression of MMP1.

Amandine Rambur, Corinne Lours-Calet, Claude Beaudoin, Vincent Mirouse, Amalia Trousson, Jean-Marc Lobaccaro, Silvère Baron, Laurent Morel & Cyrille de Jossineau.

En préparation.

Les métalloprotéases (MMPs) représentent une famille de plus de 20 endopeptidases chez les mammifères (Abbenante and Fairlie, 2005). Elles sont impliquées dans différents processus cellulaires tels que le catabolisme ou la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (ECM), et jouent un rôle essentiel dans les pathologies cancéreuses. Dans le cas de la prostate ; une surexpression des MMPs est corrélée avec l'agressivité de la tumeur (Gong et al., 2014a). Leur étude chez la souris est complexe car il existe de nombreuses redondances fonctionnelles entre les MMPs qui peuvent conduire à des comportements paradoxaux au cours du développement tumoral. Ainsi, la perte de *mmp2* chez la souris induit une diminution des métastases pulmonaires tandis que les animaux porteurs d'une délétion *mmp9* présentent une augmentation du nombre de foyers invasifs (Littlepage et al., 2010). Pour étudier leur implication durant la formation de tumeurs, nous avons décidé d'utiliser un modèle de carcinogénèse épithéliale chez *Drosophila melanogaster*. Dans cette espèce, seules deux MMPs sont décrites, ce qui facilite leur étude fonctionnelle grâce aux nombreux outils développés chez la *Drosophile*. Précédemment, notre équipe a montré qu'une tumorigénèse dans les glandes accessoires peut être induite par l'activation de la voie EGFR/RAS/MAPK. Cependant, la promotion et la progression de la tumeur nécessite le recrutement de la voie PI3K/AKT/TOR.

Nos résultats apportent de nouvelles informations concernant l'implication et la régulation des MMPs durant la carcinogénèse épithéliale. Ils montrent que seule MMP1 est impliquée dans la tumorigénèse et a un rôle essentiel dans l'extravasation des cellules tumorales en dehors de l'épithélium. Cette étape correspond à une fenêtre de temps où une forte réorganisation du cytosquelette et du microenvironnement est observée. Ces données

suggèrent qu'un programme spécifique est conduit par les cellules pour provoquer leur extravasation.

Tumor extravasation in *Drosophila* accessory glands relies on ERK-dependent, temporary expression of MMP1.

Authors

Amandine Rambur, Corinne Lours-Calet, Claude Beaudoin, Vincent Mirouse, Amalia Trousson, Jean-Marc Lobaccaro, Silvère Baron, Laurent Morel & Cyrille de Jossineau.

Abstract

Modification of tumor microenvironment and particularly degradation of the extracellular matrix by matrix metalloproteinases (MMPs) is crucial for carcinogenesis. However, due to a strong redundancy between the MMPs and their substrates and existence of compensatory phenomena, the roles of MMPs remain unclear. To study their impact during epithelial tumorigenesis, we have decided to use a simpler model of *Drosophila* accessory glands carcinogenesis we have developed in our lab, where only two MMPs are described. We find that MMP1 is expressed under constitutive activation of the EGFR/RAS/MAPK pathway, and is essential for tumorigenesis. More, this expression appears restricted to cells before their extravasation and is concomitant to cytoskeletal reorganization and modification of extracellular matrix organization in the vicinity of the tumor cells. This defines a strict sequence of events to support tumorigenesis, implicating the existence of a specific program for the cells to achieve their extravasation from the epithelium.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) represents a family of more than 20 endopeptidases in mammals (Abbenante and Fairlie, 2005). MMPs are implicated in many different cellular processes such as effectors catabolism or proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM), and they play a critical role in pathologies such as cancer. For example, MMPs overexpression is observed in prostate cancer and correlates with the aggressiveness of the tumor (Gong et al., 2014b). However, the roles of the MMPs remain unclear as they show a strong redundancy in their substrates and functions, and can be associated to contradicting results: loss of *mmp2* in a mouse model induces a decrease of lung metastasis while on the contrary, *mmp9* null mice display an increase of invasive foci and perivascular invasion (Littlepage et al., 2010). To study the implication of MMPs during the tumor formation, we have decided to use a model of epithelial carcinogenesis in *Drosophila melanogaster*. There,

only two MMPs are described, and their function can be easily investigated using the many specific tools developed in *Drosophila*. Previously, our team has shown that accessory glands tumorigenesis can be initiated by constitutive activation of the EGFR/RAS/MAPK signaling pathway. However, tumor promotion and progression rely on the recruitment of PI3K/AKT/TOR pathway that is strongly activated in tumors that emerge from, but are independent of, the epithelium.

The present study brings new information about the implication and regulation of MMPs during epithelial carcinogenesis. We show that only MMP1 is implicated in tumorigenesis and has a critical role in extravasation of the tumor cells from the accessory glands. More, expression of MMP1 depends on RAS/MAPK pathway activation and more precisely on ERK activation. Therefore, MMP1 expression is restricted to the cells before their actual extravasation. This precise step of MMP1 expression corresponds to a time window where the cells show strong cytoskeletal reorganization and where microenvironment is disturbed. These events seem to converge to allow cell extravasation, and their concomitance suggests that a specific program is driven by cell to provoke this extravasation.

Results

Accessory glands are surrounded by a basal lamina and muscle fibers.

Little information is available concerning extracellular matrix of *Drosophila* accessory glands. It is already known that a layer of muscle fibers completely encloses the gland. Staining the gland with labelled phalloïdin reveals this well-organized muscle sheet that forms a continuous layer at the surface of the gland (**fig 1C**). Higher magnification reveals that contiguous muscle fibers are linked together by actin bridges, a phenomenon that can explain how mostly unchanged distance between the muscle fibers can be conserved in spite of natural contraction of the fibers (**fig 1D**). We now show the presence of a basal lamina along the epithelium, where collagen IV (Viking) and Perlecan can be detected (**Fig 1A-B'**). This basal lamina is situated between the epithelial layer and the muscle layer which must reinforce the stability of the accessory gland.

Natural delamination of type II cells that occurs at the basal side of the epithelium is concomitant to MMP1 expression.

The accessory gland epithelium is composed of two types of cells. Type I cells are of pentagonal or hexagonal shape and represent ~96% of the total number of the epithelial cells. Type II cells are pear-shaped, bigger cells that contain a high content of vesicles (black arrow,

fig 1E). Types II cells have been shown to naturally delaminate in the lumen of the gland to participate to the female fecundation during mating (Leiblich et al., 2012). We first wondered how cells could leave the epithelium and decided to investigate the role of MMPs, responsible of extracellular matrix degradation. In *Drosophila*, two distinct MMPs are described. MMP1, notably implicated in tracheal growth and morphogenesis during development; and MMP2 which displays different roles in metamorphosis, larval tissue histolysis and epithelium fusion (Llano et al., 2000, 2002; Page-McCaw et al., 2003). In glands, natural delamination of type II cells can be observed by their condensation (compare cells pointed by black and white arrows, **Fig 1E**). Cells also are in the process of leaving the epithelium, as shown by DAPI staining that reveals misalignment of their nuclei compared to surrounding cells (Arrow, **Fig 1E''**). Finally, we observed that MMP accumulates in the epithelium of accessory glands in this physiologic context, exclusively in the zone of cell delamination (**Fig 1E-E''**).

MMP1 but not MMP2 modulate tumorigenic capacities of Ras^{V12} expressing cells, by a cell autonomous mechanism.

A second type of delamination can be observed in altered condition: we previously shown that clonal expression of an active form of RAS (GFP-Ras^{V12} expressing clones) induced tumor formation from epithelial cells of the accessory glands. This delamination occurs mostly on the basal side of the epithelium, contrary to natural type II cell delamination, showing that the cells are able to cross the basal lamina. By immunostaining, we then revealed that MMP1 is strongly expressed in the vicinity of GFP-Ras^{V12} expressing clones (**fig 2A-A'**). We then tested the hypothesis that MMP1 was controlling clone basal delamination in a cell-autonomous manner. We combined expressions of Ras^{V12} with an RNAi directed against MMP1, and this induces a strong decrease of invasive tumor frequency (*i.e.* clones that left the epithelium to form external masses) (**fig 2B**), showing that MMP1 is indeed expressed by the clonal cells and implicated in their delamination. Conversely, expression of a RNAi against MMP2 has no impact on tumor frequency (**fig 2C**). This indicate that only MMP1 is implicated in the tumorigenic process induced by Ras^{V12} expression in accessory glands epithelial cells.

Furthermore, we noticed that MMP1 is highly expressed in clones that are within the epithelium, but cannot be detected in the actual tumors (Compare **fig 3A** and **3B**). This phenomenon implies that cells strongly control MMP1 expression depending of their environment.

MMP1 expression is dependent of ERK and RAS/MAPK pathway activation.

To understand the molecular mechanism that could be implicated in this control, we first determined normal and Ras^{V12} induced expression of MMP1. We found that MMP1 mRNA is overexpressed by around 5-fold in accessory glands displaying Ras^{V12} clones (**fig 3C**). Considering the low number of clones for each gland, it implies an extremely high activation of MMP1 gene in the rare clonal cells compared to normal cells. This overexpression is also detected for a second model of tumor induction, by clonal expression of a constitutively activated form of EGFR, EGFR λ , that also recruits the RAS/MAPK pathway (**fig 3D**). We then decided to determine the role of this pathway in *MMP1* activation. First, co-expressing Ras RNAi with EGFR λ in clones totally suppressed MMP1 mRNA accumulation, showing that this overexpression depended on Ras activation (**fig 3D**). Second, as it exists a classical and an alternate cascade of activation depending on RAS, we then co-expressed ERK RNAi with Ras^{V12} in clones. Once more, it completely reversed MMP1 overexpression (**fig 3C**), showing that MMP1 overexpression depends on the activation of the classical EGFR/RAS/MAPK pathway.

Ras^{V12} expressing cells induced cytoskeletal reorganization

We observed that clones displaying MMP1 staining are always composed of a limited number of cells, contrary to tumors that are composed of many hypertrophic cells. Furthermore, we demonstrated that MMP1 expression depends on ERK activation, and we previously showed that EGFR/RAS/MAPK is the pathway that initiates tumorigenesis in accessory gland. Taken together, these data suggest that attempt to leave the epithelium is an early event in RAS^{V12} induced-tumorigenesis. To show this, we first imaged clonal cells in small clones. Phalloidin staining revealed strong actin cytoskeletal reorganization, which was accompanied by extravasation of mutant cells as well in the apical (green arrow) than in the basal side (orange arrows) (**fig 4A-A''**). Furthermore, it was possible to reveal a peculiar shape in the basal side of the clonal cells: staining the muscle fibers revealed that they were making striations at the surface of the basal surface of the clonal cells (**fig 4B-B'**). Considering the particular shape of the clonal cells, it could be interpreted as a mechanical pressure exerted by these cells on the muscle layer. This hypothesis was reinforced by imaging of bigger tumors, where phalloidin staining revealed that the actin fibers of muscle cells were disorganized, indicating that they had been pushed away by the tumor expansion (**fig 4C**). However, limited disorganization compared to the size of the tumors also confirmed that clonal cells must have left the epithelium at an early step of tumor development. Thus, expression of MMP1 under

RAS/MAPK pathway activation, cytoskeletal reorganization and imprints of migration through the muscle fibers allowed us to conclude that Ras^{V12} expressing cells were able to actively extract themselves from the epithelium.

Discussion

Epithelial tumorigenesis is a term that regroups many different processes. From an initial event happening in one single cell, tumor is supposed to start growing in the organ from which this cell comes from, then to invade local tissues through epithelium-mesenchyme transition and migration, and finally to produce cells that can detached from the tumor, go into blood or lymphatic vessels and finally colonize other organs. However, cancer aggressiveness varies hugely from one site to another, and also from one patient to another. Typically, prostate cancers are often slow to develop aggressive forms, as pancreas cancers show a far stronger tendency to spread metastasis even from relatively small tumors. The extracellular matrix is thought to play a critical role cell adhesion and structural organization of the tissues, and then could play a critical role in local invasion and metastasis spreading. Besides, altered extracellular matrix and differential expression of MMPs are among the hallmarks of cancer. However, the study of MMPs is complicated in mammals because of their large number (>20) and redundancy. Furthermore, data that describe tumor formation *in vivo* are scarce, and the molecular programs necessary to cell extravasation are poorly understood. Recently, our team have developed a drosophila model of epithelial carcinogenesis in the accessory gland, allowing close examination of the phenomena that lead to cell delamination.

MMPs are expressed essentially during the development of the drosophila, and are implicated in tissue remodeling and cell migration, as during tracheal development. MMP1 has already been implicated in induced tumorigenesis and particularly in metastatic behavior. The models of tumorigenesis that were described are based on the disturbance of epithelial cell polarity by abolition of expression of genes such as *lgl* or *scrib* during development. In these models, cell migration and metastatic behavior are modulated by MMP1 expression, and the different authors have shown that *lgl* or *scrib* mutation induce activation of the JNK pathway and finally expression of MMP1 (Uhlirova and Bohmann, 2006; Beaucher et al., 2007; Leong et al., 2009; Kulshammer and Uhlirova, 2013; Vaughn and Igaki, 2016). Moreover, individual or combination of two mutations : *scrib*^{-/-} *Ras*^{act} showed that MMP1 expression is induced by *scrib*^{-/-} but not *Ras*^{ac} (Uhlirova and Bohmann, 2006). However, our results show some new aspects of tumorigenesis.

First, in adult accessory gland, MMP1 expression is regulated by the RAS/MAPK pathway, and this activation also drives cytoskeleton reorganization, i.e. changes in cell polarity that in previous models were the main driver of tumorigenesis. This could reveal a fundamental difference of the tumorigenic process depending of the stage of development: previous models were mostly realized in imaginal discs, where cells are still dividing and reorganizing themselves to create new tissues. A tight control of these phenomena is probably necessary to normal development, which could explain why, in that context, increasing proliferation by *Ras^{ac}* overexpression does not induce more cell migration or metastatic behavior. On the contrary, in the accessory gland, *Ras^{V12}* expression occurs in post-mitotic, differentiated cells. There, it is sufficient to induce both MMP1 expression and cell delamination.

Second, despite the many valuable information that were already produced in previous models, only indirect evidences show that tumor cells are able to leave a tissue to go to surrounding lymph: in some cases, new tumors appear at ectopic position in larvae, and to transfer tumors from one larva to an adult fly abdomen can lead to the formation of new tumors in this fly. However, how this phenomenon can occur is not described. Here, we show that in a normal epithelium, a strikingly small group of cells can induce a complete program of cell migration, momentarily expressing MMP1 to digest basal lamina, reorganizing its cytoskeleton to push on the accessory gland muscle layer and then migrating from the epithelium through this layer to form a tumor in the surrounding hemolymph. So, only one single activating mutation - here in the Ras protein – concerning only a very limited number of cells, can apparently lead to a step that could be in the last ones before metastatic spreading.

If we previously demonstrated that autocrine feedback loops are recruited during accessory gland tumorigenesis and can explain the behavior of these *Ras^{V12}* clones, comparison of this model with the previously described ones illustrates the importance of cellular context for tumor development, and so could explain how cancers from different sites or patients can display such strikingly different aggressiveness.

*Materials and methods***Fly stocks and experimental crosses**

y,w,HS:flp122/+;Act:FRTstopFRTGal4,UAS:GFP/CyO flies from V. Mirouse lab allowed conditional clonal expression of GFP. When combined to UAS:Ras^{V12} flies (4847) or UAS:EGFR λ top (59843), they allowed conditional clonal co-expression of GFP and Ras^{V12} (GFP-Ras^{V12} flies) or EGFR λ top (GFP-EGFR λ flies). GFP-Ras^{V12} and GFP-EGFR λ flies were then crossed with following stocks to realize experiments: UAS:nlsGFP (4775), UAS:RolledRNAi (34855), UAS:RNAiRas (106642), UAS:MMP1 RNAi (101505), UAS:MMP2 RNAi (31371) (Bloomington Drosophila Stock Center), MIMIC PCan RFP, VikingGFP/Cyo flies.

Conditional expression induction

Briefly, condition of use of the flippase (flp)/FRT system was determined to produce an average of 4-6 clones per accessory gland ($\approx 1\%$ of total number of epithelial cells). Flippase-dependent recombination was induced during pupal stage by 12 minutes (for GFP-Ras^{V12} and GFP-EGFR λ flies) heat-shock at 37°C. Flies were then kept at 25°C until the end of pupal stage. Males were collected at emergence from pupae 3 to 3,5 days after heat shock and kept for another 3 days at 25°C before dissection.

Immunohistochemistry and imaging

Accessory glands were dissected in 1X PBS or 1X PBS. They were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde, washed once with 1X PBS and three times with 1X PBS containing 0,2% Triton (PBS-T) for permeabilisation. The samples were blocked for 10 min with 0,5% of bovine serum albumin in PBS-T and incubated overnight at 4°C in primary antibodies diluted in the same blocking solution. The tissues were then washed twice for 5 min with PBS-T and incubated for 1h at room temperature in secondary antibody diluted 1:1000 in blocking solution. Added with secondary antibodies, DAPI (Di AminidoPhenylIndol, Life Technology) 1:1000 was used to stain DNA and Alexa568-phalloidin (A12380, Life Technology) or Alexa633-phalloidin (A22284, Life Technology) 1:10000 were used to reveal F-actin. Following two washes in PBS-T, the samples were then mounted in Vectashield (#-1000, Vector Laboratories) and visualized using a Leica SP5 or SP8 confocal microscope. Image stacks were processed in ImageJ or Imaris software.

We used the following antibodies: Mouse Coracle (1:300, #C566.9 DHSB), mouse E-Cadherin (1:1000, #DCAD2 DHSB), mouse Fasciclin III (1:400, #7610 DHSB), mouse MMP1 (1/100,

14A3D2 DHB), goat GFP (1:1000, #5450 Abcam), secondary antibodies coupled to different fluorophores 488 (1:1000, Life Technology), Cy5 or Cy3 (1:1000, Jackson Immunology).

RNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR (Real-time Quantitative PCR)

RNA were isolated from accessory glands dissection, by Trizol-extracted total accessory glands (Invitrogen). Reverse transcription was performed by using SuperScript IV Reverse Transcriptase kit (ThermoFisher Scientific). Quantitative PCR was performed using on the LC480. *rpl32* was used for the normalization.

Primers for qRT-PCR analysis were:

MMP1:

Forward: 5' TAGACACACTCTTCAACTCGGC-3'

Reverse: 5' TCTTGCCGTTCTTGTAGGTGAA-3'

Rpl32 (Stephano et al., 2018):

Forward: 5'-TTGGCTTCGGTTTCCGGCAAG-3'

Reverse: 5'-ATCGATCCGACTGGTGGCGGAT3'

Invasive tumor frequency

During dissection, direct observation under binocular microscope allowed to visualize the presence of tumors at the surface of the accessory glands. Tumor frequency was determined as the percentage of flies that displayed at least one tumor on their accessory glands. Following preliminary tests, it is important to note that we designed the experiments to obtain a similar number of UAS in all the flies we tested to avoid Gal4 titration effect.

Statistical analyses

All experiments were done a minimum of four times (n, biological replicates) on numerous glands (technical replicates). Statistical analyses (n = 4) were performed using Graph Pad Prism 6 or R software. Data are shown as means $\pm$ SEM. P-values were obtained from Mann Whitney's test for mRNA levels and from Chi² test for Invasive tumor frequency.

Figures

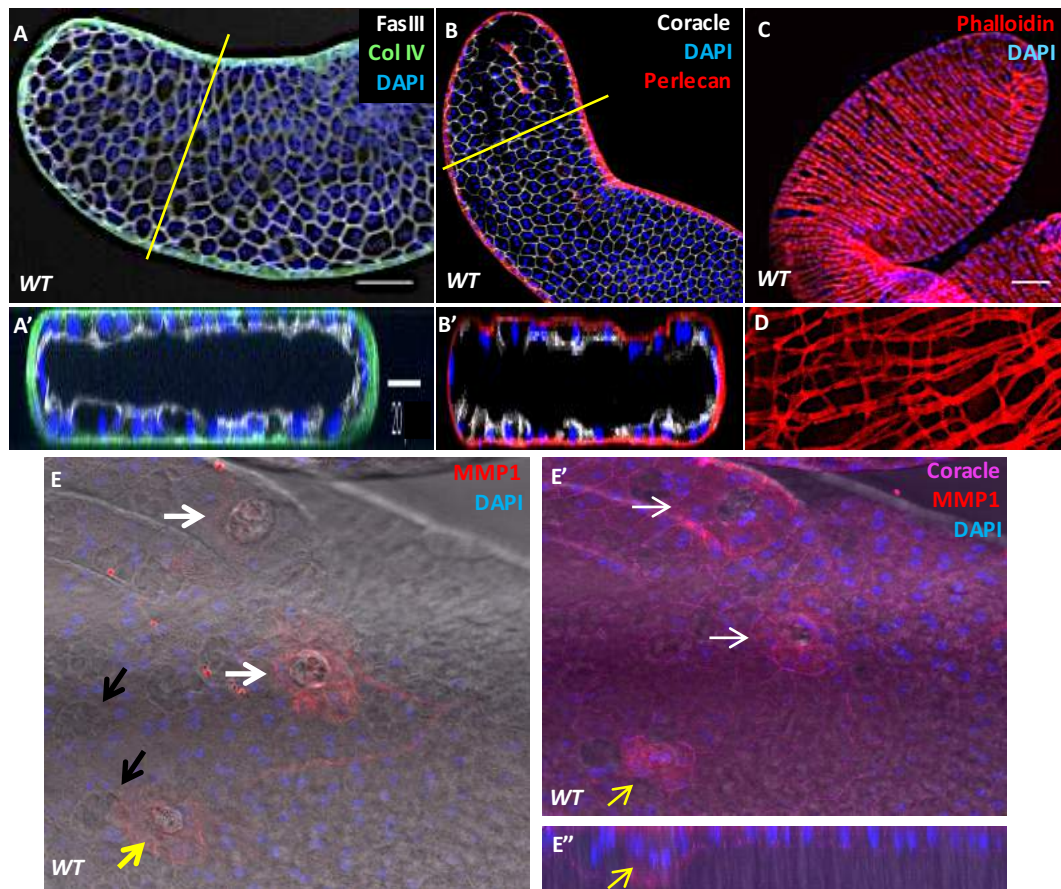


Figure 1 : Accessory glands are surrounded by a basal lamina and a muscle layer

(A) to (B) Presence of a basal lamina: Viking-GFP (collagen IV-GFP) (A) and Perlecan (B) is present and transversal optical section (along the yellow line in (A') and (B')) shows its deposition at the basal pole of epithelial cells.

(C) Gland is embedded in a muscle sheet as we show with phalloidin staining.

(D) Contiguous muscle fibers are linked together by actin bridges.

(E)-(E') Secondary cells can delaminate in the distal part of the accessory gland. This phenomenon is linked to a change of shape of the cells from classical aspect (black arrows) to more condensed aspect (yellow and white arrows). MMP1 is present in primary cells in the vicinity of delaminating cells (E) to (E').

(E'') Transversal reconstruction of (E') showing a delaminating secondary cell (yellow arrow in (E) and (E')) surrounded by MMP1 and extending to the lumen of the accessory gland, as shown by position of apical Fascilin III staining and more internal position of the nuclei of the cell.

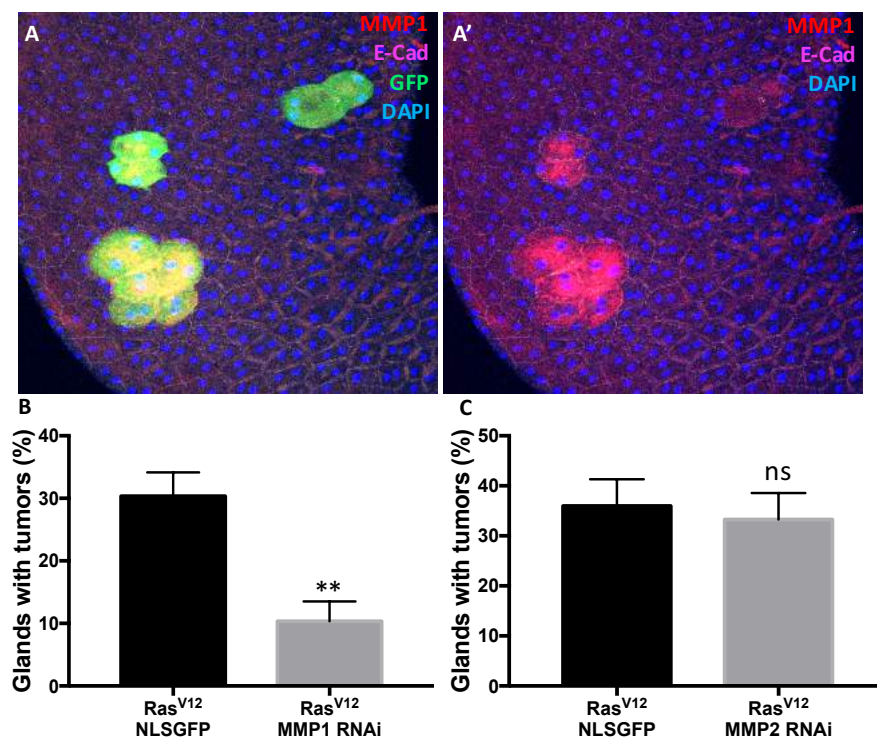


Figure 2: MMP1 but not MMP2 RNAi modulate tumorigenesis in accessory glands

(A)-(A') MMP1 is strongly expressed in the vicinity of *Ras*^{V12} NLSGFP expressing clones

(B) Invasive tumor frequency of *GFP-Ras*^{V12}, *MMP1* RNAi compared to *Ras*^{V12} NLSGFP expressing clones

(C) Invasive tumor frequency of *GFP-Ras*^{V12}, *MMP2* RNAi compared to *Ras*^{V12} NLSGFP expressing clones

**P<0,01

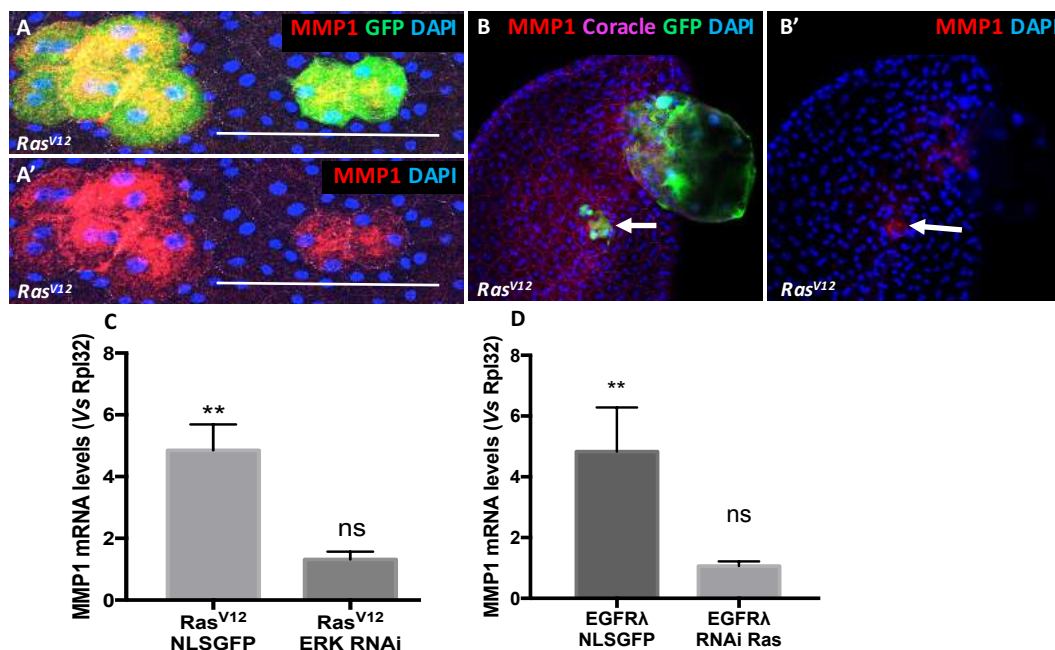


Figure 3 : Tumorigenesis induced by Ras^{V12} need MMP1 expression

(A) to (B) MMP1 is specifically expressed in GFP-Ras^{V12} expressing clones in the epithelium (white arrow in (B)) but not in tumor which leave the epithelium.

(C) mRNA levels of *mmp1* in Ras^{V12} NLSGFP and Ras^{V12} MMP1 RNAi expressing accessory glands, compare to NLSGFP controls

(D) mRNA levels of *mmp2* in Ras^{V12} NLSGFP and Ras^{V12} MMP1 RNAi expressing accessory glands, compare to NLSGFP controls

** P<0,01

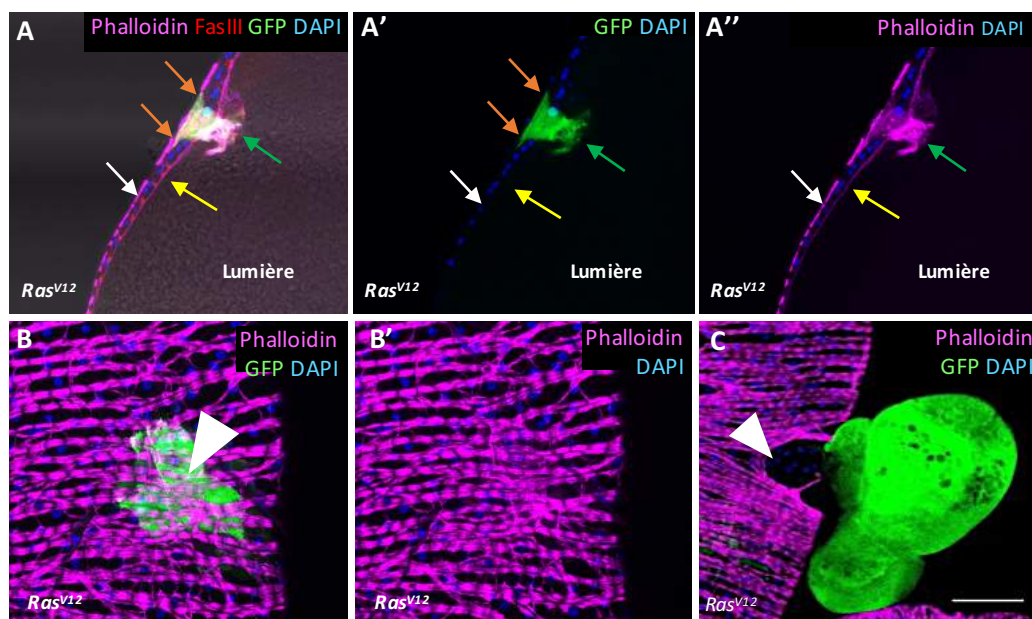


Figure 4: Cytoskeletal reorganization during cell extravasation

(A) Pseudo-bright field shows the gland. GFP indicates RasV12 expressing cells. One or few RasV12 expressing cells display abnormal shape. Phalloidin staining that visualizes both the muscle fibers (white arrow, external part of the gland), apical actin fibers of epithelial cells (yellow arrow, co-localizing with apico-lateral Fasciclin III staining), and basal actin fibers of epithelial cells (orange arrow), indicates an extension of these cells inside the lumen of the gland (green arrow).

(A') and (A'') GFP expression co-localizes with excessive presence of actin fibers, showing the RasV12 expressing cells are migrating.

(B)-(B') White arrow : striations at the surface of the basal surface of the clonal cells.

(C) White arrow: GFP-rASV12 expressing tumors are correlated to muscle sheet disorganization.

References

- Abbenante G, Fairlie DP (2005) Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem* 1:71–104
- Beaucher M, Hersperger E, Page-McCaw A, Shearn A (2007) Metastatic ability of *Drosophila* tumors depends on MMP activity. *Dev Biol* 303:625–634. doi: 10.1016/J.YDBIO.2006.12.001
- Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK (2014) Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors in Prostate Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 6:1298–1327. doi: 10.3390/cancers6031298
- Kulshammer E, Uhlirova M (2013) The actin cross-linker Filamin/Cheerio mediates tumor malignancy downstream of JNK signaling. *J Cell Sci* 126:927–938. doi: 10.1242/jcs.114462
- Leiblich A, Marsden L, Gandy C, et al (2012) Bone morphogenetic protein- and mating-dependent secretory cell growth and migration in the *Drosophila* accessory gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19292–7. doi: 10.1073/pnas.1214517109
- Leong GR, Goulding KR, Amin N, et al (2009) scribble mutants promote aPKC and JNK-dependent epithelial neoplasia independently of Crumbs. *BMC Biol* 7:62. doi: 10.1186/1741-7007-7-62
- Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, et al (2010) Matrix Metalloproteinases Contribute Distinct Roles in Neuroendocrine Prostate Carcinogenesis, Metastasis, and Angiogenesis Progression. *Cancer Res* 70:2224–2234. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3515
- Llano E, Adam G, Pendás AM, et al (2002) Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 277:23321–9. doi: 10.1074/jbc.M200121200
- Llano E, Pendás AM, Aza-Blanc P, et al (2000) Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem* 275:35978–85. doi: 10.1074/jbc.M006045200
- Page-McCaw A, Serano J, Santé JM, Rubin GM (2003) *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev Cell* 4:95–106. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00400-8
- Uhlirova M, Bohmann D (2006) JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *EMBO J* 25:5294–304. doi: 10.1038/sj.emboj.7601401
- Vaughen J, Igaki T (2016) Slit-Robo Repulsive Signaling Extrudes Tumorigenic Cells from Epithelia. *Dev Cell* 39:683–695. doi: 10.1016/j.devcel.2016.11.015

Discussion et perspectives

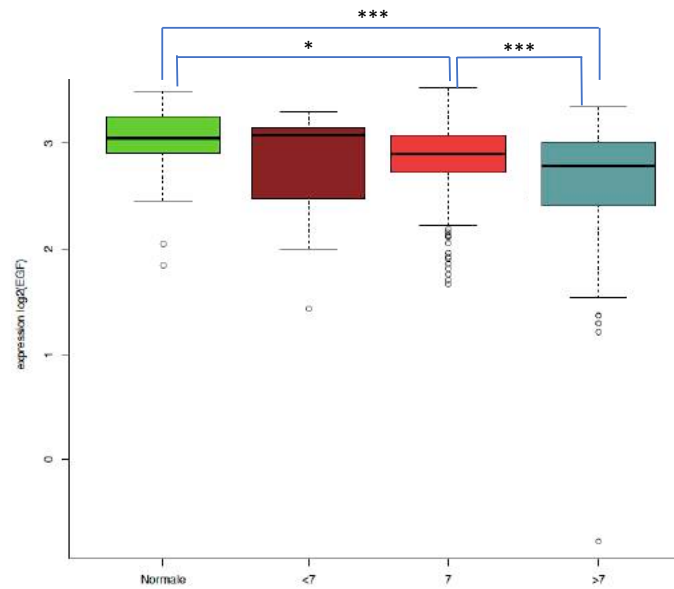


Figure 42 : Boxplot de l'expression d'egf sur des échantillons humains de cancer de la prostate

Normal = tissu adjacent (n=53)

<7 = score de Gleason inférieur à 7, cancer à un stade peu avancé (n=21)

7 = score de Gleason égal à 7, cancer de la prostate moyennement avancé (n=201)

>7 = score de Gleason supérieur à 7, cancer de la prostate avancé (n=184)

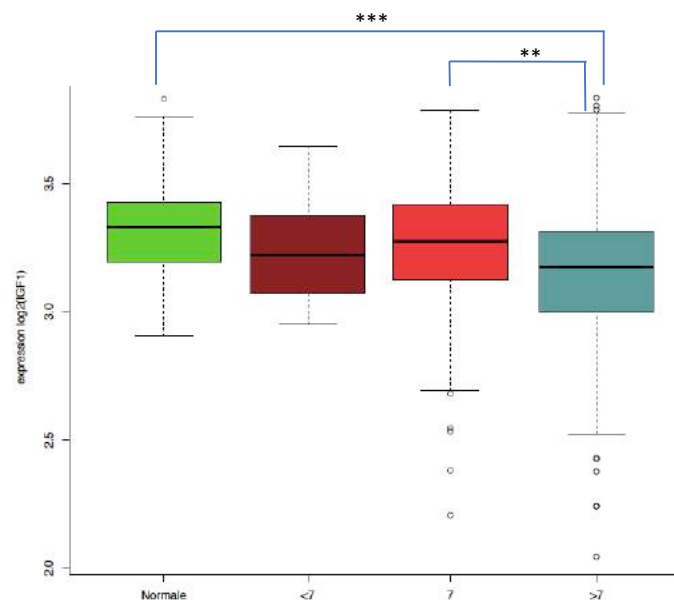


Figure 43 : Boxplot de l'expression d'igf1 sur des échantillons humains de cancer de la prostate

Normal = tissu adjacent (n=53)

<7 = score de Gleason inférieur à 7, cancer à un stade peu avancé (n=21)

7 = score de Gleason égal à 7, cancer de la prostate moyennement avancé (n=201)

>7 = score de Gleason supérieur à 7, cancer de la prostate avancé (n=184)

Cancer de la prostate et activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR

La réactivation de processus développementaux tels que l'activation de voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance, est une étape essentielle pour le développement du cancer de la prostate. Le déséquilibre que cela engendre dans la cellule au niveau de la balance prolifération/apoptose, accompagné par des désordres génétiques, confèrent à la cellule un avantage prolifératif lui permettant de se soustraire des signaux régulateurs provenant des cellules environnantes. Dans le cadre du cancer de la prostate, deux voies de signalisation majeures, sensibles aux facteurs de croissance, sont impliquées : la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT/mTOR. Elles sont impliquées dans le contrôle de processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la croissance ou encore la différenciation cellulaire. Des données de la littérature montrent que ces deux voies sont suractivées, particulièrement dans les stades tardifs (Taylor et al., 2010; Mukherjee et al., 2011), et qu'elles rentrent en synergie pour conduire au développement du cancer de la prostate (Mulholland et al., 2012; Jefferies et al., 2017). Une analyse complémentaire sur des données cliniques disponibles en ligne (TCGA : <https://portal.gdc.cancer.gov>) a été réalisée sur 4 groupes de patients : cancer faiblement avancé (score de Gleason <7), moyennement avancé (score de Gleason =7), avancé (score de Gleason >7) ; et des échantillons de tissu adjacent représentant le tissu sain. Cette fois ce n'est pas l'activation des voies de signalisation qui a été analysée mais l'expression des facteurs de croissance responsables du recrutement des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR, à savoir IGF1 et EGF. Les résultats montrent une corrélation inverse entre l'expression d'EGF et le score de Gleason : l'expression d'*EGF* décroît au cours du développement du cancer de la prostate (**figure 42**). L'analyse de l'expression d'*IGF1* montre qu'il est exprimé plus tardivement, lorsque le cancer est moyennement avancé, puis décroît (**figure 43**).

Finalement, toutes ces données montrent que d'une part les deux voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR sont altérées et impliquées dans le cancer de la prostate. D'autre part, cette dérégulation semble mettre en jeu l'expression de facteurs de croissance tels qu'*EGF* et *IGF1*, particulièrement lors des stades moyennement avancés du cancer de la prostate. De plus, la diminution de leur expression dans les stades plus tardifs (score de Gleason >7), suggère que la dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR se met en place précocement dans le développement du cancer de la prostate et que leur maintien dans les stades plus tardifs met en jeu d'autres mécanismes tels que des mutations activatrices par exemple.

Cependant, les données de la littérature disponibles sur l'état d'activation de ces deux voies ne concernent pas les stades précoces de développement du cancer de la prostate. Le rôle de ces deux voies dans les stades précoces ainsi que les mécanismes moléculaires mis en place pour entraîner leur co-dérégulation dans les stades les plus tardifs ne sont pas connus. Dans ce contexte, mon projet de thèse avait deux objectifs principaux : (1) l'étude du rôle respectif de chacune des deux voies dans la tumorigenèse prostatique ; (2) l'étude des mécanismes moléculaires accompagnant la dérégulation de ces voies de signalisation et plus particulièrement au cours de ma thèse, l'implication des métalloprotéases.

Pour réaliser notre étude, nous avons utilisé un modèle original, la drosophile, dans lequel les glandes accessoires représentent l'équivalent fonctionnel de la prostate.

Co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR dans les glandes accessoires de la drosophile.

La première partie du projet consistait en l'étude de l'implication des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR dans la tumorigenèse prostatique. Nous avons dans un premier temps réalisé la suractivation de chacune des voies afin d'évaluer leur pouvoir tumorigénique.

Pour activer la voie RAS/MAPK, nous avons choisi d'utiliser une protéine RAS mutée, constitutivement active. RAS existe sous plusieurs formes : H-RAS, K-RAS et N-RAS. La forme K-RAS étant la plus fréquemment mutée dans le cancer de la prostate, c'est celle que nous avons choisie pour notre modèle. Ainsi, la suractivation de la voie RAS/MAPK dans les glandes accessoires de la drosophile, par l'expression d'une protéine K-RAS constitutivement active (RAS^{V12}) de manière clonale, enclenche la formation de masses cellulaires présentant des caractéristiques tumorales : hyperplasie, hypertrophie, dédifférenciation cellulaire. Des modèles murins avec une activation de la voie RAS/MAPK par l'expression d'une forme active de RAS, présentent des phénotypes variés de bas grades au niveau de la prostate, mais pas de développement malin de tumeurs (Scherl et al., 2004). C'est notamment le cas avec une expression de H-RAS^{G12V} sous le contrôle d'un promoteur probasine, spécifique des cellules épithéliales de la prostate, qui conduit à la formation de néoplasies intraépithéliales de bas à grade à 3 mois, mais pas à la formation de carcinomes. Un autre modèle murin exprimant la même forme mutée de RAS que dans notre modèle, K-RAS^{V12}, au niveau de la prostate présente des hyperplasies atypiques et des PIN de bas grade avec des anomalies nucléaires et nucléolaires mais de nouveau, une absence de développement d'adénocarcinome (Pearson et al., 2009a). Notre modèle, en plus de montrer

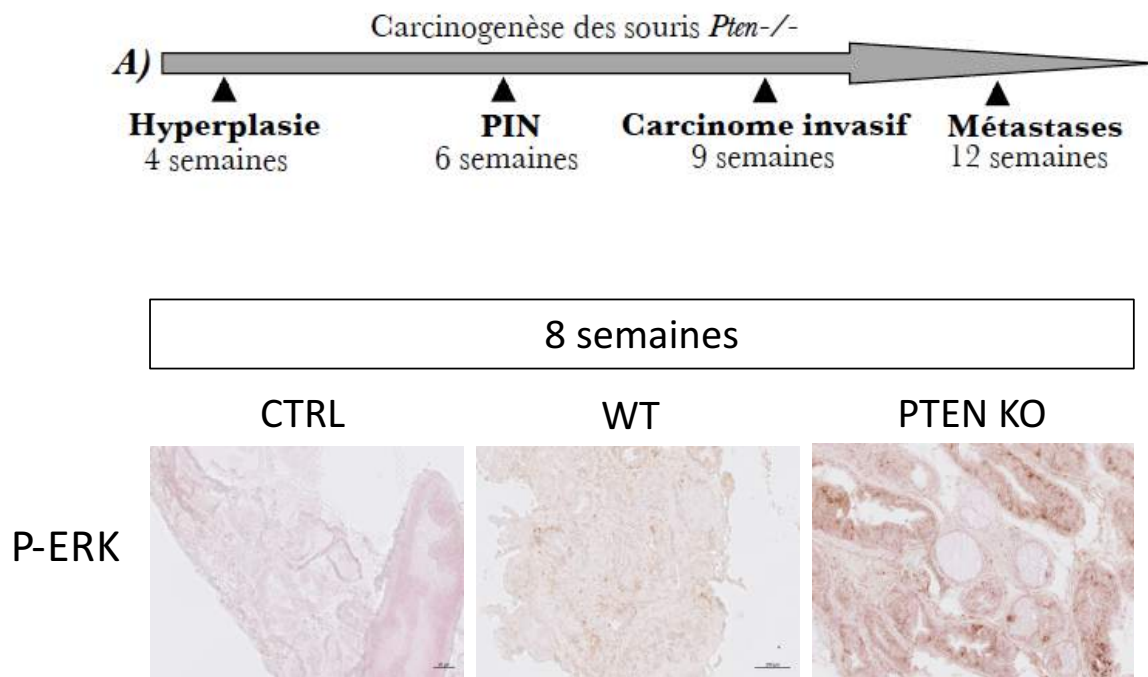


Figure 44 : P-ERK est détecté au niveau de la carcinogenèse précoce dans le modèle murin *PB-Cre4xPtenloxP/loxP*

L'accumulation de ERK phosphorylée est observée au niveau des cellules épithéliales de la prostate dès 8 semaines de développement chez les souris *Pten*^{-/-} ce qui correspond à un stade précoce du carcinome invasif.

PTEN KO : *PB-Cre4xPtenloxP/loxP*, délétée pour *Pten*

des caractéristiques de développement précoce (hyperplasie, hypertrophie, dédifférenciation cellulaire), présente des caractéristiques de tumorigénèse plus tardive avec le développement de nouvelles trachées, suivant un mécanisme similaire à celui de l'angiogenèse chez les mammifères (Grifoni et al., 2015). Pour obtenir le même type de résultat en modèle murin suite à l'activation de la voie RAS/MAPK, un deuxième hit est nécessaire. En effet, quand la mutation K-RAS^{V12} est couplée à une activation de la voie WNT, des adénocarcinomes invasifs se forment dans 100% des cas (Pearson et al., 2009b). Finalement, dans les modèles murins, l'activation de la voie RAS/MAPK permet le développement d'une tumorigénèse précoce, mais nécessite un deuxième hit moléculaire pour basculer vers une forme invasive.

La suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR par l'expression d'une forme myristoylée d'*Akt* ou la délétion de *Pten*, de manière clonale dans les glandes accessoires de la drosophile, induit de l'hypertrophie cellulaire mais une absence complète de tumorigénèse. Cependant, son recrutement est indispensable pour conduire à la tumorigénèse suite à l'activation de la voie RAS/MAPK. Chez la souris, une délétion de *Pten* dirigée dans les cellules épithéliales prostatiques avec le promoteur de la probasine est capable de récapituler les premières étapes de la tumorigénèse prostatique telle qu'on l'observe chez l'homme : hyperplasie, néoplasie intraépithéliale puis carcinomes invasifs (Wang et al., 2003c). Cependant, ce modèle ne reproduit pas les étapes finales critiques de la maladie avec notamment la formation de métastases osseuses ; et ce, même si la mutation *Pten* est couplée à une délétion homozygote de *P53* (Chen et al., 2005; Martin et al., 2011) ou *Nkx3.1* (Kim et al., 2002b). L'analyse du statut d'activation de la voie RAS/MAPK dans le modèle murin délété pour *Pten*, montre la présence de P-ERK dès les stades précoces, avant même l'apparition de carcinomes invasifs (**figure 44**). Bien que ces résultats nécessitent une confirmation, ils suggèrent que l'activation de RAS/MAPK et donc la co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR est essentielle également dans les modèles murins pour conduire à la formation d'adénocarcinomes. De plus, si la perte de *Pten* est couplée à une activation de la voie RAS/MAPK suite à l'expression de K-RAS^{G12D}, une augmentation de la formation des métastases est observée chez les souris (Mulholland et al., 2012).

Ces résultats montrent qu'une coopération entre les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR est nécessaire pour conduire aux stades tardifs de tumorigénèse. Ainsi, le modèle que nous avons produit dans les glandes accessoires de la drosophile récapitule les mécanismes moléculaires présents dans les modèles murins. Seule la séquence d'activation diffère, mais elle peut être le reflet d'une différence de contexte cellulaire entre ces deux modèles. Les nombreux croisements de voies et nombreuses redondances retrouvées chez les

mammifères peuvent masquer des interactions et des mécanismes de régulation existants chez l'homme et visibles chez la drosophile. Pour la suite, l'apport d'inhibiteurs de la voie RAS/MAPK sur un fond génétique mutant pour *Pten* permettrait d'évaluer si l'activité de cette voie est un évènement essentiel au développement de la carcinogenèse, et de mettre en exergue un nouveau niveau de régulation entre les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR.

Nos résultats montrent également que l'activation de la voie RAS/MAPK induit l'expression de MMP1, une métalloprotéase impliquée dans la dégradation des matrices. Cette expression est ERK dépendante et indispensable à la tumorigenèse puisque la co-expression de RAS^{V12} avec un ARN interférent dirigé contre MMP1 bloque la formation de tumeurs. Il a été montré que les MMPs sont impliquées dans le clivage de peptides, tels que des ligands de voies signalisation. Ainsi, MMP2 et MMP9 sont requis *in vitro* pour le clivage et la libération de HB-EGF, ligand de l'EGFR (Razandi et al., 2003). Chez la drosophile, Spitz, Keren et Gurken sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires et doivent être clivés par une protéase pour être sécrétés et actifs (Urban et al., 2001, 2002). Dans notre modèle, MMP1 pourrait favoriser l'activation et/ou la libération des facteurs de croissance tels que Spitz et Ilp6. De manière surprenante, l'accumulation de MMP1 est transitoire dans les cellules mutantes pour RAS. Elle est uniquement détectée dans les cellules avant extravasation alors qu'elles sont en contact avec les cellules adjacentes saines. Sa présence dans les stades précoces de tumorigenèse suggère que MMP1 pourrait être un effecteur supplémentaire dans le dialogue entre la voie RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR lors de la phase initiale du développement des tumeurs.

Un dialogue entre EGFR, MMP9 et PI3K/AKT a été décrit récemment *in vitro* dans des cellules métastatiques VCaP et PC3 (Mandel et al., 2018). Les auteurs montrent que la surexpression de *Mmp9* conduit à une augmentation de l'expression d'*egfr* ; et qu'une inhibition de la voie PI3K/AKT/TOR diminue l'expression à la fois de *Mmp9* et d'*Egfr*. Ces données établissent un lien fonctionnel entre ces acteurs, bien qu'ils placent MMP9 en amont d'EGFR et en aval de la voie PI3K/AKT/TOR. Chez la drosophile, nous avons montré que MMP1 se trouve en aval de la voie RAS/MAPK. Cette différence de résultats peut s'expliquer par l'utilisation de lignées cellulaires dérivées de métastases et reflétant un stade très avancé de la maladie. Il serait intéressant de réaliser ce même type d'étude mais cette fois dans des lignées cellulaires tels que RWPE-1, dérivées de cellules prostatiques immortalisées mais non métastatiques et donc plus proche d'un développement précoce du cancer.

Des analyses complémentaires chez la drosophile pourraient permettre d'établir le lien entre MMP1 et la voie de signalisation PI3K/AKT/TOR. Pour cela, nous pourrions évaluer le

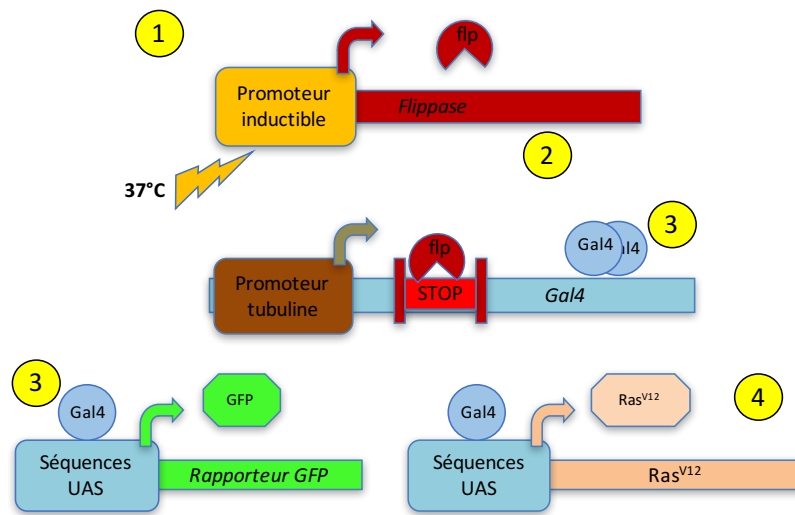


Figure 45: L'expression clonale de Ras^{V12} n'est pas spécifique dans les glandes accessoires de la drosophile

Suite à une incubation à 37°C, la flippase est produite (1). C'est une enzyme capable de reconnaître des sites spécifiques, les FRT, et d'éliminer l'information qui peut se retrouver entre eux. La flippase induit donc l'élimination du codon STOP se trouvant au niveau du gène GAL4 (2). La protéine GAL4 est produite (3) et peut se fixer sur ses séquences spécifiques UAS. Cette liaison conduit à l'expression du rapporteur GFP ainsi que de l'oncogène Ras^{V12} .

Le contrôle spatial de l'expression de l'oncogène est effectué par GAL4. Or GAL4 est exprimé sous la dépendance du promoteur de la tubuline qui est ubiquitaire. C'est pourquoi dans notre modèle des cellules clonales sont retrouvées dans toute la drosophile et pas uniquement dans les glandes accessoires.

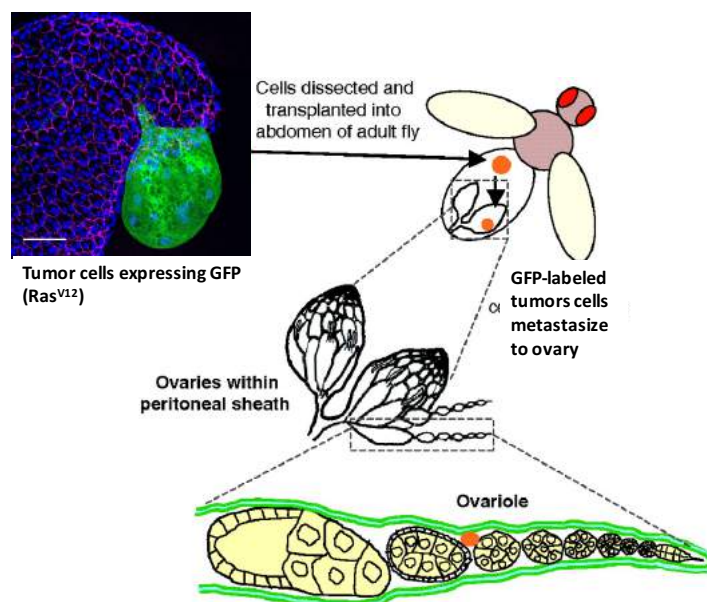


Figure 46 : Les expériences de transplantation chez la drosophile permettent d'évaluer les capacités invasives des cellules tumorales

Les cellules tumorales exprimant la GFP sont disséquées puis transplantées dans l'abdomen d'une femelle. Après plusieurs jours, les ovaires de la drosophile sont disséqués et la présence ou non de cellules exprimant la GFP est analysée. Si des cellules GFP sont présentes, cela indique qu'elles ont des capacités invasives puisque pour atteindre l'intérieur de l'ovariole, elles doivent traverser deux lames basales.

recrutement de cette voie est dans un contexte d'expression RAS^{V12} et d'inhibition ou de surexpression de MMP1. A l'inverse, l'analyse de l'expression de *Mmp1* pourrait être réalisée lors d'une activation de la voie PI3K/AKT/TOR. Ces analyses permettraient de déterminer si MMP1 se place en amont ou en aval du recrutement de la voie PI3K/AKT/TOR.

La co-dérégulation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR est-elle suffisante pour conférer un pouvoir invasif ?

L'activation de la voie RAS/MAPK conduit à une expression dépendante de *Erk* de la métalloprotéase 1. Celle-ci, couplée au recrutement de la voie PI3K/AKT/TOR initie une désorganisation de la couche musculaire entourant la glande accessoire et conduit à une invasion locale des tumeurs. Se pose la question de savoir si les cellules tumorales de la glande accessoire présentent des capacités invasives ?

L'expression de clones exprimant Ras^{V12} n'est pas spécifique des glandes accessoires. En effet, la stratégie que nous avons choisie conduit à une expression sporadique de Ras^{V12} dans tous les tissus de la drosophile. Les clones cellulaires porteurs de la mutation ne sont donc pas restreints à la seule glande accessoire (**figure 45**). Ainsi, même si nous observons des tumeurs dans d'autres tissus, il n'est pas possible de savoir s'il s'agit de tumeurs primaires issues de néo-clones ou secondaires suite à l'invasion de cellules provenant des tumeurs de la glande accessoire. Afin de tester les capacités métastatiques des cellules tumorales de l'épithélium de la glande accessoire, nous avons utilisé une technique originale de transplantation chez la drosophile (Miles et al., 2011; Rossi and Gonzalez, 2015)(**figure 46**). Elle consiste à isoler les cellules tumorales qui expriment l'oncogène et le marqueur fluorescent GFP. Elles sont ensuite injectées dans l'abdomen d'une femelle, dans l'hémolymph. Au bout de quelques jours, les ovaires sont prélevés et disséqués afin d'observer la présence ou non de cellules exprimant la GFP dans les ovarioles. Si des cellules sont présentes au niveau des ovarioles, cela indique qu'elles ont été capables d'enclencher un processus d'invasion puisqu'elles doivent traverser deux lames basales pour y accéder. Cette approche permet de discriminer les cellules présentes dans l'abdomen, qui auraient uniquement migrées après injection, des cellules présentes dans les ovarioles qui auraient des capacités invasives.

Nos résultats préliminaires montrent des masses vertes dans l'abdomen de la femelle, 3 semaines après l'implantation d'une tumeur de la glande accessoire (**figure 47**) ; cependant, nous n'avons pas observé d'invasion au niveau des ovarioles, suggérant que les cellules

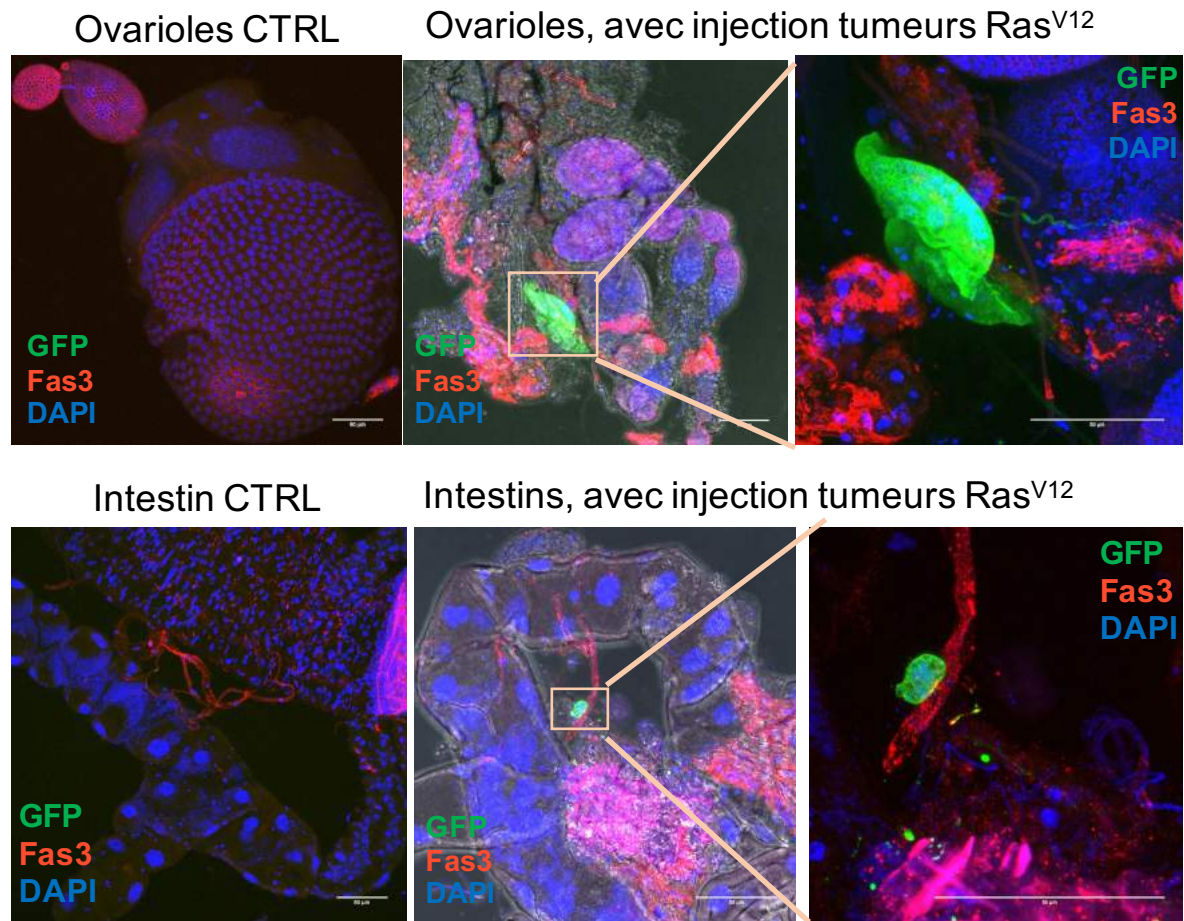


Figure 47 : Présence de masses cellulaires dans l'abdomen de femelle après injection de tumeurs *Ras^{V12}*

3 semaines après avoir injecté des cellules exprimant *Ras^{V12}* dans l'abdomen de femelles, les mouches sont disséquées. Au niveau des ovarioles, nous n'avons pas trouvé d'envahissement de cellules tumorales. Cependant, nous avons observé la présence d'une masse cellulaire attachée au niveau des tissus proches des ovaires. De plus, nous avons observé la présence d'une cellule accrochée au niveau des trachées proches des intestins, laissant penser à des phénomènes de migration cellulaire.

injectées n'ont pas la capacité à détruire les matrices extracellulaires et n'ont pas de réelles propriétés invasives.

De façon intéressante, certaines cellules sont observées associées aux trachées. Cela indique qu'elles ont pu développer des interactions avec les tissus trachéaux et s'adapter à leur nouvel environnement, ce qui suggère une reprogrammation cellulaire. Les expériences de transplantation chez la drosophile aboutissent généralement à une invasion de tout l'abdomen de la femelle, visible sans même avoir à réaliser la dissection. Dans les études publiées, les cellules injectées sont prélevées au niveau des disques imaginaux. La plasticité de ces disques imaginaux est importante puisqu'ils contiennent les cellules progénitrices qui formeront les différents organes et appendices de la mouche adulte. Nous avons analysé des cellules qui ont des potentialités beaucoup plus restreintes car prélevées chez une mouche adulte. Les cellules épithéliales injectées sont des cellules différenciées qui ont subi une phase de dédifférenciation dans les glandes accessoires suite à l'expression de Ras^{V12}, comme en témoigne la perte d'expression des marqueurs épithéliaux. Leur introduction dans l'abdomen des femelles les place dans un nouvel environnement qui pourrait induire un nouveau processus d'adaptation par reprogrammation des réseaux de signalisation et d'expression génique. Ces propriétés d'adaptation sont des prérequis pour le développement de métastases. Il sera important d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette reprogrammation cellulaire. Pour cela, nous envisageons une approche de RNAseq afin de comparer le transcriptome des cellules injectées, provenant des tumeurs de la glande accessoire et des cellules s'étant attachées ou ayant envahi l'hôte.

Dialogue entre les cellules tumorales et les cellules saines adjacentes

Au sein d'un épithélium, les cellules sont sensibles au comportement des cellules voisines afin d'ajuster leur propre comportement. Ce mécanisme a été décrit pour la première fois en 1975 par *Morata and Ripoll* (Morata and Ripoll, 1975). Parmi les paramètres pris en compte dans cette surveillance on trouve : une modification du taux de prolifération et une perte de polarité cellulaire. En condition physiologique, chez la drosophile, une cellule présentant une diminution de la croissance ou de la prolifération consécutive à des altérations de signalisation trophique et plasique, par exemple *via* une diminution de l'activation de la voie JAK/STAT ou une augmentation de l'activation de la voie Hippo, peut conduire à son élimination. Ce mécanisme est appelé mécanisme de compétition cellulaire (Neto-Silva et al., 2010; Ziosi et al., 2010). L'élimination des cellules sous-optimales est dépendante de la signalisation JNK qui permet l'induction l'apoptose. Il a également été suggéré que la voie

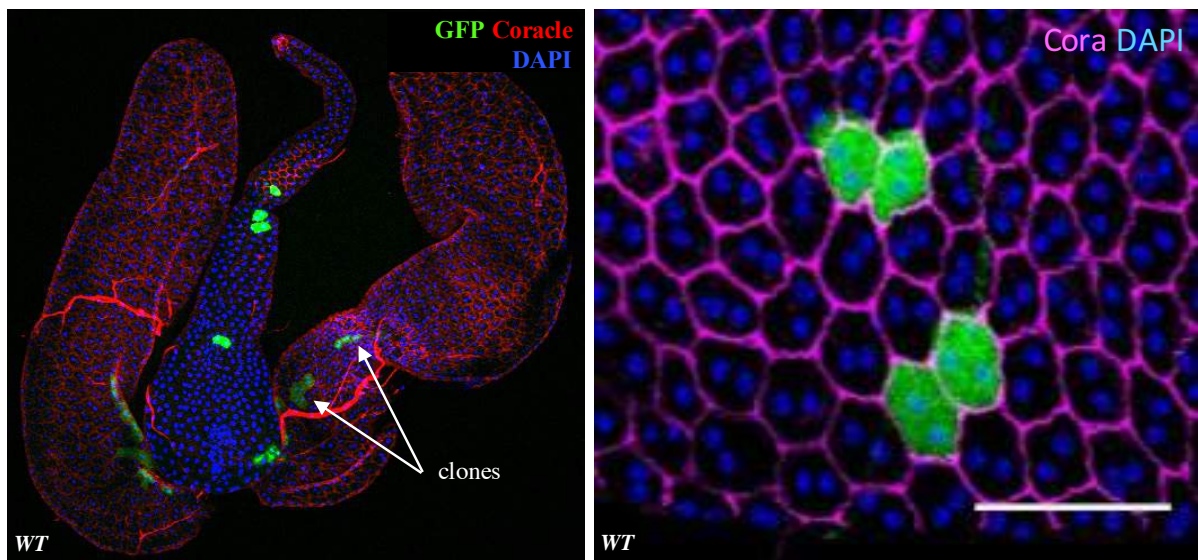


Figure 48 : L'expression clonale chez la drosophile impacte un faible nombre de cellules

Les cellules exprimant la GFP sont peu nombreuses dans l'épithélium. En général, deux cellules adjacentes au maximum sont impactées et sont en contact avec les cellules saines de l'épithélium.

JNK conduit à la phagocytose des cellules altérées par les cellules saines environnantes (Ohsawa et al., 2011). Cela permet le maintien de l'homéostasie du tissu épithélial, par élimination et remplacement des cellules sous-optimales (Johnston, 2014; Morata and Ballesteros-Arias, 2015; Di Gregorio et al., 2016; Merino et al., 2016). A l'inverse, si les cellules surexpriment des oncogènes tels que *Myc* ou si elles ont une suractivation de la voie JAK/STAT et donc une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la survie, cela peut conduire à un phénomène de supercompétition. Dans ce cas, les cellules altérées acquièrent un avantage sélectif et conduisent à l'élimination des cellules adjacentes saines par apoptose. Ce type de dialogue cellulaire est conservé au cours de l'évolution et retrouvé également chez les mammifères au cours du développement embryonnaire mais également dans des tissus adultes (Oliver et al., 2004; Clavería et al., 2013; Sancho et al., 2013). En effet, la transplantation de cellules fœtales de rat dans un foie adulte conduit au remplacement d'hépatocytes et l'induction de l'apoptose dans les cellules voisines (Oertel et al., 2006).

Lors du développement d'un cancer, peu de cellules sont transformées au sein d'un épithélium normal (Garcia et al., 1999). Leur taux de prolifération et de croissance varie consécutivement à des mutations dans des gènes oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Cela sera détecté par les cellules environnantes. Un dialogue va alors se mettre en place entre les cellules tumorales et les cellules adjacentes. Ce dialogue influencera le destin cellulaire. Notre modèle permet de reproduire la formation de groupes de cellules mutantes en contact avec des cellules saines adjacentes et permet ainsi un dialogue entre ces deux types cellulaires. En effet, l'expression de l'oncogène *Ras*^{V12} se fait de manière clonale. La technique d'induction par choc thermique conduisant à son expression a été mise au point afin de n'impacter qu'un faible nombre de cellules adjacentes dans la glande accessoire (les clones « contrôles » étant en général constitués de 2 cellules, et le nombre de cellules clonales représentant environ 1% du total de l'épithélium) (**figure 48**). A l'inverse, les modèles murins sont très majoritairement générés avec des promoteurs spécifiques de tissus. Dans le modèle *Pten*^{-/-}, la délétion de *Pten* est induite dans l'ensemble de l'épithélium prostatique grâce à un promoteur probasine, mais avec une pénétrance variable, non contrôlable par l'expérimentateur (Wang et al., 2003b). Les tumeurs qui s'y forment se trouvent dans un environnement cellulaire présentant lui-même des défauts de croissance (Deng et al., 1996; Garcia et al., 1999; Berns, 2001; Johnson et al., 2001). Le dialogue qui se met en place entre les cellules tumorales et les cellules de l'environnement est donc forcément impacté. Pour pallier ce verrou, certains auteurs ont développé des modèles afin d'étudier les dialogues

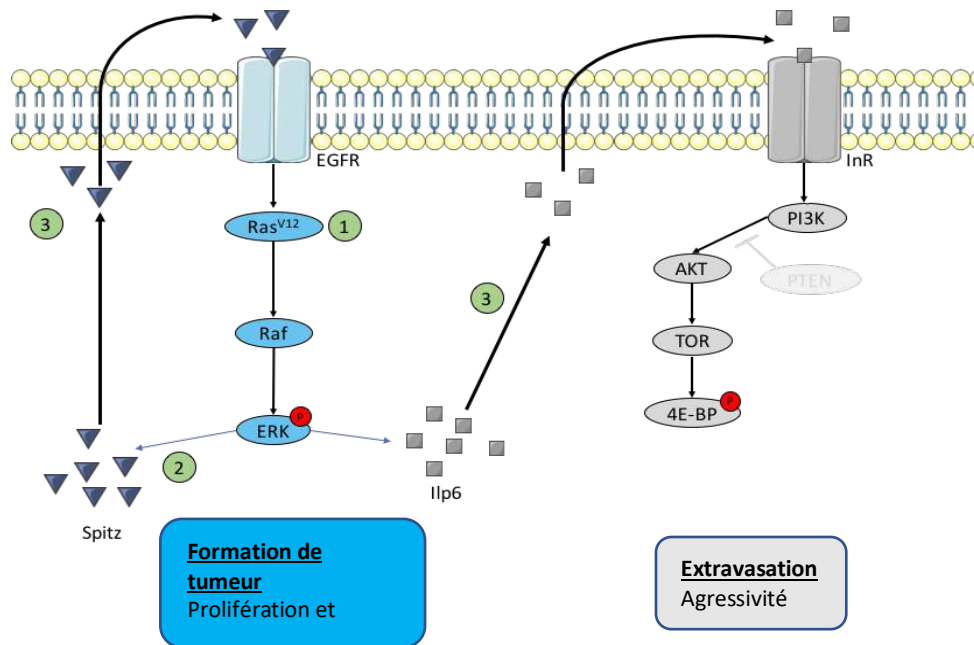


Figure 49 : la mise en place de deux boucles autocrines de régulation permet la tumorigenèse

A. (1) L'expression de *Ras^{V12}* dans les glandes accessoires permet l'activation de la voie RAS/MAPK. Elle permet la production d'effecteurs tels que Spitz (EGFR-like) (2) qui amplifie l'activation de la voie RAS/MAPK; et également de dILP6 (IGF1) (3) qui permet le recrutement de la voie PI3K/AKT/TOR.

compétitifs entre les cellules lors du développement du cancer. Ils s'avèrent complexes à mettre en place (Zhou et al., 2010). En effet, ils impliquent l'injection de cellules ES, modifiées génétiquement en culture, dans l'embryon de souris, afin de produire des souris chimères ayant à la fois des cellules mutantes et sauvages.

Dans notre modèle, les cellules mutantes augmentent la production de leurs propres facteurs de croissance : EGF (Spitz) et IGF1 (dILP6). Cette augmentation peut être le reflet d'une pression de sélection exercée par les cellules du tissu environnant, qui les conduise à augmenter leurs signaux plasiques et trophiques. En cascade, cela conduit à l'amplification autocrine de la signalisation RAS/MAPK (**figure 49**). Cette voie est capable d'augmenter l'activité de MYC en le stabilisant par phosphorylation directe *via* ERK, et en conduisant son inhibiteur MAD1 à la dégradation (Zhu et al., 2008; Tsai et al., 2012). Or, des niveaux d'expression élevés de *Myc* donnent un avantage compétitif aux cellules tumorales (de la Cova et al., 2004; Moreno and Basler, 2004). Ainsi, les cellules acquièrent un avantage prolifératif et ne sont pas éliminées. Cela correspond à un mécanisme de supercompétition. Ayant démontré que l'activation de la voie RAS/MAPK conduit également à la mobilisation de la voie PI3K/AKT/TOR et sachant que MYC est stabilisé suite à l'activation de AKT, ce phénomène de supercompétition pourrait être amplifié au sein de l'épithélium des glandes accessoires (Parisi et al., 2011). Ainsi, il permettrait de sélectionner dans la tumeur, les cellules avec le meilleur pouvoir tumorigénique et de conduire à l'élimination des cellules saines adjacentes. Afin de vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire d'une part de quantifier les niveaux d'accumulation de MYC dans les cellules mutantes et les comparer à ceux des cellules adjacentes et d'autre part d'évaluer le taux d'apoptose dans les cellules non mutantes.

Exploitation des données générées dans la pathologie humaine

Différentes molécules inhibitrices des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR ont été développées pour un objectif thérapeutique et ont été testées chez l'homme dans des essais cliniques de phase 1 et 2. *Sridhar et al.* ont utilisé le lapatinib (W572016), inhibiteur d'activité tyrosine kinase d'EGFR, dans un essai clinique de phase II chez des patients ayant un cancer de la prostate avancé et hormono-dépendant (Sridhar et al., 2010). Alors que dans un modèle simple comme la drosophile, le blocage de la voie par interférence ARN conduit à une absence de développement tumoral, il n'est pas observé de gain significatif sur la survie globale des patients sans progression du cancer dans les résultats obtenus chez l'homme, ce qui traduit une absence d'effet sur le processus tumoral. Le Lapatinib inhibe l'activité tyrosine kinase d'EGFR, mais pas sa localisation membranaire. Il est possible qu'EGFR (ErbB1) soit

encore capable de s'hétérodimériser avec les isoformes ErbB2, ErbB3 ou ErbB4, et d'activer des voies de signalisation en cascade. L'absence de redondance des membres de la famille du récepteur de l'EGF chez la drosophile permet de bloquer la signalisation EGFR de manière globale à l'aide d'ARN interférant. L'utilisation d'inhibiteur pan-ErbB pourrait permettre d'obtenir les mêmes résultats. Une étude très récente conduite *in vitro* appuie cette hypothèse. Elle montre que le Dacomitinib, un inhibiteur pan-ErbB, est capable d'altérer la localisation membranaire des complexes ErbB, et de réduire significativement l'activité des voies qu'ils contrôlent en aval (Jathak et al., 2018).

Dans le cancer de la prostate, la voie PI3K/AKT/TOR joue un rôle primordial, avec principalement la délétion de *Pten* qui conduit à une augmentation de son activation. Cependant, des études cliniques utilisant des inhibiteurs de mTOR (MLN0128), effecteur de la voie, présentent une toxicité importante (Graham et al., 2018). Les doses utilisées lors des essais cliniques ne permettent donc pas d'obtenir des effets significatifs sur la progression tumorale. De plus, des études réalisées concernant l'utilisation de monothérapie suggèrent la mise en place de boucle d'autorégulation conduisant à l'activation d'autres voies de signalisation. Il a été observé une augmentation de l'activité de la voie RAS/MAPK suite à l'inhibition de la voie PI3K/AKT/TOR ou encore une augmentation de la phosphorylation de AKT suite à une inhibition de MEK1/2 (Gioeli et al., 2011; Mendoza et al., 2011; Ricciardi et al., 2012; Turke et al., 2012; Soares et al., 2015). Dans notre modèle l'inhibition de la voie RAS/MAPK par l'expression d'un ARN interférent dirigé contre ERK par exemple, en parallèle de l'expression de Ras^{V12}, conduit à une diminution drastique de la capacité des cellules à former des tumeurs. De même, l'inhibition du recrutement de la voie PI3K/AKT/TOR par l'expression d'ARN interférents dirigés contre TOR ou encore PI3K produit les mêmes effets. Les différences observées dans les modèles drosophiles peuvent refléter une faible redondance fonctionnelle. Afin de pallier cela, des thérapies combinées peuvent être mises en place pour, d'une part augmenter l'efficacité du traitement et d'autre part, pour pouvoir utiliser des doses plus faibles qui présenteront une toxicité moindre. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* montrent une activation synergique d'inhibiteurs des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/TOR (Kinkade et al., 2008b; Park et al., 2015). D'autres combinaisons peuvent être imaginées comme par exemple celle d'un inhibiteur de tyrosine kinase et d'inhibiteurs de BCL2/BCLXL, protéines anti-apoptotiques, qui conduit les cellules prostatiques à l'apoptose (Arai et al., 2018).

Dans notre modèle nous nous plaçons à une étape précoce du développement du cancer de la prostate, avant sa dissémination métastatique, et dans un contexte non traité. Les

différents traitements administrés aux patients entraînent la formation de résistance et donc des modifications importantes des dialogues moléculaires présents dans la cellule. Cela peut expliquer les différences importantes obtenus entre différents modèles cellulaires, entre différents échantillons humains, et également avec les données générées au cours de ma thèse. En effet certains auteurs ont montré que des niveaux élevés de ERK activé dans les tumeurs humaines et associé à un score de Gleason élevé (Gioeli et al., 1999) tandis que d'autres montre un déclin de l'activité ERK avec la progression de la maladie (Paweletz et al., 2001; Malik et al., 2002). Le problème vient une nouvelle fois de la variabilité des échantillons analysés pour les études qui tiennent compte du score de Gleason mais pas du statut clinique du patient. Afin d'en savoir plus sur les interactions pouvant exister dans la pathologie humaine, une banque d'échantillons humains et en cours de création et sera mise à notre disposition. L'avantage majeur de ces échantillons est qu'en plus de leur répartition suivant le grade de la tumeur ; ils pourront également être classés suivant le statut clinique du patient. Nous pourrons ainsi discriminer les patients en rechutes, des patients n'ayant pas encore eu de traitement par exemple.

Annexes



Review

New Insights in Prostate Cancer Development and Tumor Therapy: Modulation of Nuclear Receptors and the Specific Role of Liver X Receptors

Laura Bousset ^{1,2,†}, Amandine Rambur ^{1,2,†}, Allan Fouache ^{1,2,†}, Julio Bunay ^{1,2} ,
Laurent Morel ^{1,2}, Jean-Marc A. Lobaccaro ^{1,2,*} , Silvere Baron ^{1,2,*}, Amalia Trousson ^{1,2,‡}
and Cyrille de Jossineau ^{1,2,‡}

¹ Université Clermont Auvergne, GReD, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, 28, place Henri Dunant, BP38, F63001 Clermont-Ferrand, France; laura.bousset@uca.fr (L.B.); amandine.rambur@uca.fr (A.R.); allanfouache76@gmail.com (A.F.); julio.bunay_noboa@uca.fr (J.B.); laurent.morel@uca.fr (L.M.); amalia.trousson@uca.fr (A.T.); cyrille.de_jossineau@uca.fr (C.d.J.)

² Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 Boulevard Montalembert, F-63009 Clermont-Ferrand, France

* Correspondence: j-marc.lobaccaro@uca.fr (J.-M.A.L.); silvere.baron@uca.fr (S.B.);
Tel.: +33-473-407-416 (J.-M.A.L.); +33-473-407-412 (S.B.);
Fax: +33-473-407-042 (J.-M.A.L.); +33-473-178-387 (S.B.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

Received: 29 June 2018; Accepted: 9 August 2018; Published: 28 August 2018



Abstract: Prostate cancer (PCa) incidence has been dramatically increasing these last years in westernized countries. Though localized PCa is usually treated by radical prostatectomy, androgen deprivation therapy is preferred in locally advanced disease in combination with chemotherapy. Unfortunately, PCa goes into a castration-resistant state in the vast majority of the cases, leading to questions about the molecular mechanisms involving the steroids and their respective nuclear receptors in this relapse. Interestingly, liver X receptors (LXR α /NR1H3 and LXR β /NR1H2) have emerged as new actors in prostate physiology, beyond their historical roles of cholesterol sensors. More importantly LXRs have been proposed to be good pharmacological targets in PCa. This rational has been based on numerous experiments performed in PCa cell lines and genetic animal models pointing out that using selective liver X receptor modulators (SLiMs) could actually be a good complementary therapy in patients with a castration resistant PCa. Hence, this review is focused on the interaction among the androgen receptors (AR/NR3C4), estrogen receptors (ER α /NR3A1 and ER β /NR3A2), and LXRs in prostate homeostasis and their putative pharmacological modulations in parallel to the patients' support.

Keywords: prostate cancer; metastasis; LXRs; androgens; estrogens; cholesterol; oxysterols; signaling pathway

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) rarely appears before the age of 40 years and is diagnosed in men of approximately 70 years old. Already known risk factors include age, family history, ethnicity, and internal steroid hormones levels, whilst there are also emerging carcinogenic factors, including diet, lifestyle, and exposure to xenobiotics. PCa requires androgens for growth, and androgen deprivation has, for decades, been the principal strategy to treating advanced disease. The increased incidence of PCa in many countries has been partly attributed to changes in diagnostic methods. Despite its

controversy, introduction of the prostate-specific antigen (PSA) assay as a screening method during the last decade has led to an increase in incidence. However, this alone does not explain the observed continuing rise. Besides, epidemiological studies have also pointed out that environmental factors could influence PCa risks, even though they are difficult to define [1]. PCa is the paradigm of the endocrine-related tumors, together with breast cancer. Various hormones, mainly steroids and their respective nuclear receptors (NRs), have a prominent role in the development of PCa. Hence, unusual levels of testosterone and dihydrotestosterone (DHT) in prostate tissue are suspected to increase the risk of developing cancer [2], and estrogens are believed to have an important role as well [3,4].

NRs are part of a superfamily encompassing 48 members within humans. As DNA-binding proteins, they can control the transcription of genes whose products are fundamental for important physiological functions (for a review see Evans and Mangelsdorf [5]). Schematically, NRs are composed of three major independent functioning domains (Figure 1): a N-terminal involved in the regulation of the non-ligand dependent transcriptional activity, a central DNA-binding domain, and a C-terminal ligand-binding domain carrying a potential ligand-binding pocket controlling the ligand-dependent transcriptional activation function [6].

The steroid receptors are within the cytoplasm in the absence of a ligand and are bound to heat shock proteins that impede the shuttling to the nucleus (Figure 1).

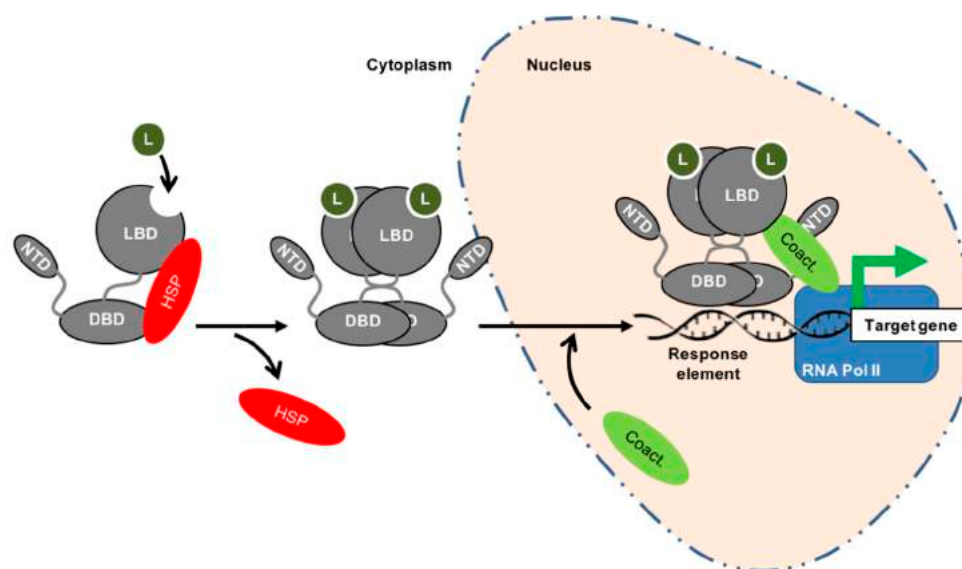


Figure 1. Schematic structure and functioning of steroid receptors. Nuclear receptors are composed of an N-terminal domain (NTD), a DNA-binding domain (DBD) responsible of the binding to the DNA-target sequences usually located within the promoters of the targets genes and a C-terminal ligand-binding domain (LBD), which is specific to the molecule. Canonically, it is admitted that steroid receptors are located within the cytoplasm in the absence of hormone, bound to heat shock proteins (HSP) that impede shuttling to the nucleus. The binding of the steroid (L) allows the chaperones to unbind from the receptor and migrate to the nucleus after a homodimerization. The binding of co-activators (Coact.) makes the recruitment of the transcriptional machinery possible, along with the RNA polymerase II (RNA Pol II), the transcription of the target gene, and the physiological effects.

However, other types of NR, such as the liver X receptors (LXR α /NR1H3 and LXR β /NR1H), function in a heterodimer with retinoid X receptors (RXRs, the receptor for 9-cis retinoic acid, NR2B1-3). In such signaling systems, the heterodimer complex resides bound to DNA in the absence of a ligand, with transcription blocked by the presence of co-repressors (Figure 2).

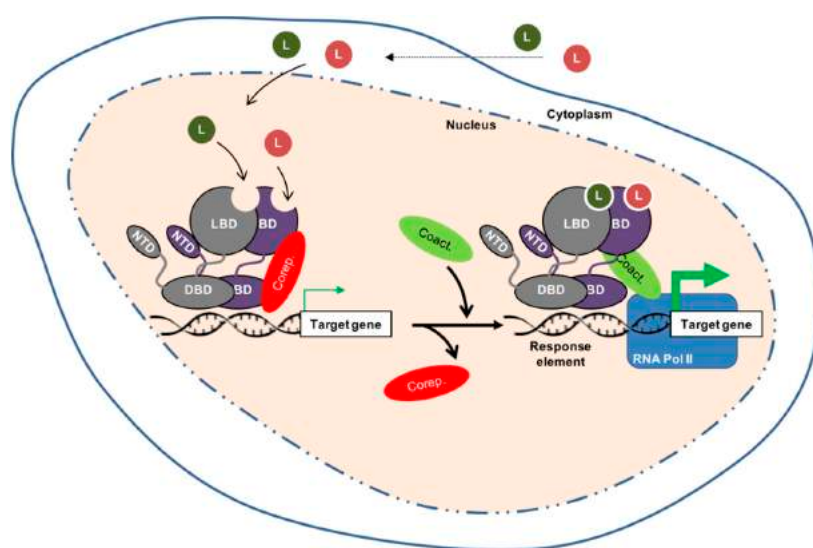


Figure 2. Schematic structure and functioning of nuclear receptors bound as heterodimers with retinoid X receptors (RXR). The non-steroid nuclear receptor (grey) is supposed to be bound with RXRs, a receptor for 9-*cis* retinoic acid (deep purple), to the DNA. In absence of ligand, the transcriptional activity is blocked (thin green arrow) by co-repressors (Corep.). As for the steroid receptors, the binding of co-activators (Coact.) makes possible the recruitment of the transcriptional machinery, along with the RNA polymerase II (RNA Pol II), the transcription of the target gene (thick green arrow), and the physiological effects.

Ligand binding triggers major conformational changes in the receptor's ligand-binding domain which leads to the dissociation of chaperones and/or corepressors, nuclear translocation (when necessary) and DNA-binding, and the recruitment of coactivators. Thus, it initiates gene transcription [7] (Figures 1 and 2). Hence, in the presence of an agonist in the ligand-binding pocket, corepressors dissociate and the recruitment of transcriptional coactivators is favored. Reciprocally, interactions with an antagonist represses association with coactivators and enables corepressor recruitment. The ligand-binding domain may also contribute to the modulation of the N-terminal AF-1 through inter-domain crosstalk, allowing activating domains to recruit coactivators individually or in a synergistic manner [7].

2. Nuclear Receptors Are Fundamental for Prostate Physiology

Androgen [8] and/or estrogen [9] deregulations have been associated with the development of PCa. Their respective NRs are targeted in the treatment of this tumor. Besides these classical steroid NRs, newly considered steroid receptors such as LXR α and LXR β [10] have emerged as interesting players in both prostate homeostasis and carcinogenesis [11–13]. This section will be focused on the androgen (AR/NR3C4), estrogen (ER α /NR3A1 and ER β /NR3A2), and oxysterol (LXRs) receptors, and their putative interactions in maintaining prostate physiology.

2.1. Role of AR in Prostate Physiology and in PCa

Since pioneering work from Higgins and Hodges was published in 1941 [8], it has been well established that androgen regulation signaling is one of the hallmarks of PCa. If testosterone is the principle circulating androgen, the most active androgen in the prostate remains 5 α -dihydrotestosterone (DHT), produced by conversion of testosterone by 5 α -reductase type 2 (SRD5A2), which binds their nuclear receptor with two to ten-fold higher affinity than testosterone [14]. DHT exerts its activity through AR-regulated transcription of genes involved in cell differentiation, development, survival, and function of the prostate in adulthood. Androgens may

also exert rapid, AR-dependent non-genomic effects. In this process, cytoplasmic AR can induce kinase-signaling pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) or phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT, which ultimately influence AR signaling through the phosphorylation of AR itself or AR co-regulators (for a review see [15]). Part of this mechanism could explain therapeutic failures when anti-androgens have no effect on androgen target genes despite AR remaining active.

2.1.1. Androgens Are Involved in Prostate Differentiation, Growth, and Functioning

Various knock-out models for AR have pointed out that the initiation of prostate development needs a functional AR [16], even though a correct organization of the future prostate also involves mesenchymal/epithelial interactions, in which AR is required at the stromal level. Cunha and colleagues [17] showed that AR signaling is needed in the mesenchymal compartment for initiation of prostate development, but not in the epithelial compartment. The stromal cells express AR and secrete peptide growth factors in response to androgen signaling [18,19], which contribute to the prostate differentiation. Binding of these growth factors to their respective receptors on basal cells promotes their proliferation and differentiation first into intermediate cells, then into fully differentiated luminal cells [20]. Conversely, basal cells do not have AR [21,22]. In adulthood, maintenance of the prostate gland depends on the balance of growth-survival/apoptosis driven by androgens, which promote the survival of luminal epithelial cells. In animal models, supra-physiological levels of androgens result in an increase in cellular proliferation in the prostate [23]. Conversely, castration induces apoptosis in about 70% of luminal epithelial cells in adult male rats but has little or no effect on basal and stromal cells [24].

2.1.2. Androgens Drive Proliferation of Luminal Epithelial Cells in PCa

The malignant switch from benign luminal cells to cancerous adenocarcinoma cells is poorly understood, but regardless, AR activity still drives proliferation. This applies both in tumors which are dependent on circulating androgens and in more advanced, castrate resistant disease [25–27]. This signaling pathway pathologically allows androgen/AR complexes to bind to and enhance expression of survival and proliferation genes that are normally not regulated by these complexes in either intermediate cells or luminal cells [25–27]. Using ChIP-on-Chip and ChIP-Seq experiments, research groups have reported thousands of AR direct binding events in PCa cell lines and tissues, furthermore showing different binding patterns depending on the stages of cancer [28–30].

2.2. Role of ER in Prostate Physiology and in PCa

The physiological functions of estrogens in the prostate, other than their activity as antiandrogens, have been unclear for many years. The development of genetic mouse models and their study have helped decipher the role of 17 β -estradiol and its receptors in the prostate. 17 β -estradiol activity is mainly mediated through its specific nuclear receptors, ER α (NR3A1) and ER β (NR3A2) (for a review see Yaşar et al. [31]). As with AR, ERs control transcription via binding to distinct DNA sequences at target genes or through their non-genomic activity. In non-malignant human adult prostate tissue, ER α is mainly expressed in the stromal compartment where it is involved in stromal cell proliferation and differentiation [32], and it can be found in less than 2% of epithelial cells where it drives estrogen-mediation epithelial cell proliferation [33,34]. Conversely ER β is detected in 90% of epithelial cells [35–37], where it promotes cell homeostasis and differentiation [38].

During PCa initiation and progression, stromal ER α expression remains but up to 80% of all epithelial cells show an expression of ER α that rises from 0–2 to 80% in PCa [37]. Inversely, epithelial cells lose ER β , as it drops from 90 to 15% of cells in PCa [35,39,40]. Finally, the TRAMP and PB-Cre4/*Pten*^{loxP} PCa mouse models have helped to understand the respective opposite roles of both ERs, along with the significance of this change that is seen in PCa. While epithelial ER α is thought to be responsible of estrogen-mediated PCa growth, epithelial ER β is believed to have protective roles [41].

Epidemiological data have shown controversial results regarding the role of circulating estrogens. Local steroid production by prostate tumors, rather than circulating steroids, may play a major role in

driving PCa growth in men following androgen deprivation therapy [42]. While current research on the role of intracrine steroids focuses on intratumoral androgens, it is important to note that aromatase (CYP19A1), which catalyzes estradiol production from testosterone, is also altered in PCa tissues [43] and CYP19A1 expression could be 30-fold higher than normal in PCa metastatic tissues [44].

2.3. LXRs as Emerging Factors Regulating Prostate Physiology

LXR α and LXR β , encoded by two distinct genes, are composed of 447 and 460 amino acids, respectively (for a review see [10,45]). They cannot be formally considered as true isoforms; however, they share 77% of their identity within their DNA- and ligand-binding domains. Initially described as orphan receptors, Mangelsdorf's group demonstrated more than 20 years ago that LXRs were actually the receptors for oxysterols, oxidized derivatives of cholesterol [46,47]. Because oxysterols were described as bona fide ligands, it was suspected that LXRs could be involved in the regulation of cholesterol metabolism. Indeed, this was further demonstrated by the phenotype analysis of LXR-deficient mice [48]. Hence, the activation of both LXRs by their cognate oxysterol ligands reduces the intracellular concentration of cholesterol. This occurs through several means: (1) the increase of the cholesterol efflux via the transcription of *ABCG1* and *ABCA1*, two membrane transporters and target of LXRs; (2) the inhibition of the cholesterol influx by increasing the ubiquitin ligase inducible degrader of the LDL receptor (IDOL), which targets the LDL receptor; (3) the increase of cholesterol metabolism into bile acids (induction of CYP7A1) or steroids (induction of StAR); and (4) the increase of cholesterol storage.

In the prostate, we and others have explored the physiologic role of LXRs. Both isoforms are expressed in the prostate, in epithelial as well as in stromal cells. However, so far, it has not been possible to dissociate the exact role of each LXR isoform as they both compensate each other [49]. Fukuchi et al. first pointed out that *ABCA1* was downregulated by AR in LNCaP cells [50]. Furthermore, the same group showed that the activation of LXRs by the synthetic agonist T0901317 slows down LNCaP proliferation [51], suggesting a role of LXRs in the progression of CaP, or at least showing that these receptors could be pharmacologically targeted. LXRs and some of their target genes were found to be less accumulated during the progression of the androgen-dependent into androgen-independent relapsed tumors in a xenograft model [52].

The role of LXRs in the control of the apoptosis of prostate cells was also shown using various natural or synthetic ligands [11]; this occurs through the modulation of the membrane cholesterol content associated with the lipid rafts, thus decreasing the PI3K and survival pathways. Using new cellular models derived from the dorsal prostate, we showed that LXRs control both protein kinase B (or AKT) and MAPK phosphorylation pathways in a normal prostate's cell cycle [12]. This point is of importance as the Ras/MAPK pathway is essential to maintaining cellular homeostasis because of its implication in cell proliferation and differentiation. Additionally, this pathway is the second major signaling pathway whose deregulation has been associated to prostate tumorigenesis: it has been found up-regulated in 43% of primary tumors and in the greatest majority of metastases [53]. Furthermore, the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), which is able to inhibit p42/p44 MAPK signaling [54] and the proliferation and migratory ability of cancer cells, is upregulated upon LXR activation [55,56]. Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) and Wntless/Integrated (Wnt) pathways could also be deregulated in PCa [53]. Interestingly, LXR activation represses the JAK/STAT signaling pathway in the liver and decreases β -catenin accumulation, a crucial mediator of the Wnt pathway [57].

In parallel, our group pointed out that LXR-deficient mice fed with a high cholesterol diet presented a neoplasia within the prostate epithelium, characterized by the downregulation of the tumor suppressor Homeobox protein NKX3.1 and beta-microseminoprotein MSMB and the upregulation of pro-oncogenic factors such as CyclinD1 and CyclinD2 [58]. This was definitively due to the accumulation of the oncogene and histone methyl transferase enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), whose overexpression has been described in patients with an aggressive PCa [59]. The question

regarding any expression change with cancer progression is unclear. Indeed, Oncomine[®] analysis did not show any difference for LXR α , while a slight significant difference was observed for LXR β [58].

Altogether, ex vivo and in vivo studies suggest that LXRs could be implicated in the progression of PCa and, thus, could represent a pharmacological target for its treatment (Figure 3).

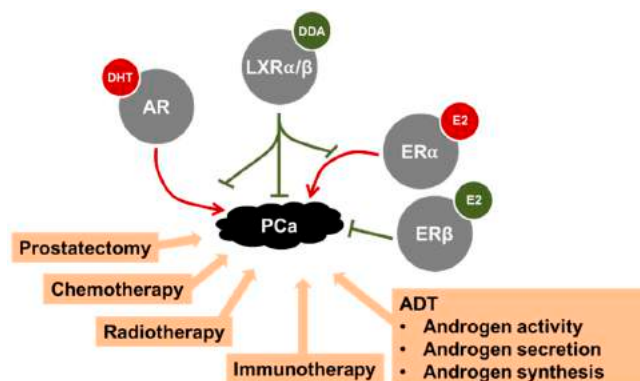


Figure 3. Summary of the various treatments proposed to treat PCa. A focus is made on some nuclear receptors. The androgen (AR) and estrogen receptor (ER) α have deleterious effects on prostate cancer (PCa) progression when activated by their respective ligands dihydrotestosterone (DHT) and 17 β -estradiol (E2). Conversely, nuclear oxysterol receptors (LXR α/β) and ER β block the progression of PCa in animal models when activated by their respective ligands. As indicated, AR and ER α activity in PCa could be modulated by LXRs, directly or indirectly. For more details see the text. DDA: dendrogenin A.

2.4. Androgens, Estrogens, and Oxysterols Interact in the Prostate

Despite their specific respective physiological roles on prostate physiology (see above sections), androgens, estrogens, and oxysterols cross interact through the transcriptional activation of their respective NRs.

2.4.1. LXRs Regulate the Availability of Active Steroids

As described above, prostate homeostasis is sensitive to steroids such as androgens and estrogens. All of these molecules derive from cholesterol. Regarding the binding to their respective receptors, the availability of androgens [60] and estrogens can be modulated by sulfotransferases, which inactivate the steroid activity [61]. Previous work has reported that sulfotransferase family 2A member 1 (SULT2A1) deactivating androgens is a LXR-target gene [62]. Indeed, ligand activated LXRs deprive cells from androgens through the increase of SULT2A1. Conversely, LXRs inhibit the expression of steroid sulfatase STS, an enzyme involved in the activation of androgens in prostate [63]. The level of active estrogens is also dependent of the levels of the estrogen sulfotransferase EST/SULT1E1. As for androgens, sulfated estrogens cannot bind to and activate ER activities [64].

2.4.2. AR, ER, and LXR Interaction within the Prostate

PC-3 AR-negative cells display a higher accumulation of LXR target genes [65], such as *ABCA1* and *ABCG1* [13,50,52]. A similar accumulation is also seen mouse models and in patients receiving androgen deprivation therapy [66]. Benign prostatic hyperplasia is a pathological situation due to an excessive activity of AR and the production of DHT [67]. Using transgenic animals, we [49] and others [68] described LXR α as a key modulator of the cross talk between the stromal and epithelial compartments, which is essential for the integration of androgen signaling in the prostate and its effect on the epithelium. We pointed out that LXR α -deficient mice have increased secretory activity in the epithelium resulting from a deregulation of the androgen signaling. No clear specific role

was identified for LXRs between the epithelial and the stromal compartments, suggesting a complex paracrine network regulated by these receptors [49]. Likewise, Tsui et al. [69] pointed out that LXR expression was higher in androgen-sensitive LNCaP cells than in other PCa cell lines, and activating LXRs by T0901317 in LNCaP cells decreases their AR accumulation and PSA production. Overall, AR and LXRs are definitively interconnected. Even it is not fully demonstrated for the prostate, it has also been shown that ERs down-regulate *LXRα* mRNA in mouse macrophages [70,71], through an estrogen response element in the *LXRα* promoter [70], suggesting a putative interaction between these two classes of receptors.

2.5. NR Activity Can Be Altered in Prostate Physiology by Environmental Disrupting Chemicals

Cholesterol-derived molecules are not the only ones that are able to modulate AR, ER, and LXR transcriptional activity (Figure 3). Indeed, environmental disrupting chemicals (EDCs) (reviewed in Delfosse et al. [72]) affect physiology in various ways by mimicking natural endogenous molecule activity, antagonizing their action, or modifying the synthesis, metabolism, and transport of these endogenous compounds. Due to their estrogen-like structure, the main harmful effects of EDCs have been attributed to their interference with hormone signaling mediated by NRs [72]. Hence, the physiologic roles controlled by the targeted NRs are altered. Historically, studies were focused on ERα and ERβ, AR, and thyroid receptors TRα (NR1A1) and TRβ (NR1A2). Then, because disorders of metabolic pathways have been associated to a higher risk of developing PCa, NRs controlling these processes have been the center of interest. Among them, peroxisome proliferator activated receptors (PPARγ/NR1C3), rexinoid receptors (RXRs/NR2B1-3), and LXRα and β/NR1H3 and 2 are abundantly studied due to their potential to be pharmacologically targeted (for a review on LXRs please refer to Maqdasy et al. [10]).

3. Lipid Metabolism, Angiogenesis and Immunity Are Altered in PCa

As for other cancers, prostate tumorigenesis is a multifactorial process that depends on cell modifications to allow for proliferation and growth. For that purpose, tumor cells usually (1) adapt their metabolism to produce enough cell components [73] and (2) induce molecular modifications to escape from cell cycle control.

3.1. Lipid and Cholesterol Metabolism in Cancer Cells

Among the numerous metabolic alterations that fuel cells and allow for the increased rate of growth and proliferation in cancer cells, the Warburg effect is a metabolic switch where cancer cells reprogram their glucose metabolism for “aerobic glycolysis”, a process usually favored in anaerobic conditions [74]. Another example of an adaptation is citrate and fatty acid production. While citrate, necessary for secretion in prostatic fluid, is produced in large amount, it is used as a substrate for de novo fatty acid synthesis [75], which is found to be increased in PCa development [76].

A deregulation in cholesterol homeostasis has also long been associated to PCa [77,78]. Indeed, White described an “accumulation of crystals of lipid nature in tumors” suggesting that “cholesterol might be associated in some way with the regulation of cell proliferation” [78]. Interestingly this suspicion was later confirmed by Swyer who identified a two-fold increase of cholesterol content when prostates were affected by a hypertrophy [77]. More recently and using imaging data, prostate cancer aggressiveness has been associated with an aberrant accumulation of esterified cholesterol in lipid droplets [79]. However, no clear link has been made between cholesterolemia and Gleason score, positive nodal status, and/or positive surgical margins [80]. Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) is the key enzyme in endogenous de novo cholesterol synthesis and is inhibited by statins. Interestingly, the use of statin by patients suffering a hypercholesterolemia has been associated with improved PCa specific survival, particularly in men undergoing radiotherapy [81].

Additionally, and as presented above, LXRs increase the apoptosis of PCa cell lines by modifying the membrane distribution of cholesterol. Indeed, we pointed out that activated LXRs by various

natural or synthetic ligands could induce smaller and thinner lipid rafts and downregulate AKT phosphorylation in these lipid rafts [13]. LXRs also regulate the first step of prostate carcinogenesis since, as previously presented, LXR-deficient mice fed a high cholesterol diet have prostatic intra-epithelial neoplasia while wild-type mice do not. This indicates that LXRs could act as gatekeepers against PCa when cholesterol homeostasis tends to be destabilized.

Conversely, AR and androgens have been implicated in the increase of the intracellular concentration of cholesterol in PCa cells by inducing the accumulation of HMGCoA and transcription factor sterol response element binding protein (SREBP2), which increases cholesterol de novo synthesis, and by decreasing the amount of ABCA1 [82]. AR also decreases LXR activation in PCa by competing for their coactivators. For a review regarding the interaction between AR and LXRs refer to Cariello et al. [83].

Besides an increased endogenous synthesis of lipids, environmental factors such as food intake play a critical role in cancer development. Hence, it has been considered that food intake could represent the principal source of cholesterol [84]. It is thus not surprising that an enriched lipid diet could be described as a risk factor for developing PCa [85]. A similar positive association with a higher risk of developing PCa has been found for the consumption of products of animal origin [86].

3.2. Modification of Angiogenesis and Immunity

Immune system dysregulation is another feature of cancer development. Some studies show an interesting correlation between recurrent prostatitis and PCa, suggesting the importance of the immune system in prostate carcinogenesis [87]. Indeed, systemic and in situ inflammation could be observed in the tumor and stromal microenvironment. This inflammation is suspected to contribute to the tumor development by the supply of bioactive molecules, such as growth factors produced by the microenvironment immune cells. PCa has also been associated with the accumulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) [88]. Cyclooxygenase (COX) 2, a pro-inflammatory enzyme synthesizing iNOS is highly expressed in tumor-associated macrophages [89]. In the same way, IL6 is highly expressed in PCa and promotes tumor growth at least in part via PI3K/AKT signaling activation [90,91]. Noteworthy, LXRs downregulate inflammation by the parallel inhibition of iNOS, COX2, and IL6 expression [92,93]. Moreover, LXR activation is able to stimulate an antitumor immune response by promoting the secretion of IFN γ by macrophages and T-cells, a phenomenon that has been associated with an increase in survival of mice injected with lung carcinoma cells [94].

Tumor expansion depends on the availability of nutrients and oxygen and the ability to eliminate the waste produced by the high metabolism of the tumor cells. To avoid the microenvironment becoming hypoxic and poor in nutrients, cancer cells favor angiogenesis by increasing the production of vascular endothelial growth factor (VEGF). In PCa cells, VEGF is highly expressed. Moreover it has been shown that LXRs are able to decrease VEGF signaling by modifying the distribution of cholesterol at the membrane [95,96]. Logically, synthetic LXR agonist T0901317 blocks migration of endothelial cells and vessel tube formation [97].

Altogether, modulation of cholesterol homeostasis has a strong effect both on inflammation and angiogenesis within the prostate, two steps that are important for the progression of PCa to an advanced form of disease. Hence, the fact that identified metabolisms are altered during tumor development and metastasis process allows for the future possibility of using inhibitors of lipid synthesis, inflammation, and/or angiogenesis in patients with PCa.

4. Management of Prostate Cancer and Treatments

Even though this review is focused on the NRs in PCa, it is important to have a clear overview of the various management strategies as, according to what was described in the previous sections, anti-steroid therapy or novel molecules targeting LXRs could be applied depending on the stage of PC. Hence, medical care of the patients is based on whether the tumor is localized, if it is advanced, metastasized, or resistant to castration. Apart from classical treatments such as radio- or chemotherapy, specific strategies have been developed to target steroid production and have shown some efficacy.

Still, new strategies are to be developed to increase treatment efficacy. The treatments could also be combined in order to increase their efficacy.

4.1. Local PCa

Less than 5–10% of patients with low-grade, low-volume tumors will develop a PCa in the 10 years following diagnosis [98]. Based on the usually late age of diagnosis (usually above 70 years of age), deferred treatment and active surveillance are proposed to patients in order to prevent over-treatment that reduces mortality while decreasing the quality of life. About 80% of men with PCa have a localized disease [99]. For localized or locally advanced disease, the choice of treatment will be depending on the risk of progression of the tumor, life expectancy, and patient wishes. According to the European Association of Urology guidelines, radical prostatectomy is usually proposed to patients with low to high-risk PCa since they have a life expectancy >10 years. Radiation therapy is a suitable option for low-risk PCa and should be used in combination with androgen deprivation therapy (ADT) for intermediate/high-risk localized and locally advanced PCa.

4.2. Advanced and Metastatic PCa

Median survival for a patient newly diagnosed with metastatic PCa (about 5%) is at least 42 months. However, this is largely heterogeneous [100], and the first line standard approach for patient with advanced PCa is ADT [101]. Three main pharmacological treatments are proposed to block androgen effects. The first is treatment with LHRH ligands [102]. On one hand, agonists (mainly goserelin leuproline, and triptorelin) are able to downregulate the LHRH receptor, resulting in a huge decrease of LH/FSH secretions and testosterone production. On the other hand, LHRH antagonists (abarelix and degarelix) directly block the LHRL receptor and also result in the shut-down of testosterone production. The second treatment is the blockade of androgen synthesis. CYP17, the limiting enzyme for the production of androgens, is upregulated in CRPC [44] and can be inhibited by abiraterone treatment [103]. Ketoconazole has also been shown to block the adrenal steroidogenesis. This metabolic pathway is important as HSD3B1, which converts DHEA to androstenedione in prostate tissue as well as in the adrenal gland, is sometimes found highly expressed in PCa [104]. Likewise, AKR1C3, which converts weak adrenal androgens (e.g., DHEA and androstenedione) into T and DHT, is a good pharmacological target [105]. The third treatment is antiandrogens to antagonize AR and androgen action. These compounds could have either a steroid structure as cyproterone acetate or a non-steroid backbone, such as bicalutamide, flutamide, or nilutamide. Enzalutamide, also a non-steroidal antiandrogen, prevents AR nuclear translocation and has a higher affinity for AR than the widely used bicalutamide [106].

Together with ADT, chemotherapy may be performed. Recent clinical trials and meta-analyses show a 9% improved benefit on overall survival at four years of using docetaxel chemotherapy in combination with ADT for metastatic hormone-sensitive PCa [100].

4.3. Castration Resistant Prostate Cancer

Most patients experience tumor growth recovery despite being on ADT within a median of 18 to 24 months [107] and progress to a lethal stage called castration-resistant PCa (CRPC). The emergence of this aggressive form of PCa is diagnosed when blood PSA increases despite a low serum testosterone, followed by a progression of the disease with the appearance of new symptoms and bone or soft tissue lesions [108]. About 33% of men with a rise of PSA level will develop bone metastasis within two years [109], even though patients with CRPC are highly heterogeneous. Various genetic alterations have been associated to this CRPC, such as alterations in PI3K or in Wnt pathways and in the cell cycle or DNA repair processes [110].

However, AR pathway harbors the main alterations. Five general mechanisms are usually described to explain the emergence of CRPC. The first is the overexpression of the protein AR [111,112], even though AR expression is lost in a subset of metastatic CRPC (mCRPC) [113] and the mechanisms

associated to this complete androgen independence remain unclear. The second are the mutations of AR [114], which could induce a hypersensitivity to low levels of androgens, an antagonist-to-agonist switch for antiandrogens, or a receptor able to respond to non-canonical agonists like non-androgen steroids. The third is the upregulation of AR coactivators such as ARA70, which plays an important role in the antiandrogen antagonist-to-agonist switch in the DU145 PCa cell line [115], the forkhead box protein (FOXA1) [116], immunoglobulin transcription factor (ITF2), steroid receptor coactivator (SRC1) [117], lysine methyltransferase (EZH2) [118], and aldo-keto-reductase (AKR1C3) [119]. Conversely to breast cancer, no downregulation of co-repressors has been reported so far. The fourth is the activation of AR by tyrosine-kinase receptors linking the androgen regulated pathway with the growth factor signaling pathways. Hence, insulin like growth factor (IGF-1), keratin growth factor (KGF), and epidermal growth factor (EGF) can activate AR in vitro in the absence of a ligand [120]. Likewise, receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (Her-2/neu) overexpression has been observed in 67% of CRPC tissue versus 20% of hormone-naïve tissue [121,122] and participates in the activation of AR in absence of androgen through MAPK signaling [123]. Her-2/neu activation also increases AR stability [124]. The fifth is the intratumoral synthesis of active androgens. The primary source of androgens for the tumor cells are the testes, even though the adrenal glands [125] could, to a less extent, provide inactive androgens that are transformed into active hormones (5–10%). Additionally, as described above, some tumors synthesize their own active androgens by the abnormal production of cytochrome CYP17A1 and AKR1C3 or a higher activity of SRD5A1/3, which allows for the conversion of testosterone into DHT [126].

4.4. New Therapeutic Strategies for PCa Beside Steroids and NRs

For few years, therapeutic strategies have attempted to reduce overtreatment of metastatic CRPC (mCRPC) patients, which only offers little benefits to life expectancy while having a negative effect on quality of life. One strategy to prevent over-diagnosis of PCa has been to limit systematic PSA screening. However, metastatic PCa has been increasing in the USA. As PCa mortality is due to the progression of the disease, the new challenge for physicians and researchers is to propose new options to treat advanced and metastatic forms of PCa.

Chemotherapy with cabazitaxel, a novel taxane-derivate drug, is now a second-line option for docetaxel-resistant cancer. A TROPIC phase III clinical trial demonstrated an overall survival benefit of cabazitaxel (15.1 months) versus mitoxantrone (12.7 months) in docetaxel-resistant CRPC [127].

As PCa preferentially metastasizes in bone (90%) and primarily forms osteoblastic lesions [128], these metastases are incurable and contribute to tumor-specific morbidity and mortality [129]. Hence, radium 223, which is a radiopharmaceutical molecule, similar to calcium, improves overall survival by binding to newly formed bone and emitting radiation to induce apoptosis in the surrounding tumor cells [130]. Bisphosphonates slow down bone resorption and prevent loss of bone mass by binding hydroxyapatite and inhibiting osteoclast activity. Among them, zoledronic acid shows a delay in the emergence of skeletal-related events by 36% [131]. Targeting the bone microenvironment can also reduce skeletal-related events. Denosumab is a monoclonal antibody, which binds to receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) ligand, interfering with the activation of RANK at the surface of osteoclasts and thus inhibiting their proliferation, function, and survival while decreasing bone resorption. This molecule delays the time of apparition of first bone metastasis for about four months [132].

Cancer therapy is now facing the new era of immunotherapy. Recently, focus was made on immunotherapy of PCa since sipuleucel-T demonstrated significant, even limited, benefit on overall survival in a clinical trial on asymptomatic or little symptomatic mCRPC patients [133].

Even in CRPC, AR remains active and PCa cells are sensitive to a second-line of ADT. For CRPC patients, specific drugs have been developed such as abiraterone acetate and enzalutamide (see above).

Unfortunately, initial responders to second generation ADT inevitably become resistant to enzalutamide and abiraterone, and others develop acquired resistance [134]. So, for the last few

years, research has been focused on the comprehension of the molecular mechanisms inducing these resistances [134].

The discovery of new mechanisms of resistance will allow for the deciphering of new molecular pathways and encourage the development of future molecules, such as the currently under trial apalutamide (ARN-509, Janssen, Horsham, PA, USA), darolutamide (ODM-201, Orion, Espoo, Finland), proxalutamide (GT0918, Suzhou Kintor Pharmaceuticals, Suzhou, China), seviteronel (Viamet Pharmaceuticals, Research Triangle Park, NC/Innocrin Pharmaceuticals, Durham, NC, USA), ASN001 (Asana Biosciences, Lawrenceville, NJ, USA), and TRC253 (Janssen).

Recent results suggest that oxysterols and LXRs have a protective role against progression and dissemination of tumor cells. Indeed 27-hydroxycholesterol, a LXR ligand, reduces the invasive potential of LNCaP and PC3 PCa cells in in vitro cell invasion assays [135]. Pencheva and colleagues demonstrated in a melanoma model that treatment with an LXR agonist affected secretion of APOE by stromal cells resulted in a decrease in tumor growth, neoangiogenesis, and metastatic dissemination [136]. Likewise, Segala et al. pointed out that dendrogenin A, a newly discovered cholesterol metabolite and activator of LXRs, is able to specifically induce lethal autophagy of cancer cells in vitro and in vivo [137].

5. Conclusions

As already presented, cholesterol is an important molecule whose concentration needs to be controlled in prostate physiology. Since cholesterol is associated with the aggressiveness of prostate adenocarcinoma, targeting its metabolism appears to be an interesting theoretical therapy. Two pathways can be targeted: the mevalonate pathway, which is inhibited by the statins, and the LXR signaling pathway, which could be activated to tighten the control of cholesterol homeostasis. The modulation of both pathways will have a hypocholesterolemic effect.

Various epidemiological studies and meta-analyses have shown that the use of statins reduces the risk of PCa mortality [138] and, more importantly, decreases the risks associated with the development of advanced PCa [139] to present aggressive pathological features in histological analysis of prostatectomy specimens [140] or to develop distant metastasis in patients who were diagnosed with non-metastatic PCa [141]. A decrease in the time of response to ADT has also been reported in patients with hypercholesterolemia. Conversely, statins delay the emergence of CRPC in ADT treated patients [142]. However, it should be kept in mind that statins have numerous side effects.

Since the primary use of statins in PCa therapy is still controversial, the development of new selective liver X receptor modulators (SLiMs, [143]) is theoretically a good option to regulate the intra-prostatic levels of cholesterol. These tissue-specific LXR agonists would modulate intracellular levels of cholesterol in prostate tissue, be specific for each LXR isoform, and prevent any highly adverse side effect. Such a specific SLiM, GW6340, has already been developed. It promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo and thus exerts an anti-atherogenic effect without side effects linked to hepatic LXRs activation like elevated plasma triglycerides [144]. As LXR α seems to be the isoform responsible for the hepatic adverse effects observed upon pan-LXRs activation, the development of LXR β isoform-specific agonists actually mobilizes intense efforts from researchers. Currently, many molecules are under development [145]. Recently, BMS-852927, a novel partial LXR β -selective compound, was successfully tested in healthy human volunteers in a phase 1 ascending-dose study [146]. This study reported an increase in plasma and hepatic lipids and a decrease in circulating neutrophils in mice that was not observed in monkeys. These findings highlight the greatest difficulty in drug discovery to predict clinical responses in animal models. To date, RGX-104, a LXR β -selective agonist, is currently being tested in patients with advanced solid malignancies and lymphoma (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02922764). Expected effects of this molecule are a stimulation of antitumor immunity and an inhibitory action on angiogenesis. Likewise, Segala et al. showed that dendrogenin A is a natural specific activator of LXR usable in the treatment of cancers [137].

As the development of selective LXR agonists and in vitro/in vivo test is ongoing, the safe and effective use of SLiMs appears to will be promising notably for prostate cancer treatment, as well as other steroid-dependent tumors. Given the heterogeneity of the mechanisms of emergence of castration-resistance, the focus of interest should be combinatorial treatment in cancer therapeutic. SLiMs may be used in combination with current standard of care for the treatment of advanced PCa/mCRPC, like ADT, chemotherapy, or immunotherapy to potentiate their effects or to target multiple cancer-associated pathways and to reduce the risk of resistance development overall. Another benefit of combinatorial therapy is to diminish doses of administrated drugs and, likewise, to reduce deleterious side effect. In a xenograft mouse model of melanoma, combining LXR agonist treatment to frontline chemotherapy (dacarbazine) has shown a synergistic effect in reducing tumor growth [136]. This seems to be a direction for the future.

Funding: Funding was provided by the Région Auvergne-Rhône-Alpes, Fond Européen de Développement Régional (FEDER), Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques (ARTP), Fondation ARC, Ligue contre le Cancer, and AAP Plan Cancer Environnement 2016 for SB-JMAL lab. The funders had no role in data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We are deeply grateful to James Wilmouth (GReD Lab) for his help in editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ABCA1/G1	ATP-binding cassette A1/G1
ADT	androgen deprivation therapy
AF1/2	activating function 1/2
AR	androgen receptor
COX2	cyclooxygenase 2
DHT	dihydrotestosterone
CRPC	castration-resistant prostate cancer
mCRPC	metastatic CRPC
ER	estrogen receptor
EST	estrogen sulfotransferase
EZH2	enhancer of Zeste homolog 2
Her-2/neu	receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
HMGCR	hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
IDOL	inducible degrader of the LDL receptor
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
LDLR	LDL receptor
LXR	liver X receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MSMB	beta-microseminoprotein
NKX3.1	homeobox protein Nkx-3.1
NR	nuclear receptor
PCa	prostate cancer
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PSA	prostate specific antigen
RXR	retinoid X receptor
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
SR5A2	5 α -reductase type 2
SREBP	sterol response element binding protein
SLiMs	selective liver X receptor modulators
SULT2A1	sulfotransferase family 2A member 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless/Integrated

References

1. Bostwick, D.G.; Burke, H.B.; Djakiew, D.; Euling, S.; Ho, S.; Landolph, J.; Morrison, H.; Sonawane, B.; Shifflett, T.; Waters, D.J.; et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **2004**, *101*, 2371–2490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hsing, A.W.; Chu, L.W.; Stanczyk, F.Z. Androgen and prostate cancer: Is the hypothesis dead? *Cancer Epidemiol. Biomark.* **2008**, *17*, 2525–2530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Härkönen, P.L.; Mäkelä, S.I. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *92*, 297–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Prins, G.S.; Korach, K.S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* **2008**, *73*, 233–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, *157*, 255–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. McKenna, N.J. Research Resources for Nuclear Receptor Signaling Pathways. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *90*, 153–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Helsen, C.; Claessens, F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *382*, 97–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Huggins, C.; Hodges, C.V. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res.* **1941**, *1*, 293–297. [[CrossRef](#)]
9. Bonkhoff, H. Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *Prostate* **2018**, *78*, 2–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Maqdasy, S.; Trousson, A.; Tauveron, I.; Volle, D.H.; Baron, S.; Lobaccaro, J.-M.A. Once and for all, LXR α and LXR β are gatekeepers of the endocrine system. *Mol. Aspects Med.* **2016**, *49*, 31–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. De Boussac, H.; Pommier, A.J.; Dufour, J.; Trousson, A.; Caira, F.; Volle, D.H.; Baron, S.; Lobaccaro, J.-M.A. LXR, prostate cancer and cholesterol: The Good, the Bad and the Ugly. *Am. J. Cancer Res.* **2013**, *3*, 58–69. [[PubMed](#)]
12. Dufour, J.; Pommier, A.; Alves, G.; de Boussac, H.; Lours-Calet, C.; Volle, D.H.; Lobaccaro, J.-M.A.; Baron, S. Lack of Liver X Receptors Leads to Cell Proliferation in a Model of Mouse Dorsal Prostate Epithelial Cell. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pommier, A.J.C.; Alves, G.; Viennois, E.; Bernard, S.; Communal, Y.; Sion, B.; Marceau, G.; Damon, C.; Mouzat, K.; Caira, F.; et al. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* **2010**, *29*, 2712–2723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Abdelgadir, S.E.; Connolly, P.B.; Resko, J.A. Androgen binding in peripheral tissues of fetal rhesus macaques: Effects of androgen metabolism in liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *37*, 545–551. [[CrossRef](#)]
15. Heinlein, C.A.; Chang, C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 2181–2187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yeh, S.; Tsai, M.-Y.; Xu, Q.; Mu, X.-M.; Lardy, H.; Huang, K.-E.; Lin, H.; Yeh, S.-D.; Altuwaijri, S.; Zhou, X.; et al. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13498–13503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cunha, G.R. The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat. Rec.* **1973**, *175*, 87–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lu, W.; Luo, Y.; Kan, M.; McKeenan, W.L. Fibroblast Growth Factor-10 A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12827–12834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Planz, B.; Aretz, H.T.; Wang, Q.; Tabatabaei, S.; Kirley, S.D.; Lin, C.W.; McDougal, W.S. Immunolocalization of the keratinocyte growth factor in benign and neoplastic human prostate and its relation to androgen receptor. *Prostate* **1999**, *41*, 233–242. [[CrossRef](#)]
20. Wikström, P.; Westin, P.; Stattin, P.; Damber, J.E.; Bergh, A. Early castration-induced upregulation of transforming growth factor beta1 and its receptors is associated with tumor cell apoptosis and a major decline in serum prostate-specific antigen in prostate cancer patients. *Prostate* **1999**, *38*, 268–277. [[CrossRef](#)]

21. Bonkhoff, H.; Remberger, K. Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol.* **1993**, *422*, 35–38. [[CrossRef](#)]
22. Mirosevich, J.; Bentel, J.M.; Zeps, N.; Redmond, S.L.; D'Antuono, M.F.; Dawkins, H.J. Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *J. Endocrinol.* **1999**, *162*, 341–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Berry, S.J.; Isaacs, J.T. Comparative Aspects of Prostatic Growth and Androgen Metabolism with Aging in the Dog Versus the Rat. *Endocrinology* **1984**, *114*, 511–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. English, H.F.; Kyprianou, N.; Isaacs, J.T. Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* **1989**, *15*, 233–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gao, J.; Isaacs, J.T. Development of an androgen receptor-null model for identifying the initiation site for androgen stimulation of proliferation and suppression of programmed (apoptotic) death of PC-82 human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3299–3306. [[PubMed](#)]
26. Gao, J.; Arnold, J.T.; Isaacs, J.T. Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5038–5044. [[PubMed](#)]
27. Memarzadeh, S.; Cai, H.; Janzen, D.M.; Xin, L.; Lukacs, R.; Riedinger, M.; Zong, Y.; DeGendt, K.; Verhoeven, G.; Huang, J.; et al. Role of autonomous androgen receptor signaling in prostate cancer initiation is dichotomous and depends on the oncogenic signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7962–7967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Massie, C.E.; Lynch, A.; Ramos-Montoya, A.; Boren, J.; Stark, R.; Fazli, L.; Warren, A.; Scott, H.; Madhu, B.; Sharma, N.; et al. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* **2011**, *30*, 2719–2733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Jin, H.-J.; Kim, J.; Yu, J. Androgen receptor genomic regulation. *Transl. Androl. Urol.* **2013**, *2*, 157–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sharma, N.L.; Massie, C.E.; Ramos-Montoya, A.; Zecchini, V.; Scott, H.E.; Lamb, A.D.; MacArthur, S.; Stark, R.; Warren, A.Y.; Mills, I.G.; et al. The androgen receptor induces a distinct transcriptional program in castration-resistant prostate cancer in man. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 35–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yaşar, P.; Ayaz, G.; User, S.D.; Güpür, G.; Muyan, M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod. Med. Biol.* **2017**, *16*, 4–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chen, M.; Hsu, I.; Wolfe, A.; Radovick, S.; Huang, K.; Yu, S.; Chang, C.; Messing, E.M.; Yeh, S. Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor- α null male mice. *Endocrinology* **2009**, *150*, 251–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, M.; Yeh, C.-R.; Chang, H.-C.; Vitkus, S.; Wen, X.-Q.; Bhowmick, N.A.; Wolfe, A.; Yeh, S. Loss of epithelial oestrogen receptor α inhibits oestrogen-stimulated prostate proliferation and squamous metaplasia via in vivo tissue selective knockout models. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 17–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vitkus, S.; Yeh, C.-R.; Lin, H.-H.; Hsu, I.; Yu, J.; Chen, M.; Yeh, S. Distinct function of estrogen receptor α in smooth muscle and fibroblast cells in prostate development. *Mol. Endocrinol.* **2013**, *27*, 38–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Leav, I.; Lau, K.M.; Adams, J.Y.; McNeal, J.E.; Taplin, M.E.; Wang, J.; Singh, H.; Ho, S.M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 79–92. [[CrossRef](#)]
36. Lau, K.M.; LaSpina, M.; Long, J.; Ho, S.M. Expression of estrogen receptor (ER)- α and ER- β in normal and malignant prostatic epithelial cells: Regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3175–3182. [[PubMed](#)]
37. Royuela, M.; de Miguel, M.P.; Bethencourt, F.R.; Sánchez-Chapado, M.; Fraile, B.; Arenas, M.I.; Paniagua, R. Estrogen receptors α and β in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J. Endocrinol.* **2001**, *168*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Imamov, O.; Morani, A.; Shim, G.-J.; Omoto, Y.; Thulin-Andersson, C.; Warner, M.; Gustafsson, J.-A. Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9375–9380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Latil, A.; Bièche, I.; Vidaud, D.; Lidereau, R.; Berthon, P.; Cussenot, O.; Vidaud, M. Evaluation of androgen, estrogen (ER α and ER β), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1919–1926. [[PubMed](#)]
40. Bonkhoff, H.; Fixemer, T.; Hunsicker, I.; Remberger, K. Estrogen Receptor Expression in Prostate Cancer and Premalignant Prostatic Lesions. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 641–647. [[CrossRef](#)]
41. Slusarz, A.; Jackson, G.A.; Day, J.K.; Shenouda, N.S.; Bogener, J.L.; Browning, J.D.; Fritsche, K.L.; MacDonald, R.S.; Besch-Williford, C.L.; Lubahn, D.B. Aggressive prostate cancer is prevented in ER α KO mice and stimulated in ER β KO TRAMP mice. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4160–4170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mohler, J.L.; Gregory, C.W.; Ford, O.H.; Kim, D.; Weaver, C.M.; Petrusz, P.; Wilson, E.M.; French, F.S. The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 440–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ellem, S.J.; Schmitt, J.F.; Pedersen, J.S.; Frydenberg, M.; Risbridger, G.P. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 2434–2441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Montgomery, R.B.; Mostaghel, E.A.; Vessella, R.; Hess, D.L.; Kalhorn, T.F.; Higano, C.S.; True, L.D.; Nelson, P.S. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: A mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4447–4454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wang, B.; Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *14*, 452–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Janowski, B.A.; Willy, P.J.; Devi, T.R.; Falck, J.R.; Mangelsdorf, D.J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* **1996**, *383*, 728–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Janowski, B.A.; Grogan, M.J.; Jones, S.A.; Wisely, G.B.; Kliewer, S.A.; Corey, E.J.; Mangelsdorf, D.J. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 266–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Peet, D.J.; Turley, S.D.; Ma, W.; Janowski, B.A.; Lobaccaro, J.M.; Hammer, R.E.; Mangelsdorf, D.J. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell* **1998**, *93*, 693–704. [[CrossRef](#)]
49. Viennois, E.; Esposito, T.; Dufour, J.; Pommier, A.; Fabre, S.; Kemeny, J.-L.; Guy, L.; Morel, L.; Lobaccaro, J.-M.; Baron, S. LXR α Regulates the Androgen Response in Prostate Epithelium. *Endocrinology* **2012**, *153*, 3211–3223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Fukuchi, J.; Hiipakka, R.A.; Kokontis, J.M.; Hsu, S.; Ko, A.L.; Fitzgerald, M.L.; Liao, S. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7682–7685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Fukuchi, J.; Kokontis, J.M.; Hiipakka, R.A.; Chuu, C.; Liao, S. Antiproliferative Effect of Liver X Receptor Agonists on LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7686–7689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chuu, C.; Hiipakka, R.A.; Kokontis, J.M.; Fukuchi, J.; Chen, R.-Y.; Liao, S. Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6482–6486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Taylor, B.S.; Schultz, N.; Hieronymus, H.; Gopalan, A.; Xiao, Y.; Carver, B.S.; Arora, V.K.; Kaushik, P.; Cerami, E.; Reva, B.; et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell* **2010**, *18*, 11–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Puhr, M.; Santer, F.R.; Neuwirt, H.; Marcias, G.; Hobisch, A.; Culig, Z. SOCS-3 antagonises the proliferative and migratory effects of fibroblast growth factor-2 in prostate cancer by inhibition of p44/p42 MAPK signalling. *Endocr. Relat. Cancer* **2010**, *17*, 525–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fu, W.; Yao, J.; Huang, Y.; Li, Q.; Li, W.; Chen, Z.; He, F.; Zhou, Z.; Yan, J. LXR Agonist Regulates the Carcinogenesis of PCa via the SOCS3 Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 195–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Xiong, H.; Zhang, Y.; Chen, S.; Ni, Z.; He, J.; Li, X.; Li, B.; Zhao, K.; Yang, F.; Zeng, Y.; et al. Induction of SOCS3 by liver X receptor suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 64083–64094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Youlin, K.; Li, Z.; Weiyang, H.; Jian, K.; Siming, L.; Xin, G. Liver X receptor activation inhibits PC-3 prostate cancer cells via the beta-catenin pathway. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213*, 267–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Pommier, A.J.C.; Dufour, J.; Alves, G.; Viennois, E.; de Boussac, H.; Trousson, A.; Volle, D.H.; Caira, F.; Val, P.; Arnaud, P.; et al. Liver X receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Varambally, S.; Dhanasekaran, S.M.; Zhou, M.; Barrette, T.R.; Kumar-Sinha, C.; Sanda, M.G.; Ghosh, D.; Pienta, K.J.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **2002**, *419*, 624–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Tamae, D.; Mostaghel, E.; Montgomery, B.; Nelson, P.S.; Balk, S.P.; Kantoff, P.W.; Taplin, M.-E.; Penning, T.M. The DHEA-sulfate depot following P450c17 inhibition supports the case for AKR1C3 inhibition in high risk localized and advanced castration resistant prostate cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *234*, 332–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Pasqualini, J.R. Estrogen sulfotransferases in breast and endometrial cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1155*, 88–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Lee, J.H.; Gong, H.; Khadem, S.; Lu, Y.; Gao, X.; Li, S.; Zhang, J.; Xie, W. Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* **2008**, *149*, 3778–3788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gong, H.; Guo, P.; Zhai, Y.; Zhou, J.; Uppal, H.; Jarzynka, M.J.; Song, W.-C.; Cheng, S.-Y.; Xie, W. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 1781–1790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Song, W.C. Biochemistry and reproductive endocrinology of estrogen sulfotransferase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *948*, 43–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Dozmorov, M.G.; Hurst, R.E.; Culkin, D.J.; Kropp, B.P.; Frank, M.B.; Osban, J.; Penning, T.M.; Lin, H.-K. Unique patterns of molecular profiling between human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. *Prostate* **2009**, *69*, 1077–1090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sekine, Y.; Demosky, S.J.; Stonik, J.A.; Furuya, Y.; Koike, H.; Suzuki, K.; Remaley, A.T. High-density lipoprotein induces proliferation and migration of human prostate androgen-independent cancer cells by an ABCA1-dependent mechanism. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1284–1294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Füllhase, C.; Schneider, M.P. 5- α -Reductase Inhibitors and Combination Therapy. *Urol. Clin.* **2016**, *43*, 325–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Kim, H.-J.; Andersson, L.C.; Bouton, D.; Warner, M.; Gustafsson, J.-A. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 558–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Tsui, K.-H.; Chung, L.-C.; Feng, T.-H.; Lee, T.-Y.; Chang, P.-L.; Chen, W.-T.; Juang, H.-H. Divergent effect of liver X receptor agonists on prostate-specific antigen expression is dependent on androgen receptor in prostate carcinoma cells. *Prostate* **2015**, *75*, 603–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lundholm, L.; Moverare, S.; Steffensen, K.R.; Nilsson, M.; Otsuki, M.; Ohlsson, C.; Gustafsson, J.A.; Dahlman-Wright, K. Gene expression profiling identifies liver X receptor α as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J. Mol. Endocrinol.* **2004**, *32*, 879–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kramer, P.R.; Wray, S. 17- β -estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *81*, 203–216. [[CrossRef](#)]
72. Delfosse, V.; le Maire, A.; Balaguer, P.; Bourguet, W. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* **2015**, *36*, 88–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Schulze, A.; Harris, A.L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* **2012**, *491*, 364–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **1956**, *124*, 269–270. [[PubMed](#)]
75. Mycielska, M.E.; Patel, A.; Rizaner, N.; Mazurek, M.P.; Keun, H.; Patel, A.; Ganapathy, V.; Djamgoz, M.B.A. Citrate transport and metabolism in mammalian cells. *BioEssays* **2009**, *31*, 10–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Swinnen, J.V.; Roskams, T.; Joniau, S.; van Poppel, H.; Oyen, R.; Baert, L.; Heyns, W.; Verhoeven, G. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 19–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Swyer, G.I.M. The Cholesterol Content of Normal and Enlarged Prostates. *Cancer Res.* **1942**, *2*, 372–375.
78. White, C.P. On the occurrence of crystals in tumours. *J. Pathol. Bacteriol.* **1909**, *13*, 3–10. [[CrossRef](#)]
79. Yue, S.; Li, J.; Lee, S.-Y.; Lee, H.J.; Shao, T.; Song, B.; Cheng, L.; Masterson, T.A.; Liu, X.; Ratliff, T.L.; et al. Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 393–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. Wettstein, M.S.; Saba, K.; Umbehr, M.H.; Murtola, T.J.; Fankhauser, C.D.; Adank, J.-P.; Hofmann, M.; Sulser, T.; Hermanns, T.; Moch, H.; et al. Prognostic Role of Preoperative Serum Lipid Levels in Patients Undergoing Radical Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Prostate* **2017**, *77*, 549–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Alfaqih, M.A.; Allott, E.H.; Hamilton, R.J.; Freeman, M.R.; Freedland, S.J. The current evidence on statin use and prostate cancer prevention: Are we there yet? *Nat. Rev. Urol.* **2017**, *14*, 107–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Krycer, J.R.; Brown, A.J. Cross-talk between the androgen receptor and the liver X receptor: Implications for cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20637–20647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Cariello, M.; Ducheix, S.; Maqdasy, S.; Baron, S.; Moschetta, A.; Lobaccaro, J. LXRs, SHP and FXR in prostate cancer: Enemies or Ménage-à-quatre with AR? *Nucl. Recept. Signal.* **2018**, in press.
84. Morris, M.D.; Chaikoff, I.L. The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and testis of the rat: Dietary versus endogenous contributions. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1095–1097. [[PubMed](#)]
85. Schaffner, C.P. Prostatic cholesterol metabolism: Regulation and alteration. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1981**, *75A*, 279–324. [[PubMed](#)]
86. Michaud, D.S.; Augustsson, K.; Rimm, E.B.; Stampfer, M.J.; Willet, W.C.; Giovannucci, E. A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* **2001**, *12*, 557–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. De Marzo, A.M.; Platz, E.A.; Sutcliffe, S.; Xu, J.; Grönberg, H.; Drake, C.G.; Nakai, Y.; Isaacs, W.B.; Nelson, W.G. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 256–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Aaltoma, S.H.; Lipponen, P.K.; Kosma, V.M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 3101–3106. [[PubMed](#)]
89. Tsai, C.-S.; Chen, F.-H.; Wang, C.-C.; Huang, H.-L.; Jung, S.-M.; Wu, C.-J.; Lee, C.-C.; McBride, W.H.; Chiang, C.-S.; Hong, J.-H. Macrophages From Irradiated Tumors Express Higher Levels of iNOS, Arginase-I and COX-2, and Promote Tumor Growth. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2007**, *68*, 499–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Twillie, D.A.; Eisenberger, M.A.; Carducci, M.A.; Hsieh, W.-S.; Kim, W.Y.; Simons, J.W. Interleukin-6: A candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology* **1995**, *45*, 542–549. [[CrossRef](#)]
91. Siegmund, M.J.; Yamazaki, H.; Pastan, I. Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia. *J. Urol.* **1994**, *151*, 1396–1399. [[CrossRef](#)]
92. Castrillo, A.; Joseph, S.B.; Vaidya, S.A.; Haberland, M.; Fogelman, A.M.; Cheng, G.; Tontonoz, P. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 805–816. [[CrossRef](#)]
93. Joseph, S.B.; Castrillo, A.; Laffitte, B.A.; Mangelsdorf, D.J.; Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 213–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wang, Q.; Ma, X.; Chen, Y.; Zhang, L.; Jiang, M.; Li, X.; Xiang, R.; Miao, R.; Hajjar, D.P.; Duan, Y.; et al. Identification of interferon- γ as a new molecular target of liver X receptor. *Biochem. J.* **2014**, *459*, 345–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Labrecque, L.; Royal, I.; Surprenant, D.S.; Patterson, C.; Gingras, D.; Béliveau, R. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Activity by Caveolin-1 and Plasma Membrane Cholesterol. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 334–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Noghero, A.; Perino, A.; Seano, G.; Saglio, E.; Lo Sasso, G.; Veglio, F.; Primo, L.; Hirsch, E.; Bussolino, F.; Morello, F. Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2280–2288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Lai, C.-J.; Cheng, H.-C.; Lin, C.-Y.; Huang, S.-H.; Chen, T.-H.; Chung, C.-J.; Chang, C.-H.; Wang, H.-D.; Chu, C.-P. Activation of liver X receptor suppresses angiogenesis via induction of ApoD. *FASEB J.* **2017**, *31*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Albertsen, P.C. Observational studies and the natural history of screen-detected prostate cancer. *Curr. Opin. Urol.* **2015**, *25*, 232–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **2016**, *66*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. James, N.D.; Sydes, M.R.; Clarke, N.W.; Mason, M.D.; Dearnaley, D.P.; Spears, M.R.; Ritchie, A.W.S.; Parker, C.C.; Russell, J.M.; Attard, G.; et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **2016**, *387*, 1163–1177. [[CrossRef](#)]

101. Sweeney, C.J.; Chen, Y.-H.; Carducci, M.; Liu, G.; Jarrard, D.F.; Eisenberger, M.; Wong, Y.-N.; Hahn, N.; Kohli, M.; Cooney, M.M.; et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 737–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Klotz, L.; Boccon-Gibod, L.; Shore, N.D.; Andreou, C.; Persson, B.-E.; Cantor, P.; Jensen, J.-K.; Olesen, T.K.; Schröder, F.H. The efficacy and safety of degarelix: A 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU Int.* **2008**, *102*, 1531–1538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Attard, G.; Reid, A.H.M.; A'Hern, R.; Parker, C.; Oommen, N.B.; Folkard, E.; Messiou, C.; Molife, L.R.; Maier, G.; Thompson, E.; et al. Selective Inhibition of CYP17 With Abiraterone Acetate Is Highly Active in the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 3742–3748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Chang, K.-H.; Li, R.; Kuri, B.; Lotan, Y.; Roehrborn, C.G.; Liu, J.; Vessella, R.; Nelson, P.S.; Kapur, P.; Guo, X.; et al. A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell* **2013**, *154*, 1074–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Hamid, A.R.A.H.; Pfeiffer, M.J.; Verhaegh, G.W.; Schaafsma, E.; Brandt, A.; Sweep, F.C.G.J.; Sedelaar, J.P.M.; Schalken, J.A. Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is a biomarker and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer. *Mol. Med. Camb. Mass* **2013**, *18*, 1449–1455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Tran, C.; Ouk, S.; Clegg, N.J.; Chen, Y.; Watson, P.A.; Arora, V.; Wongvipat, J.; Smith-Jones, P.M.; Yoo, D.; Kwon, A.; et al. Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Science* **2009**, *324*, 787–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Sharifi, N.; Dahut, W.L.; Steinberg, S.M.; Figg, W.D.; Tarassoff, C.; Arlen, P.; Gulley, J.L. A retrospective study of the time to clinical endpoints for advanced prostate cancer. *BJU Int.* **2005**, *96*, 985–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Cornford, P.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Briers, E.; de Santis, M.; Gross, T.; Henry, A.M.; Joniau, S.; Lam, T.B.; Mason, M.D.; et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2017**, *71*, 630–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Smith, M.R.; Kabbavar, F.; Saad, F.; Hussain, A.; Gittelman, M.C.; Bilhartz, D.L.; Wynne, C.; Murray, R.; Zinner, N.R.; Schulman, C.; et al. Natural history of rising serum prostate-specific antigen in men with castrate nonmetastatic prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2918–2925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Robinson, D.; van Allen, E.M.; Wu, Y.-M.; Schultz, N.; Lonigro, R.J.; Mosquera, J.-M.; Montgomery, B.; Taplin, M.-E.; Pritchard, C.C.; Attard, G.; et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell* **2015**, *162*, 454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Visakorpi, T.; Hyytinen, E.; Koivisto, P.; Tanner, M.; Keinänen, R.; Palmberg, C.; Palotie, A.; Tammela, T.; Isola, J.; Kallioniemi, O.-P. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat. Genet.* **1995**, *9*, 401–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Chen, C.D.; Welsbie, D.S.; Tran, C.; Baek, S.H.; Chen, R.; Vessella, R.; Rosenfeld, M.G.; Sawyers, C.L. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Komiya, A.; Yasuda, K.; Watanabe, A.; Fujiuchi, Y.; Tsuzuki, T.; Fuse, H. The prognostic significance of loss of the androgen receptor and neuroendocrine differentiation in prostate biopsy specimens among castration-resistant prostate cancer patients. *Mol. Clin. Oncol.* **2013**, *1*, 257–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Waltering, K.K.; Urbanucci, A.; Visakorpi, T. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *360*, 38–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Miyamoto, H.; Yeh, S.; Wilding, G.; Chang, C. Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 7379–7384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Gerhardt, J.; Montani, M.; Wild, P.; Beer, M.; Huber, F.; Hermanns, T.; Müntener, M.; Kristiansen, G. FOXA1 Promotes Tumor Progression in Prostate Cancer and Represents a Novel Hallmark of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 848–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Gregory, C.W.; He, B.; Johnson, R.T.; Ford, O.H.; Mohler, J.L.; French, F.S.; Wilson, E.M. A Mechanism for Androgen Receptor-mediated Prostate Cancer Recurrence after Androgen Deprivation Therapy. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4315–4319. [[PubMed](#)]

118. Xu, K.; Wu, Z.J.; Groner, A.C.; He, H.H.; Cai, C.; Lis, R.T.; Wu, X.; Stack, E.C.; Loda, M.; Liu, T.; et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* **2012**, *338*, 1465–1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Yepuru, M.; Wu, Z.; Kulkarni, A.; Yin, F.; Barrett, C.M.; Kim, J.; Steiner, M.S.; Miller, D.D.; Dalton, J.T.; Narayanan, R. Steroidogenic enzyme AKR1C3 is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5613–5625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Culig, Z.; Hobisch, A.; Cronauer, M.V.; Radmayr, C.; Trapman, J.; Hittmair, A.; Bartsch, G.; Klocker, H. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5474–5478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Signoretti, S.; Montironi, R.; Manola, J.; Altamari, A.; Tam, C.; Bubley, G.; Balk, S.; Thomas, G.; Kaplan, I.; Hlatky, L.; et al. Her-2-neu Expression and Progression Toward Androgen Independence in Human Prostate Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1918–1925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Osman, I.; Scher, H.I.; Drobnjak, M.; Verbel, D.; Morris, M.; Agus, D.; Ross, J.S.; Cordon-Cardo, C. HER-2/neu (p185neu) Protein Expression in the Natural or Treated History of Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2643–2647. [[PubMed](#)]
123. Yeh, S.; Lin, H.-K.; Kang, H.-Y.; Thin, T.H.; Lin, M.-F.; Chang, C. 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. USA* **1999**, *96*, 5458–5463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Mellinghoff, I.K.; Vivanco, I.; Kwon, A.; Tran, C.; Wongvipat, J.; Sawyers, C.L. HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 517–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Labrie, F. Adrenal androgens and intracrinology. *Semin. Reprod. Med.* **2004**, *22*, 299–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Mitsiades, N.; Sung, C.C.; Schultz, N.; Danila, D.C.; He, B.; Eedunuri, V.K.; Fleisher, M.; Sander, C.; Sawyers, C.L.; Scher, H.I. Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 6142–6152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. De Bono, J.S.; Oudard, S.; Ozguroglu, M.; Hansen, S.; Machiels, J.-P.; Kocak, I.; Gravis, G.; Bodrogi, I.; Mackenzie, M.J.; Shen, L.; et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. *Lancet* **2010**, *376*, 1147–1154. [[CrossRef](#)]
128. Bubendorf, L.; Schöpfer, A.; Wagner, U.; Sauter, G.; Moch, H.; Willi, N.; Gasser, T.C.; Mihatsch, M.J. Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1589 patients. *Hum. Pathol.* **2000**, *31*, 578–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Weinfurt, K.P.; Li, Y.; Castel, L.D.; Saad, F.; Timbie, J.W.; Glendenning, G.A.; Schulman, K.A. The significance of skeletal-related events for the health-related quality of life of patients with metastatic prostate cancer. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 579–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Parker, C.; Nilsson, S.; Heinrich, D.; Helle, S.I.; O’Sullivan, J.M.; Fosså, S.D.; Chodacki, A.; Wiechno, P.; Logue, J.; Seke, M.; et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 213–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Saad, F.; Gleason, D.M.; Murray, R.; Tchekmedyian, S.; Venner, P.; Lacombe, L.; Chin, J.L.; Vinholes, J.J.; Goas, J.A.; Zheng, M. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 879–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Smith, M.R.; Saad, F.; Coleman, R.; Shore, N.; Fizazi, K.; Tombal, B.; Miller, K.; Sieber, P.; Karsh, L.; Damião, R.; et al. Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: Results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **2012**, *379*, 39–46. [[CrossRef](#)]
133. Kantoff, P.W.; Higano, C.S.; Shore, N.D.; Berger, E.R.; Small, E.J.; Penson, D.F.; Redfern, C.H.; Ferrari, A.C.; Dreicer, R.; Sims, R.B.; et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 411–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Antonarakis, E.S.; Lu, C.; Wang, H.; Luber, B.; Nakazawa, M.; Roeser, J.C.; Chen, Y.; Mohammad, T.A.; Chen, Y.; Fedor, H.L.; et al. AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1028–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

135. Raza, S.; Meyer, M.; Goodyear, C.; Hammer, K.D.P.; Guo, B.; Ghribi, O. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol stimulates cell proliferation via ER β in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int.* **2017**, *17*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Pencheva, N.; Buss, C.G.; Posada, J.; Merghoub, T.; Tavazoie, S.F. Broad-Spectrum Therapeutic Suppression of Metastatic Melanoma through Nuclear Hormone Receptor Activation. *Cell* **2014**, *156*, 986–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Segala, G.; David, M.; de Medina, P.; Poirot, M.C.; Serhan, N.; Vergez, F.; Mougel, A.; Saland, E.; Carayon, K.; Leignadier, J.; et al. Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Zhong, S.; Zhang, X.; Chen, L.; Ma, T.; Tang, J.; Zhao, J. Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 554–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Platz, E.A.; Leitzmann, M.F.; Visvanathan, K.; Rimm, E.B.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C.; Giovannucci, E. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 1819–1825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Loeb, S.; Kan, D.; Helfand, B.T.; Nadler, R.B.; Catalona, W.J. Is statin use associated with prostate cancer aggressiveness? *BJU Int.* **2010**, *105*, 1222–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Harshman, L.C.; Wang, X.; Nakabayashi, M.; Xie, W.; Valenca, L.; Werner, L.; Yu, Y.; Kantoff, A.M.; Sweeney, C.J.; Mucci, L.A.; et al. Statin Use at the Time of Initiation of Androgen Deprivation Therapy and Time to Progression in Patients With Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* **2015**, *1*, 495–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Harshman, L.C.; Werner, L.; Tripathi, A.; Wang, X.; Maughan, B.L.; Antonarakis, E.S.; Nakabayashi, M.; McKay, R.; Pomerantz, M.; Mucci, L.A.; et al. The impact of statin use on the efficacy of abiraterone acetate in patients with castration-resistant prostate cancer. *Prostate* **2017**, *77*, 1303–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Viennois, E.; Pommier, A.J.C.; Mouzat, K.; Oumeddour, A.; El Hajjaji, F.-Z.; Dufour, J.; Caira, F.; Volle, D.H.; Baron, S.; Lobaccaro, J.-M.A. Targeting liver X receptors in human health: Deadlock or promising trail? *Expert. Opin. Ther. Targets* **2011**, *15*, 219–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Yasuda, T.; Grillot, D.; Billheimer, J.T.; Briand, F.; Delerive, P.; Huet, S.; Rader, D.J. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage RCT in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 781–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Stachel, S.J.; Zerbinatti, C.; Rudd, M.T.; Cosden, M.; Suon, S.; Nanda, K.K.; Wessner, K.; DiMuzio, J.; Maxwell, J.; Wu, Z.; et al. Identification and in Vivo Evaluation of Liver X Receptor β -Selective Agonists for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3489–3498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Kirchgessner, T.G.; Sleph, P.; Ostrowski, J.; Lupisella, J.; Ryan, C.S.; Liu, X.; Fernando, G.; Grimm, D.; Shipkova, P.; Zhang, R.; et al. Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 223–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Références

- Abate-Shen C, Banach-Petrosky WA, Sun X, Economides KD, Desai N, Gregg JP, Borowsky AD, Cardiff RD, Shen MM. 2003. Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Res* 63:3886–90.
- Abate-Shen C, Shen MM. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14:2410–34.
- Abate-Shen C, Shen MM, Gelmann E. 2008. Integrating differentiation and cancer: The Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* 76:717–727.
- Abbott BD, Lin T-M, Rasmussen NT, Albrecht RM, Schmid JE, Peterson RE. 2003. Lack of Expression of EGF and TGF- in the Fetal Mouse Alters Formation of Prostatic Epithelial Buds and Influences the Response to TCDD. *Toxicol Sci* 76:427–436.
- Abremski K, Hoess R. 1984. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* 259:1509–14.
- Acevedo VD, Gangula RD, Freeman KW, Li R, Zhang Y, Wang F, Ayala GE, Peterson LE, Ittmann M, Spencer DM. 2007. Inducible FGFR-1 Activation Leads to Irreversible Prostate Adenocarcinoma and an Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell* 12:559–571.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–95.
- Ahmad SM, Baker BS. 2002. Sex-specific deployment of FGF signaling in *Drosophila* recruits mesodermal cells into the male genital imaginal disc. *Cell* 109:651–61.
- Ahmadiyeh N, Pomerantz MM, Grisanzio C, Herman P, Jia L, Almendro V, He HH, Brown M, Liu XS, Davis M, Caswell JL, Beckwith CA, et al. 2010. 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC. *Proc Natl Acad Sci* 107:9742–9746.
- Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D. 2013. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 6:27.
- Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. 2012. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans* 40:139–146.
- Alavanja MCR, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, Knott C, Thomas K, Hoppin JA, Barker J, Coble J, Sandler DP, et al. 2003. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Am J Epidemiol* 157:800–14.
- Alayev A, Holz MK. 2013. mTOR signaling for biological control and cancer. *J Cell Physiol* 228:1658–1664.
- Albadine R, Latour M, Toubaji A, Haffner M, Isaacs WB, A Platz E, Meeker AK, Demarzo AM, Epstein JI, Netto GJ. 2009. TMPRSS2–ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 22:1415–1422.
- Algarte-Génin M, Cussenot O, Costa P. 2004. Prevention of Prostate Cancer by Androgens: Experimental Paradox or Clinical Reality. *Eur Urol* 46:285–295.
- Allgeier SH, Lin T-M, Vezina CM, Moore RW, Fritz WA, Chiu S-Y, Zhang C, Peterson RE. 2008. WNT5A selectively inhibits mouse ventral prostate development. *Dev Biol* 324:10–17.
- Anderson PD, McKissic SA, Logan M, Roh M, Franco OE, Wang J, Doubinskaia I, Meer R van der, Hayward SW, Eischen CM, Eltoum I-E, Abdulkadir SA. 2012. Nkx3.1 and Myc crossregulate shared target genes in mouse and human prostate tumorigenesis. *J Clin Invest*

122:1907–1919.

Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272:31515–24.

Arabi A, Wu S, Ridderstråle K, Bierhoff H, Shiue C, Fatyol K, Fahlén S, Hydbring P, Söderberg O, Grummt I, Larsson L-G, Wright APH. 2005. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 7:303–310.

Arai S, Jonas O, Whitman MA, Corey E, Balk SP, Chen S. 2018. Tyrosine Kinase Inhibitors Increase MCL1 Degradation and in Combination with BCLXL/BCL2 Inhibitors Drive Prostate Cancer Apoptosis. *Clin Cancer Res*.

Asatiani E, Huang W-X, Wang A, Rodriguez Ortner E, Cavalli LR, Haddad BR, Gelmann EP. 2005. Deletion, Methylation, and Expression of the *NKX3.1* Suppressor Gene in Primary Human Prostate Cancer. *Cancer Res* 65:1164–1173.

Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, Drake CG, Bono JS de. 2016. Prostate cancer. *Lancet* 387:70–82.

Axiak SM, Bigio A. 2012. Canine prostatic carcinoma. *Compend Contin Educ Vet* 34:E1-5.

Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, Park K, Kitabayashi N, MacDonald TY, Ghandi M, Van Allen E, Kryukov GV, et al. 2013. Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes. *Cell* 153:666–677.

Baena-Del Valle JA, Zheng Q, Esopi DM, Rubenstein M, Hubbard GK, Moncaliano MC, Hruszkewycz A, Vaghasia A, Yegnasubramanian S, Wheelan SJ, Meeker AK, Heaphy CM, et al. 2018. MYC drives overexpression of telomerase RNA (*hTR* / *TERC*) in prostate cancer. *J Pathol* 244:11–24.

Baena E, Shao Z, Linn DE, Glass K, Hamblen MJ, Fujiwara Y, Kim J, Nguyen M, Zhang X, Godinho FJ, Bronson RT, Mucci LA, et al. 2013. ETV1 directs androgen metabolism and confers aggressive prostate cancer in targeted mice and patients. *Genes Dev* 27:683–698.

Bairati A. 1968. Structure and ultrastructure of the male reproductive system in *Drosophila melanogaster* Meig. *Ital J Zool* 2:105–182.

Bajgelman MC, Strauss BE. 2006. The DU145 human prostate carcinoma cell line harbors a temperature-sensitive allele of p53. *Prostate* 66:1455–1462.

Barcelo H, Stewart MJ. 2002. Altering *Drosophila* S6 kinase activity is consistent with a role for S6 kinase in growth. *genesis* 34:83–85.

Bassett JK, Severi G, Hodge AM, MacInnis RJ, Gibson RA, Hopper JL, English DR, Giles GG. 2013. Plasma phospholipid fatty acids, dietary fatty acids and prostate cancer risk. *Int J Cancer* 133:1882–1891.

Batzner AG, Rotin D, Ureña JM, Skolnik EY, Schlessinger J. 1994. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 14:5192–201.

Bayascas JR, Alessi DR. 2005. Regulation of Akt/PKB Ser473 Phosphorylation. *Mol Cell* 18:143–145.

Bedolla R, Prihoda TJ, Kreisberg JI, Malik SN, Krishnegowda NK, Troyer DA, Ghosh PM. 2007. Determining Risk of Biochemical Recurrence in Prostate Cancer by Immunohistochemical Detection of PTEN Expression and Akt Activation. *Clin Cancer Res* 13:3860–3867.

- Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Nowak MA. 2007. Genetic Progression and the Waiting Time to Cancer. *PLoS Comput Biol* 3:e225.
- Belandia B, Powell SM, Garcia-Pedrero JM, Walker MM, Bevan CL, Parker MG. 2005. Hey1, a Mediator of Notch Signaling, Is an Androgen Receptor Corepressor. *Mol Cell Biol* 25:1425–1436.
- Belcik JT, Qi Y, Kaufmann BA, Xie A, Bullens S, Morgan TK, Bagby SP, Kolumam G, Kowalski J, Oyer JA, Bunting S, Lindner JR. 2012. Cardiovascular and Systemic Microvascular Effects of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Cancer. *J Am Coll Cardiol* 60:618–625.
- Bello-DeOcampo D, Tindall DJ. 2003. TGF-beta1/Smad signaling in prostate cancer. *Curr Drug Targets* 4:197–207.
- Benjamin MM, Khalil RA. 2012. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigative Tools in the Pathogenesis and Management of Vascular Disease. *EXS*, p 209–279.
- Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, Sboner A, Esgueva R, Pflueger D, Sougnez C, Onofrio R, Carter SL, et al. 2011. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470:214–20.
- Berges RR, Vukanovic J, Epstein JI, CarMichel M, Cisek L, Johnson DE, Veltri RW, Walsh PC, Isaacs JT. 1995. Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1:473–80.
- Bernards A, Hariharan IK. 2001. Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11:274–8.
- Berns A. 2001. Cancer. Improved mouse models. *Nature* 410:1043–1044.
- Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. 2008. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 288:30–37.
- Berset TA, Hoier EF, Hajnal A. 2005. The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Sccl inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes Dev* 19:1328–1340.
- Best CJM, Gillespie JW, Yi Y, Chandramouli GVR, Perlmutter MA, Gathright Y, Erickson HS, Georgevich L, Tangrea MA, Duray PH, González S, Velasco A, et al. 2005. Molecular Alterations in Primary Prostate Cancer after Androgen Ablation Therapy. *Clin Cancer Res* 11:6823–6834.
- Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, Jenkins RB, Bieberich CJ, Marzo AM De. 2006. Decreased NKX3.1 Protein Expression in Focal Prostatic Atrophy, Prostatic Intraepithelial Neoplasia, and Adenocarcinoma: Association with Gleason Score and Chromosome 8p Deletion. *Cancer Res* 66:10683–10690.
- Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C, Shen MM. 1999. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 13:966–77.
- Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. 2004. TGF- Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science* (80-) 303:848–851.
- Bieberich CJ, Fujita K, He WW, Jay G. 1996. Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J Biol Chem* 271:31779–82.

- Bier E. 2005. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9–23.
- Bier E, Jan LY, Jan YN. 1990. rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 4:190–203.
- Bilder D, Li M, Perrimon N. 2000. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289:113–6.
- Bitting RL, Schaeffer D, Somarelli JA, Garcia-Blanco MA, Armstrong AJ. 2014. The role of epithelial plasticity in prostate cancer dissemination and treatment resistance. *Cancer Metastasis Rev* 33:441–468.
- Bonkhoff H. 1998. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Suppl* 8:18–22.
- Bonkhoff H, Fixemer T, Remberger K. 1998. Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate* 34:251–8.
- Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. 1994. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 24:114–8.
- Bono JS de, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels J-P, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, et al. 2010. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 376:1147–1154.
- Boormans JL, Hermans KG, Leenders GJLH van, Trapman J, Verhagen PCMS. 2008. An activating mutation in *AKT1* in human prostate cancer. *Int J Cancer* 123:2725–2726.
- Bostwick DG. 1989. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *Urology* 34:16–22.
- Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, Marsh W, Schultz DS. 1993. Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 24:298–310.
- Bostwick DG, Brawer MK. 1987. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 59:788–94.
- Bostwick DG, Qian J. 2004. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 17:360–379.
- Bowen C, Stuart A, Ju J-H, Tuan J, Blonder J, Conrads TP, Veenstra TD, Gelmann EP. 2007. NKX3.1 Homeodomain Protein Binds to Topoisomerase I and Enhances Its Activity. *Cancer Res* 67:455–464.
- Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–15.
- Bratt O. 2002. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 168:906–13.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:207–214.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857–68.
- Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. 2001. Collocation

of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7:1273–81.

Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. 2014. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer* 120:3446–3456.

Byrne NM, Nesbitt H, Ming L, McKeown SR, Worthington J, McKenna DJ. 2016. Androgen deprivation in LNCaP prostate tumour xenografts induces vascular changes and hypoxic stress, resulting in promotion of epithelial-to-mesenchymal transition. *Br J Cancer* 114:659–668.

Cadigan KM, Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286–305.

Cai C, Hsieh C-L, Omwancha J, Zheng Z, Chen S-Y, Baert J-L, Shemshedini L. 2007. ETV1 Is a Novel Androgen Receptor-Regulated Gene that Mediates Prostate Cancer Cell Invasion. *Mol Endocrinol* 21:1835–1846.

Cancer Genome Atlas Research Network TCGAR. 2015. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 163:1011–25.

Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP. 2011. ERK1/2 Phosphorylate Raptor to Promote Ras-dependent Activation of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* 286:567–577.

Carroll AG, Voeller HJ, Sugars L, Gelmann EP. 1993. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 23:123–34.

Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. 1993. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 150:797–802.

Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, Arora VK, Le C, Koutcher J, Scher H, Scardino PT, Rosen N, et al. 2011. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell* 19:575–586.

Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, Alimonti A, Nardella C, Varmeh S, Scardino PT, Cordon-Cardo C, Gerald W, et al. 2009. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* 41:619–624.

Casci T, Vinós J, Freeman M. 1999. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 96:655–65.

Celma A, Servián P, Planas J, Placer J, Quilez MT, Arbós MA, Torres I de, Morote J. 2014. Clinical significance of proliferative inflammatory atrophy in prostate biopsy. *Actas Urológicas Españolas (English Ed)* 38:122–126.

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

Chang WY, Birch L, Woodham C, Gold LI, Prins GS. 1999. Neonatal Estrogen Exposure Alters the Transforming Growth Factor- β Signaling System in the Developing Rat Prostate and Blocks the Transient p21^{cip1/waf1} Expression Associated with Epithelial Differentiation¹. *Endocrinology* 140:2801–2813.

Chavarro JE, Stampfer MJ, Campos H, Kurth T, Willett WC, Ma J. 2008. A Prospective Study of Trans-Fatty Acid Levels in Blood and Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:95–101.

Chen H-Z, Tsai S-Y, Leone G. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle

control. *Nat Rev Cancer* 9:785–797.

Chen PS, Stumm-Zollinger E, Aigaki T, Balmer J, Bienz M, Böhlen P. 1988. A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell* 54:291–8.

Chen R, Ren S, Yiu MK, Fai NC, Cheng WS, Ian LH, Naito S, Matsuda T, Kehinde E, Kural A, Chiu JY, Umbas R, et al. 2014. Prostate cancer in Asia: A collaborative report. *Asian J Urol* 1:15–29.

Chen Y, Martinez LA, LaCava M, Coghlan L, Conti CJ. 1998. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. *Oncogene* 16:1913–1920.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Paolo Pandolfi P. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436:725–730.

Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D’Cunha R, Jason M, Dodd JG. 1993. Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. *Mol Cell Biochem* 126:151–8.

Cho N-Y, Choi M, Kim B-H, Cho Y-M, Moon KC, Kang GH. 2006. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 119:1858–1862.

Choi N, Zhang B, Zhang L, Ittmann M, Xin L. 2012. Adult Murine Prostate Basal and Luminal Cells Are Self-Sustained Lineages that Can Both Serve as Targets for Prostate Cancer Initiation. *Cancer Cell* 21:253–265.

Chuu C-P, Kokontis JM, Hiipakka RA, Fukuchi J, Lin H-P, Lin C-Y, Huo C, Su L-C, Liao S, Liao S. 2011. Androgen suppresses proliferation of castration-resistant LNCaP 104-R2 prostate cancer cells through androgen receptor, Skp2, and c-Myc. *Cancer Sci* 102:2022–2028.

Citri A, Yarden Y. 2006. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:505–516.

Clavería C, Giovinazzo G, Sierra R, Torres M. 2013. Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* 500:39–44.

Clegg NJ, Couto SS, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Taylor BS, Ellwood-Yen K, Gerald WL, Sander C, Sawyers CL. 2011. MYC Cooperates with AKT in Prostate Tumorigenesis and Alters Sensitivity to mTOR Inhibitors. *PLoS One* 6:e17449.

Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P. 2003. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114:739–49.

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

Cooke PS, Young P, Cunha GR. 1991. Androgen Receptor Expression in Developing Male Reproductive Organs*. *Endocrinology* 128:2867–2873.

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

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. 2002. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer--Trials and Tribulations. *Science* (80-) 295:2387–2392.

Covey TM, Edes K, Fitzpatrick FA. 2007. Akt activation by arachidonic acid metabolism occurs via oxidation and inactivation of PTEN tumor suppressor. *Oncogene* 26:5784–5792.

- Cristofano A Di, Acetis M De, Koff A, Cordon-Cardo C, Pandolfi P. 2001. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet* 27:222–224.
- Culig Z, Hobisch A, Cronauer M V, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H. 1994. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 54:5474–8.
- Cunha GR. 1973. The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat Rec* 175:87–96.
- Cunha GR, Battle E, Young P, Brody J, Donjacour A, Hayashi N, Kinbara H. 1992. Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. *Epithelial Cell Biol* 1:76–83.
- Cunningham D, You Z. 2015. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol methods* 2:.
- D. Sarbassov DD Dos, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2004. Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. *Curr Biol* 14:1296–1302.
- Dai Y, Siemann DW. 2010. BMS-777607, a small-molecule met kinase inhibitor, suppresses hepatocyte growth factor-stimulated prostate cancer metastatic phenotype in vitro. *Mol Cancer Ther* 9:1554–61.
- Deady LD, Shen W, Mosure SA, Spradling AC, Sun J. 2015. Matrix Metalloproteinase 2 Is Required for Ovulation and Corpus Luteum Formation in *Drosophila*. *PLOS Genet* 11:e1004989.
- Delanoue R, Meschi E, Agrawal N, Mauri A, Tsatskis Y, McNeill H, Leopold P. 2016. *Drosophila* insulin release is triggered by adipose Stunted ligand to brain Methuselah receptor. *Science* (80-) 353:1553–1556.
- Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. 1996. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 274:2057–9.
- Depetris-Chauvin A, Fernández-Gamba Á, Gorostiza EA, Herrero A, Castaño EM, Ceriani MF. 2014. Mmp1 Processing of the PDF Neuropeptide Regulates Circadian Structural Plasticity of Pacemaker Neurons. *PLoS Genet* 10:e1004700.
- Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, Crissman JD, Sarkar FH. 1997. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 21:127–43.
- DeSantis CE, Siegel RL, Sauer AG, Miller KD, Fedewa SA, Alcaraz KI, Jemal A. 2016. Cancer statistics for African Americans, 2016: Progress and opportunities in reducing racial disparities. *CA Cancer J Clin* 66:290–308.
- Di Gregorio A, Bowling S, Rodriguez TA. 2016. Cell Competition and Its Role in the Regulation of Cell Fitness from Development to Cancer. *Dev Cell* 38:621–634.
- Doles J, Cook C, Shi X, Valosky J, Lipinski R, Bushman W. 2006. Functional compensation in Hedgehog signaling during mouse prostate development. *Dev Biol* 295:13–25.
- Donjacour AA, Cunha GR. 1993. Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology* 132:2342–2350.

- Donjacour AA, Thomson AA, Cunha GR. 2003. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol* 261:39–54.
- Dorrello N V., Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. 2006. S6K1- and TRCP-Mediated Degradation of PDCD4 Promotes Protein Translation and Cell Growth. *Science* (80-) 314:467–471.
- Driscoll SG, Taylor SH. 1980. Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system. *Obstet Gynecol* 56:537–42.
- Duijn PW van, Trapman J. 2006. PI3K/Akt signaling regulates p27kip1 expression via Skp2 in PC3 and DU145 prostate cancer cells, but is not a major factor in p27kip1 regulation in LNCaP and PC346 cells. *Prostate* 66:749–760.
- Dunn MW, Kazer MW. 2011. Prostate Cancer Overview. *Semin Oncol Nurs* 27:241–250.
- Dunning WF. 1963. PROSTATE CANCER IN THE RAT. *Natl Cancer Inst Monogr* 12:351–69.
- Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR. 1999. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 54:523–7.
- Dutta A, Magnen C Le, Mitrofanova A, Ouyang X, Califano A, Abate-Shen C. 2016. Identification of an NKX3.1-G9a-UTY transcriptional regulatory network that controls prostate differentiation. *Science* 352:1576–80.
- Ecke TH, Schlechte HH, Schiemenz K, Sachs MD, Lenk S V, Rudolph BD, Loening SA. 2010. TP53 gene mutations in prostate cancer progression. *Anticancer Res* 30:1579–86.
- Economides KD, Capecchi MR. 2003. Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development* 130:2061–9.
- Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Olama AA Al, Easton D, Kote-Jarai Z. 2014. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol* 11:18–31.
- Egan JE, Hall AB, Yatsula BA, Bar-Sagi D. 2002. The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc Natl Acad Sci* 99:6041–6046.
- Eijkelenboom A, Burgering BMT. 2013. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:83–97.
- Ellwood-Yen K, Graeber TG, Wongvipat J, Iruela-Arispe ML, Zhang J, Matusik R, Thomas G V, Sawyers CL. 2003. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* 4:223–38.
- Engels WR, Johnson-Schlitz DM, Eggleston WB, Sved J. 1990. High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* 62:515–25.
- Ernesto JI, Weigel Muñoz M, Battistone MA, Vasen G, Martínez-López P, Orta G, Figueiras-Fierro D, la Vega-Beltran JL De, Moreno IA, Guidobaldi HA, Giojalas L, Darszon A, et al. 2015. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J Cell Biol* 210:1213–1224.
- Evans GS, Chandler JA. 1987. Cell proliferation studies in the rat prostate: II. The effects of castration and androgen-induced regeneration upon basal and secretory cell proliferation. *Prostate* 11:339–51.
- Feng S, Shao L, Castro P, Coleman I, Nelson PS, Smith PD, Davies BR, Ittmann M. 2017.

- Combination treatment of prostate cancer with FGF receptor and AKT kinase inhibitors. *Oncotarget* 8:6179–6192.
- Fey D, Matallanas D, Rauch J, Rukhlenko OS, Kholodenko BN. 2016. The complexities and versatility of the RAS-to-ERK signalling system in normal and cancer cells. *Semin Cell Dev Biol* 58:96–107.
- Findlay GD, MacCoss MJ, Swanson WJ. 2009. Proteomic discovery of previously unannotated, rapidly evolving seminal fluid genes in *Drosophila*. *Genome Res* 19:886–896.
- Findlay GD, Yi X, MacCoss MJ, Swanson WJ. 2008. Proteomics Reveals Novel *Drosophila* Seminal Fluid Proteins Transferred at Mating. *PLoS Biol* 6:e178.
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. 2002. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16:1472–1487.
- Fiorentino L, Pertica C, Fiorini M, Talora C, Crescenzi M, Castellani L, Alemà S, Benedetti P, Segatto O. 2000. Inhibition of ErbB-2 mitogenic and transforming activity by RALT, a mitogen-induced signal transducer which binds to the ErbB-2 kinase domain. *Mol Cell Biol* 20:7735–50.
- Fong ELS, Martinez M, Yang J, Mikos AG, Navone NM, Harrington DA, Farach-Carson MC. 2014. Hydrogel-Based 3D Model of Patient-Derived Prostate Xenograft Tumors Suitable for Drug Screening. *Mol Pharm* 11:2040–2050.
- Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Laufer-Amorim R. 2018. Evaluation of NKX3.1 and C-MYC expression in canine prostatic cancer. *Res Vet Sci* 118:365–370.
- Franke TF. 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27:6473–6488.
- Franz M-C, Anderle P, Bürzle M, Suzuki Y, Freeman MR, Hediger MA, Kovacs G. 2013. Zinc transporters in prostate cancer. *Mol Aspects Med* 34:735–41.
- Fraser M, Zhao H, Luoto KR, Lundin C, Coackley C, Chan N, Joshua AM, Bismar TA, Evans A, Helleday T, Bristow RG. 2012. PTEN Deletion in Prostate Cancer Cells Does Not Associate with Loss of RAD51 Function: Implications for Radiotherapy and Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 18:1015–1027.
- Freedman ML, Monteiro ANA, Gayther SA, Coetzee GA, Risch A, Plass C, Casey G, Biasi M De, Carlson C, Duggan D, James M, Liu P, et al. 2011. Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. *Nat Genet* 43:513–518.
- Freestone SH, Marker P, Grace OC, Tomlinson DC, Cunha GR, Harnden P, Thomson AA. 2003. Sonic hedgehog regulates prostatic growth and epithelial differentiation. *Dev Biol* 264:352–62.
- Fritsche-Guenther R, Witzel F, Sieber A, Herr R, Schmidt N, Braun S, Brummer T, Sers C, Bluthgen N. 2011. Strong negative feedback from Erk to Raf confers robustness to MAPK signalling. *Mol Syst Biol* 7:489–489.
- Fritzsche S, Kenzelmann M, Hoffmann MJ, Müller M, Engers R, Gröne H-J, Schulz WA. 2006. Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 13:839–849.
- Gabay L, Seger R, Shilo BZ. 1997. In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* 277:1103–6.
- Galiana C, Lozano JC, Bancel B, Nakazawa H, Yamasaki H. 1995. High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus. *Mol*

Carcinog 14:286–93.

Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, et al. 2014a. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 159:176–187.

Gao G, Chen L, Huang C. 2014b. Anti-cancer drug discovery: update and comparisons in yeast, *Drosophila*, and zebrafish. *Curr Mol Pharmacol* 7:44–51.

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

Gao X, Pan D. 2001. TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev* 15:1383–1392.

García-Martínez JM, Alessi DR. 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416:375–385.

Garcia SB, Park HS, Novelli M, Wright NA. 1999. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. *J Pathol* 187:61–81.

Gardiol D, Zacchi A, Petrera F, Stanta G, Banks L. 2006. Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int J Cancer* 119:1285–1290.

Garénaux E, Kanagawa M, Tsuchiyama T, Hori K, Kanazawa T, Goshima A, Chiba M, Yasue H, Ikeda A, Yamaguchi Y, Sato C, Kitajima K. 2015. Discovery, primary, and crystal structures and capacitation-related properties of a prostate-derived heparin-binding protein WGA16 from boar sperm. *J Biol Chem* 290:5484–501.

Gateff E. 1978. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 200:1448–59.

Gateff E, Schneiderman HA. 1969. Neoplasms in mutant and cultured wild-type tissues of *Drosophila*. *Natl Cancer Inst Monogr* 31:365–97.

Géminard C, Rulifson EJ, Léopold P. 2009. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metab* 10:199–207.

Georgescu M-M. 2010. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* 1:1170–1177.

Ghiglione C, Carraway KL, Amundadottir LT, Boswell RE, Perrimon N, Duffy JB. 1999. The transmembrane molecule kerkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* 96:847–56.

Gil J, Kerai P, Leonart M, Bernard D, Cigudosa JC, Peters G, Carnero A, Beach D. 2005. immortalization of Primary Human Prostate Epithelial Cells by c-Myc. *Cancer Res* 65:2179–2185.

Gilchrist AS, Partridge L. 2000. Why it is difficult to model sperm displacement in *Drosophila melanogaster*: the relation between sperm transfer and copulation duration. *Evolution* 54:534–42.

Gioeli D. 2005. *Clinical Science*.

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

- Gioeli D, Wunderlich W, Sebolt-Leopold J, Bekiranov S, Wulfkühle JD, Petricoin EF, Conaway M, Weber MJ. 2011. Compensatory Pathways Induced by MEK Inhibition Are Effective Drug Targets for Combination Therapy against Castration-Resistant Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther* 10:1581–1590.
- Gladstone M, Su TT. 2011. Chemical genetics and drug screening in *Drosophila* cancer models. *J Genet Genomics* 38:497–504.
- Glasheen BM, Robbins RM, Piette C, Beitel GJ, Page-McCaw A. 2010. A matrix metalloproteinase mediates airway remodeling in *Drosophila*. *Dev Biol* 344:772–783.
- Gleason DF, Mellinger GT. 1974. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111:58–64.
- Golic KG, Lindquist S. 1989. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59:499–509.
- Gómez-Acebo I, Dierssen-Sotos T, Fernandez-Navarro P, Palazuelos C, Moreno V, Aragonés N, Castaño-Vinyals G, Jiménez-Monleón JJ, Ruiz-Cerdá JL, Pérez-Gómez B, Ruiz-Dominguez JM, Molero JA, et al. 2017. Risk Model for Prostate Cancer Using Environmental and Genetic Factors in the Spanish Multi-Case-Control (MCC) Study. *Sci Rep* 7:8994.
- Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. 2014. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel)* 6:1298–327.
- González-Reyes A, Elliott H, St Johnston D. 1995. Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* 375:654–658.
- Gotoh A, Shirakawa T, Wada Y, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Hamada K. 2003. The growth inhibitory effect of p21 adenovirus on androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. *BJU Int* 92:314–8.
- Graham L, Banda K, Torres A, Carver BS, Chen Y, Pisano K, Shelkey G, Curley T, Scher HI, Lotan TL, Hsieh AC, Rathkopf DE. 2018. A phase II study of the dual mTOR inhibitor MLN0128 in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* 36:458–467.
- Grant CM, Kyprianou N. 2013. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl Androl Urol* 2:202–211.
- Grifoni D, Sollazzo M, Fontana E, Froidi F, Pession A. 2015. Multiple strategies of oxygen supply in *Drosophila* malignancies identify tracheogenesis as a novel cancer hallmark. *Sci Rep* 5:9061.
- Grignon DJ. 2004. Unusual subtypes of prostate cancer. *Mod Pathol* 17:316–327.
- Grishina IB, Kim SY, Ferrara C, Makarenkova HP, Walden PD. 2005. BMP7 inhibits branching morphogenesis in the prostate gland and interferes with Notch signaling. *Dev Biol* 288:334–347.
- Guo L, Degenstein L, Fuchs E. 1996. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 10:165–75.
- Guo X, Wang X-F. 2009. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res* 19:71–88.
- Guo Y, Jacobs SC, Kyprianou N. 1997. Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer. *Int J cancer* 71:573–9.

- Guo Y, Kyprianou N. 1999. Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 59:1366–71.
- Gupta A, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Lotan Y, Zlotta AR, Shariat SF. 2008. Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14:7385–90.
- Gur G, Rubin C, Katz M, Amit I, Citri A, Nilsson J, Amariglio N, Henriksson R, Rechavi G, Hedman H, Wides R, Yarden Y. 2004. LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J* 23:3270–3281.
- Gurel B, Iwata T, M Koh C, Jenkins RB, Lan F, Dang C Van, Hicks JL, Morgan J, Cornish TC, Sutcliffe S, Isaacs WB, Luo J, et al. 2008. Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol* 21:1156–1167.
- Hadorn E. 1968. Transdetermination in cells. *Sci Am* 219:110–4 *passim*.
- Hadorn E, Gsell R, Schultz J. 1970. Stability of a position-effect variegation in normal and transdetermined larval blastemas from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65:633–7.
- Haj FG, Markova B, Klamann LD, Bohmer FD, Neel BG. 2003. Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Protein Tyrosine Phosphatase-1B. *J Biol Chem* 278:739–744.
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E. 2002. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4:850–858.
- Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353–64.
- Harris KA, Reese DM. 2001. Treatment options in hormone-refractory prostate cancer: current and future approaches. *Drugs* 61:2177–92.
- Hauge C, Frödin M. 2006. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119:3021–3.
- Hay BA, Guo M. 2003. Coupling cell growth, proliferation, and death. Hippo weighs in. *Dev Cell* 5:361–3.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)* 155:94–103.
- Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, Narayan P. 1995. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 31:14–24.
- Herndon LA, Wolfner MF. 1995. A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10114–8.
- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23:1515–1527.
- Hill KM, Kalifa S, Das JR, Bhatti T, Gay M, Williams D, Taliferro-Smith L, Marzo AM De. 2010. The role of PI 3-kinase p110 β in AKT signaling, cell survival, and proliferation in human prostate cancer cells. *Prostate* 70:n/a-n/a.
- Hill R, Madureira PA, Waisman DM, Lee PWK. 2011. DNA-PKCS binding to p53 on the p21WAF1/CIP1 promoter blocks transcription resulting in cell death. *Oncotarget* 2:1094–108.

- Hill R, Song Y, Cardiff RD, Dyke T Van. 2005. Heterogeneous Tumor Evolution Initiated by Loss of pRb Function in a Preclinical Prostate Cancer Model. *Cancer Res* 65:10243–10254.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. 1991. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6961–5.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA. 1980. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37:115–32.
- Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. 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 L, Pu Y, Hu WY, Birch L, Luccio-Camelo D, Yamaguchi T, Prins GS. 2009. The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol* 328:188–199.
- Huang Z, Hurley PJ, Simons BW, Marchionni L, Berman DM, Ross AE, Schaeffer EM. 2012. Sox9 is required for prostate development and prostate cancer initiation. *Oncotarget* 3:651–63.
- Huggins C, Hodges C V. 1941. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res* 1:293–297.
- Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, Day ML. 1995. Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 147:386–96.
- Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. 1997. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 322 (Pt 3):809–14.
- Ingham PW, Nakano Y, Seger C. 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet* 12:393–406.
- Iwata T, Schultz D, Hicks J, Hubbard GK, Mutton LN, Lotan TL, Bethel C, Lotz MT, Yegnasubramanian S, Nelson WG, Dang C V., Xu M, et al. 2010. MYC Overexpression Induces Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Loss of Nkx3.1 in Mouse Luminal Epithelial Cells. *PLoS One* 5:e9427.
- Izumi K, Fang L-Y, Mizokami A, Namiki M, Li L, Lin W-J, Chang C. 2013. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med* 5:1383–1401.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rügge MA, Hall A, Hall MN. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6:1122–1128.
- Jafari S, Etminan M, Afshar K. 2009. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Can Urol Assoc J* 3:323–330.
- Jarrard DF, Bova GS, Ewing CM, Pin SS, Nguyen SH, Baylin SB, Cairns P, Sidransky D, Herman JG, Isaacs WB. 1997. Deletional, mutational, and methylation analyses of CDKN2 (p16/MTS1) in primary and metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 19:90–6.
- Jathak MK, Steele TM, Siddiqui S, Mooso BA, D'Abronzio LS, Drake CM, Ghosh PM. 2018. Abstract 868: The pan-ErbB inhibitor dacomitinib but not the dual EGFR/ErbB2 inhibitor

- lapatinib disrupts membrane localization of the EGFR family of receptor tyrosine kinases. *Cancer Res* 78:868–868.
- Javaherian K, Lee T-Y, Sjin RMTT, Parris GE, Hlatky L. 2011. Two Endogenous Antiangiogenic Inhibitors, Endostatin and Angiostatin, Demonstrate Biphasic Curves in their Antitumor Profiles. *Dose-Response* 9:dose-response.1.
- Jefferies MT, Cox AC, Shorning BY, Meniel V, Griffiths D, Kynaston HG, Smalley MJ, Clarke AR. 2017. PTEN loss and activation of K-RAS and β -catenin cooperate to accelerate prostate tumourigenesis. *J Pathol* 243:442–456.
- Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T. 2001. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410:1111–1116.
- Johnston LA. 2014. Socializing with MYC: cell competition in development and as a model for premalignant cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4:a014274.
- Joniau S, Goeman L, Pennings J, Poppel H Van. 2005. Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN): Importance and Clinical Management. *Eur Urol* 48:379–385.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16–23.
- Kakehi Y, Oka H, Mitsumori K, Itoh N, Ogawa O, Yoshida O. 1996. Elevation of serum transforming growth factor- β 1 Level in patients with metastatic prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 2:131–135.
- Kalb JM, DiBenedetto AJ, Wolfner MF. 1993. Probing the function of *Drosophila melanogaster* accessory glands by directed cell ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8093–8097.
- Kalinska M, Meyer-Hoffert U, Kantyka T, Potempa J. 2016. Kallikreins – The melting pot of activity and function. *Biochimie* 122:270–282.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420–8.
- Kamachi Y, Kondoh H. 2013. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* 140:4129–4144.
- Kannan K, Fridell Y-WC. 2013. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Front Physiol* 4:288.
- Kario E, Marmor MD, Adamsky K, Citri A, Amit I, Amariglio N, Rechavi G, Yarden Y. 2005. Suppressors of Cytokine Signaling 4 and 5 Regulate Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *J Biol Chem* 280:7038–7048.
- Kasai S, Sugimura K, Matsumoto K, Nishi N, Kishimoto T, Nakamura T. 1996. Hepatocyte Growth Factor Is a Paracrine Regulator of Rat Prostate Epithelial Growth. *Biochem Biophys Res Commun* 228:646–652.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141:52–67.
- Khan MI, Hamid A, Adhami VM, Lall RK, Mukhtar H. 2015. Role of epithelial mesenchymal transition in prostate tumorigenesis. *Curr Pharm Des* 21:1240–8.
- Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K-L. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 10:935–945.

- Kim LC, Cook RS, Chen J. 2017. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* 36:2191–2201.
- Kim MJ, Bhatia-Gaur R, Banach-Petrosky WA, Desai N, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR, Cardiff RD, Shen MM, Abate-Shen C. 2002a. Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 62:2999–3004.
- Kim MJ, Cardiff RD, Desai N, Banach-Petrosky WA, Parsons R, Shen MM, Abate-Shen C. 2002b. Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 99:2884–2889.
- Kim Y, Nirenberg M. 1989. Drosophila NK-homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7716–20.
- Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, Yan J, Foster TH, Gao H, Sun Y, Ouyang X, Gerald WL, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. 2008. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 118:3051–64.
- Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. 1996. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85:721–32.
- Klotz L. 2006. Combined androgen blockade: an update. *Urol Clin North Am* 33:161–6, v–vi.
- Kokontis JM, Lin H-P, Jiang SS, Lin C-Y, Fukuchi J, Hiipakka RA, Chung C-J, Chan T-M, Liao S, Chang C-H, Chuu C-P. 2014. Androgen Suppresses the Proliferation of Androgen Receptor-Positive Castration-Resistant Prostate Cancer Cells via Inhibition of Cdk2, CyclinA, and Skp2. *PLoS One* 9:e109170.
- Komatsu N, Fujita Y, Matsuda M, Aoki K. 2015. mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells. *Oncogene* 34:5607–5616.
- Krätzschar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD. 1996. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem* 236:827–36.
- Kreisberg JJ, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, Ghosh PM. 2004. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 64:5232–6.
- Kruithof-de Julio M, Shibata M, Desai N, Reynon M, Halili MV, Hu Y-P, Price SM, Abate-Shen C, Shen MM. 2013. Canonical Wnt signaling regulates Nkx3.1 expression and luminal epithelial differentiation during prostate organogenesis. *Dev Dyn* 242:1160–1171.
- Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R, Etzioni R, Bolouri H, Montgomery B, White T, Lucas JM, Brown LG, et al. 2016. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med* 22:369–378.
- Kwak MK, Johnson DT, Zhu C, Lee SH, Ye D-W, Luong R, Sun Z. 2013. Conditional Deletion of the Pten Gene in the Mouse Prostate Induces Prostatic Intraepithelial Neoplasms at Early Ages but a Slow Progression to Prostate Tumors. *PLoS One* 8:e53476.
- Kwon O-J, Valdez JM, Zhang L, Zhang B, Wei X, Su Q, Ittmann MM, Creighton CJ, Xin L. 2014. Increased Notch signalling inhibits anoikis and stimulates proliferation of prostate luminal epithelial cells. *Nat Commun* 5:4416.

- la Cova C de, Abril M, Bellosta P, Gallant P, Johnston LA. 2004. *Drosophila myc* regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* 117:107–16.
- Laflamme BA, Wolfner MF. 2013. Identification and function of proteolysis regulators in seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 80:80–101.
- Lai EC. 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131:965–973.
- Lake D, Corrêa SAL, Müller J. 2016. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci* 73:4397–4413.
- Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Streit M, Hawighorst T, Detmar M, Pike SE, Tosato G. 2001. The Angiogenesis Inhibitor Vasostatin does not Impair Wound Healing at Tumor-Inhibiting Doses. *J Invest Dermatol* 117:1036–1041.
- Laplane M, Sabatini DM. 2012. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149:274–293.
- Lau YF, Zhang J. 2000. Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer. *Mol Carcinog* 27:308–21.
- Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, Witte ON. 2007. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 104:181–186.
- Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. 2011. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40:565–575.
- Lee JR, Urban S, Garvey CF, Freeman M. 2001. Regulated Intracellular Ligand Transport and Proteolysis Control EGF Signal Activation in *Drosophila*. *Cell* 107:161–171.
- Lee M, Garkovenko E, Yun J, Weijerman P, Peehl D, Chen L, Rhim J. 1994. Characterization of adult human prostatic epithelial-cells immortalized by polybrene-induced DNA transfection with a plasmid containing an origin-defective sv40-genome. *Int J Oncol* 4:821–30.
- Lee SH, Poulogiannis G, Pyne S, Jia S, Zou L, Signoretti S, Loda M, Cantley LC, Roberts TM. 2010. A constitutively activated form of the p110beta isoform of PI3-kinase induces prostatic intraepithelial neoplasia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11002–7.
- Lei Q, Jiao J, Xin L, Chang C-J, Wang S, Gao J, Gleave ME, Witte ON, Liu X, Wu H. 2006. NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell* 9:367–378.
- Leong KG, Wang B-E, Johnson L, Gao W-Q. 2008. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* 456:804–808.
- Lepor H. 2005. A review of surgical techniques for radical prostatectomy. *Rev Urol* 7 Suppl 2:S11-7.
- Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S. 1996. Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 144:1041–7.
- Levine AC, Liu X-H, Greenberg PD, Eliashvili M, Schiff JD, Aaronson SA, Holland JF, Kirschenbaum A. 1998. Androgens Induce the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Fetal Prostatic Fibroblasts¹. *Endocrinology* 139:4672–4678.
- Levine BD, Cagan RL. 2016. *Drosophila* Lung Cancer Models Identify Trametinib plus Statin as Candidate Therapeutic. *Cell Rep* 14:1477–1487.
- Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B,

- Yarden Y. 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12:3663–74.
- Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565–570.
- Li Y, Luo H, Liu T, Zacksenhaus E, Ben-David Y. 2015. The ets transcription factor Fli-1 in development, cancer and disease. *Oncogene* 34:2022–31.
- Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. 2008. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 8:268–278.
- Lin CY, Lovén J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA. 2012. Transcriptional Amplification in Tumor Cells with Elevated c-Myc. *Cell* 151:56–67.
- Lin D, Xue H, Wang Y, Wu R, Watahiki A, Dong X, Cheng H, Wyatt AW, Collins CC, Gout PW, Wang Y. 2014. Next generation patient-derived prostate cancer xenograft models. *Asian J Androl* 16:407–12.
- Lin H-K, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee S-W, Chan C-H, Yang W-L, Wang J, Egia A, Nakayama KI, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, et al. 2010. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* 464:374–379.
- Lin Y, Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Xiang J. 2007. Up-regulation of Bcl-2 is required for the progression of prostate cancer cells from an androgen-dependent to an androgen-independent growth stage. *Cell Res* 17:531–536.
- Lintig FC von, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. 2000. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62:51–62.
- Liotta LA, Kohn EC. 2001. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature* 411:375–379.
- Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, Phillips J, Gallo E, Yu Y, Williams K, Brenot A, Gordon JI, Werb Z. 2010. Matrix Metalloproteinases Contribute Distinct Roles in Neuroendocrine Prostate Carcinogenesis, Metastasis, and Angiogenesis Progression. *Cancer Res* 70:2224–2234.
- Litvinov I V., Marzo AM De, Isaacs JT. 2003. Is the Achilles’ Heel for Prostate Cancer Therapy a Gain of Function in Androgen Receptor Signaling? *J Clin Endocrinol Metab* 88:2972–2982.
- Llano E, Adam G, Pendás AM, Quesada V, Sánchez LM, Santamariá I, Noselli S, López-Otín C. 2002. Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 277:23321–9.
- Llano E, Pendás AM, Aza-Blanc P, Kornberg TB, López-Otín C. 2000. Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem* 275:35978–85.
- Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J. 2005. Rheb Binding to Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Is Regulated by Amino Acid Sufficiency. *J Biol Chem* 280:23433–23436.
- Loubeau G, Boudra R, Maquaire S, Lours-Calet C, Beaudoin C, Verrelle P, Morel L. 2014. NPM1 Silencing Reduces Tumour Growth and MAPK Signalling in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* 9:e96293.
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J. 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70:431–42.

- Lu L, Schulz H, Wolf DA. 2002. The F-box protein SKP2 mediates androgen control of p27 stability in LNCaP human prostate cancer cells. *BMC Cell Biol* 3:22.
- Lu W, Luo Y, Kan M, McKeehan WL. 1999. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* 274:12827–34.
- Ma L, Li J, Nie Q, Zhang Q, Liu S, Ge D, You Z. 2017. Organoid culture of human prostate cancer cell lines LNCaP and C4-2B. *Am J Clin Exp Urol* 5:25–33.
- Macri E, Loda M. 1998. Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 17:337–44.
- Maddison LA, Huss WJ, Barrios RM, Greenberg NM. 2004. Differential expression of cell cycle regulatory molecules and evidence for a ?cyclin switch? during progression of prostate cancer. *Prostate* 58:335–344.
- Madhus IH, Stang E. 2009. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci* 122:3433–3439.
- Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JI. 2002. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8:1168–71.
- Mallo M, Alonso CR. 2013. The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development* 140:3951–3963.
- Mandel A, Larsson P, Sarwar M, Semenas J, Syed Khaja AS, Persson JL. 2018. The interplay between AR, EGF receptor and MMP-9 signaling pathways in invasive prostate cancer. *Mol Med* 24:34.
- Marin-Aguilera M, Codony-Servat J, Reig O, Lozano JJ, Fernandez PL, Pereira M V., Jimenez N, Donovan M, Puig P, Mengual L, Bermudo R, Font A, et al. 2014. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediates Docetaxel Resistance and High Risk of Relapse in Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther* 13:1270–1284.
- Martin P, Liu Y-N, Pierce R, Abou-Kheir W, Casey O, Seng V, Camacho D, Simpson RM, Kelly K. 2011. Prostate Epithelial Pten/TP53 Loss Leads to Transformation of Multipotential Progenitors and Epithelial to Mesenchymal Transition. *Am J Pathol* 179:422–435.
- Martin TA, Mason MD, Jiang WG. 2014. HGF and the regulation of tight junctions in human prostate cancer cells. *Oncol Rep* 32:213–224.
- Marzo AM De, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7:256–269.
- Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert A-P, Noel S, Lafitte J-J, Sculier J-P. 2005. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 92:131–139.
- Mattoon DR, Lamothe B, Lax I, Schlessinger J. 2004. The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol* 2:24.
- McCartney BM, Kulikaukas RM, LaJeunesse DR, Fehon RG. 2000. The neurofibromatosis-2 homologue, Merlin, and the tumor suppressor expanded function together in *Drosophila* to regulate cell proliferation and differentiation. *Development* 127:1315–24.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. 2003. Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*. *Science* (80-) 302:1765–1768.

- McGuire SE, Mao Z, Davis RL. 2004. Spatiotemporal Gene Expression Targeting with the TARGET and Gene-Switch Systems in *Drosophila*. *Sci Signal* 2004:pl6-pl6.
- McNeal JE. 1978. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 15:340–5.
- McNeal JE. 1988. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 12:619–33.
- Medrano A, Fernández-Novell JM, Ramió L, Alvarez J, Goldberg E, Montserrat Rivera M, Guinovart JJ, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2006. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73:369–378.
- Memarzadeh S, Xin L, Mulholland DJ, Mansukhani A, Wu H, Teitell MA, Witte ON. 2007. Enhanced Paracrine FGF10 Expression Promotes Formation of Multifocal Prostate Adenocarcinoma and an Increase in Epithelial Androgen Receptor. *Cancer Cell* 12:572–585.
- Mendoza MC, Er EE, Blenis J. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 36:320–8.
- Merino MM, Levayer R, Moreno E. 2016. Survival of the Fittest: Essential Roles of Cell Competition in Development, Aging, and Cancer. *Trends Cell Biol* 26:776–788.
- Miles WO, Dyson NJ, Walker JA. 2011. Modeling tumor invasion and metastasis in *Drosophila*. *Dis Model Mech* 4:753–61.
- Miller CM, Page-McCaw A, Broihier HT. 2007. Matrix metalloproteinases promote motor axon fasciculation in the *Drosophila* embryo. *Development* 135:95–109.
- Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schwenker M. 2002. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem* 277:31099–31106.
- Moll UM, Petrenko O. 2003. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1:1001–8.
- Montano X, Djamgoz MB. 2004. Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. *FEBS Lett* 571:1–8.
- Morata G, Ballesteros-Arias L. 2015. Cell competition, apoptosis and tumour development. *Int J Dev Biol* 59:79–86.
- Morata G, Ripoll P. 1975. Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* 42:211–21.
- Moreno E, Basler K. 2004. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* 117:117–29.
- Mortimer NT, Moberg KH. 2009. Regulation of *Drosophila* embryonic tracheogenesis by dVHL and hypoxia. *Dev Biol* 329:294–305.
- Mosaad EO, Chambers KF, Futrega K, Clements JA, Doran MR. 2018. The Microwell-mesh: A high-throughput 3D prostate cancer spheroid and drug-testing platform. *Sci Rep* 8:253.
- Mouraviev V, Polascik TJ. 2006. Update on cryotherapy for prostate cancer in 2006. *Curr Opin Urol* 16:152–156.
- Mukherjee R, Bartlett JMS, Krishna NS, Underwood MA, Edwards J. 2005. Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer. *Prostate* 64:101–107.
- Mukherjee R, McGuinness DH, McCall P, Underwood MA, Seywright M, Orange C, Edwards J. 2011. Upregulation of MAPK pathway is associated with survival in castrate-resistant prostate cancer. *Br J Cancer* 104:1920–8.
- Mulholland DJ, Kobayashi N, Ruscetti M, Zhi A, Tran LM, Huang J, Gleave M, Wu H. 2012.

- Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res* 72:1878–89.
- Murray NP, Reyes E, Tapia P, Badínez L, Orellana N. 2012. Differential Expression of Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Disseminated Tumor Cells and Micrometastasis in Bone Marrow of Patients with Nonmetastatic and Metastatic Prostate Cancer: Theoretical Considerations and Clinical Implications—An Immunocytochemical Study. *Bone Marrow Res* 2012:1–9.
- Nagano A, Ohno T, Shimizu K, Hara A, Yamamoto T, Kawai G, Saitou M, Takigami I, Matsushashi A, Yamada K, Takei Y. 2010. EWS/Fli-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A. *Int J Cancer* 126:NA-NA.
- Nanternet P V., Xu J, Yu Y, Hodor P, Holder D, Adamski S, Gentile MA, Kimmel DB, Harada S, Gerhold D, Freedman LP, Ray WJ. 2004. Identification of Genetic Pathways Activated by the Androgen Receptor during the Induction of Proliferation in the Ventral Prostate Gland. *J Biol Chem* 279:1310–1322.
- Neto-Silva RM, Beco S de, Johnston LA. 2010. Evidence for a Growth-Stabilizing Regulatory Feedback Mechanism between Myc and Yorkie, the Drosophila Homolog of Yap. *Dev Cell* 19:507–520.
- Neuman-Silberberg FS, Schüpbach T. 1993. The Drosophila dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* 75:165–74.
- Nicholson SE, Metcalf D, Sprigg NS, Columbus R, Walker F, Silva A, Cary D, Willson TA, Zhang J-G, Hilton DJ, Alexander WS, Nicola NA. 2005. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci* 102:2328–2333.
- Nieto M, Finn S, Loda M, Hahn WC. 2007. Prostate cancer: Re-focusing on androgen receptor signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1562–8.
- Nieto MA. 2011. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:347–376.
- Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Nojima M, Inoue R, Kitamura H, Tanaka T, Asanuma H, Sato N, Masumori N. 2015. Expression of hepatocyte growth factor in prostate cancer may indicate a biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Anticancer Res* 35:413–8.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* 287:795–801.
- Oefelein M, Chin-Chance C, Bushman W. 1996. Expression of the homeotic gene Hox-d13 in the developing and adult mouse prostate. *J Urol* 155:342–6.
- Oertel M, Menthena A, Dabeva MD, Shafritz DA. 2006. Cell Competition Leads to a High Level of Normal Liver Reconstitution by Transplanted Fetal Liver Stem/Progenitor Cells. *Gastroenterology* 130:507–520.
- Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T. 2011. Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in Drosophila. *Dev Cell* 20:315–28.
- Oldham S, Hafen E. 2003. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol* 13:79–85.
- Oliver ER, Saunders TL, Tarlé SA, Glaser T. 2004. Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* 131:3907–3920.

- Ornitz DM, Itoh N. 2015. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4:215–66.
- Orr B, Grace OC, Vanpoucke G, Ashley GR, Thomson AA. 2009. A Role for Notch Signaling in Stromal Survival and Differentiation during Prostate Development. *Endocrinology* 150:463–472.
- Ousset M, Keymeulen A Van, Bouvencourt G, Sharma N, Achouri Y, Simons BD, Blanpain C. 2012. Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *Nat Cell Biol* 14:1131–1138.
- Overall CM, López-Otín C. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2:657–672.
- Page-McCaw A, Serano J, Santé JM, Rubin GM. 2003. Drosophila matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev Cell* 4:95–106.
- Pagliarini RA, Xu T. 2003. A Genetic Screen in Drosophila for Metastatic Behavior. *Science* (80-) 302:1227–1231.
- Parisi F, Riccardo S, Daniel M, Saqcena M, Kundu N, Pession A, Grifoni D, Stocker H, Tabak E, Bellosta P. 2011. Drosophila insulin and target of rapamycin (TOR) pathways regulate GSK3 beta activity to control Myc stability and determine Myc expression in vivo. *BMC Biol* 9:65.
- Park H, Kim Y, Sul J-W, Jeong IG, Yi H-J, Ahn JB, Kang JS, Yun J, Hwang JJ, Kim C-S. 2015. Synergistic anticancer efficacy of MEK inhibition and dual PI3K/mTOR inhibition in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 75:1747–1759.
- Partridge L, Gems D. 2002. The evolution of longevity. *Curr Biol* 12:R544-6.
- Pawelcz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin III EF, Liotta LA. 2001. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 20:1981–1989.
- Pearson HB, Pless TJ, Clarke AR. 2009a. K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. *Cancer Res* 69:94–101.
- Pearson HB, Pless TJ, Clarke AR. 2009b. K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. *Cancer Res* 69:94–101.
- Peng J, Zipperlen P, Kubli E. 2005. Drosophila Sex-Peptide Stimulates Female Innate Immune System after Mating via the Toll and Imd Pathways. *Curr Biol* 15:1690–1694.
- Perletti G, Montanari E, Vral A, Gazzano G, Marras E, Mione S, Magri V. 2009. Inflammation, prostatitis, proliferative inflammatory atrophy: ‘Fertile ground’ for prostate cancer development? *Mol Med Rep* 3:3–12.
- Perrimon N, McMahon AP. 1999. Negative feedback mechanisms and their roles during pattern formation. *Cell* 97:13–6.
- Pettaway CA, Pathak S, Greene G, Ramirez E, Wilson MR, Killion JJ, Fidler IJ. 1996. Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2:1627–36.
- Podlasek CA, Barnett DH, Clemens JQ, Bak PM, Bushman W. 1999a. Prostate Development Requires Sonic Hedgehog Expressed by the Urogenital Sinus Epithelium. *Dev Biol* 209:28–39.
- Podlasek CA, Clemens JQ, Bushman W. 1999b. Hoxa-13 gene mutation results in abnormal seminal vesicle and prostate development. *J Urol* 161:1655–61.

- Podlasek CA, Duboule D, Bushman W. 1997. Male accessory sex organ morphogenesis is altered by loss of function of Hoxd-13. *Dev Dyn* 208:454–465.
- Podlasek CA, Seo RM, Clemens JQ, Ma L, Maas RL, Bushman W. 1999c. Hoxa-10 deficient male mice exhibit abnormal development of the accessory sex organs. *Dev Dyn* 214:1–12.
- Pointis G, Latreille MT, Cedard L. 1980. Gonado-pituitary relationships in the fetal mouse at various times during sexual differentiation. *J Endocrinol* 86:483–8.
- Pointis G, Latreille MT, Mignot TM, Janssens Y, Cedard L. Regulation of testosterone synthesis in the fetal mouse testis. *J Steroid Biochem* 11:1609–12.
- Poltilove RM, Jacobs AR, Haft CR, Xu P, Taylor SI. 2000. Characterization of *Drosophila* insulin receptor substrate. *J Biol Chem* 275:23346–54.
- Poulson DF. 1945. Chromosomal Control of Embryogenesis in *Drosophila*. *Am Nat* 79:340–363.
- Poulson DF. 1950. Histogenesis, organogenesis, and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* Meigen. *Biol Drosoph* 168–274.
- Prescott JL, Blok L, Tindall DJ. 1998. Isolation and androgen regulation of the human homeobox cDNA, NKX3.1. *Prostate* 35:71–80.
- Prins GS, Putz O. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 76:641–659.
- Priulla M, Calastretti A, Bruno P, Amalia A, Paradiso A, Canti G, Nicolin A. 2007. Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase. *Prostate* 67:782–789.
- Pu Y, Huang L, Prins GS. 2004. Sonic hedgehog-patched Gli signaling in the developing rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Dev Biol* 273:257–275.
- Puca L, Bareja R, Prandi D, Shaw R, Benelli M, Karthaus WR, Hess J, Sigouros M, Donoghue A, Kossai M, Gao D, Cyrta J, et al. 2018. Patient derived organoids to model rare prostate cancer phenotypes. *Nat Commun* 9:2404.
- Puig O, Tjian R. 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19:2435–46.
- Qi M, Liu Z, Shen C, Wang L, Zeng J, Wang C, Li C, Fu W, Sun Y, Han B. 2015. Overexpression of ETV4 is associated with poor prognosis in prostate cancer: involvement of uPA/uPAR and MMPs. *Tumor Biol* 36:3565–3572.
- Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Herath JF, Lieber MM, Jenkins RB. 1995. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 55:5408–14.
- Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X, Tian Y. 2015. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med* 19:315–326.
- Ram KR, Wolfner MF. 2007. Sustained Post-Mating Response in *Drosophila melanogaster* Requires Multiple Seminal Fluid Proteins. *PLoS Genet* 3:e238.
- Ram KR, Wolfner MF. 2009. A network of interactions among seminal proteins underlies the long-term postmating response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15384–9.
- Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. 2003. Proximal events in signaling by plasma

membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278:2701–12.

Read RD, Cavenee WK, Furnari FB, Thomas JB. 2009. A *Drosophila* Model for EGFR-Ras and PI3K-Dependent Human Glioma. *PLoS Genet* 5:e1000374.

Rebello RJ, Pearson RB, Hannan RD, Furic L. 2017. Therapeutic Approaches Targeting MYC-Driven Prostate Cancer. *Genes (Basel)* 8:.

Reich A, Shilo B-Z. 2002. Keren, a new ligand of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *EMBO J* 21:4287.

Ribeiro FR, Jerónimo C, Henrique R, Fonseca D, Oliveira J, Lothe RA, Teixeira MR. 2006. 8q Gain Is an Independent Predictor of Poor Survival in Diagnostic Needle Biopsies from Prostate Cancer Suspects. *Clin Cancer Res* 12:3961–3970.

Ricciardi MR, Scerpa MC, Bergamo P, Ciuffreda L, Petrucci MT, Chiaretti S, Tavolaro S, Mascolo MG, Abrams SL, Steelman LS, Tsao T, Marchetti A, et al. 2012. Therapeutic potential of MEK inhibition in acute myelogenous leukemia: rationale for “vertical” and “lateral” combination strategies. *J Mol Med* 90:1133–1144.

Rigaud J, Tiguert R, Decobert M, Hovington H, Latulippe E, Laverdiere J, Larue H, Lacombe L, Fradet Y. 2004. Expression of p21 cell cycle protein is an independent predictor of response to salvage radiotherapy after radical prostatectomy. *Prostate* 58:269–276.

Roberts E, Cossigny DAF, Quan GMY. 2013. The role of vascular endothelial growth factor in metastatic prostate cancer to the skeleton. *Prostate Cancer* 2013:418340.

Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. 2007. [Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes]. *Rev Esp Cardiol* 60:959–67.

Rossi F, Gonzalez C. 2015. Studying tumor growth in *Drosophila* using the tissue allograft method. *Nat Protoc* 10:1525–1534.

Roth S, Neuman-Silberberg FS, Barcelo G, Schüpbach T. 1995. cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81:967–78.

Roy S, Kaur M, Agarwal C, Tecklenburg M, Sclafani RA, Agarwal R. 2007. p21 and p27 induction by silibinin is essential for its cell cycle arrest effect in prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 6:2696–2707.

Roy S, Singh RP, Agarwal C, Siriwardana S, Sclafani R, Agarwal R. 2008. Downregulation of both p21/Cip1 and p27/Kip1 produces a more aggressive prostate cancer phenotype. *Cell Cycle* 7:1828–35.

Ruan D, He J, Li C-F, Lee H-J, Liu J, Lin H-K, Chan C-H. 2017. Skp2 deficiency restricts the progression and stem cell features of castration-resistant prostate cancer by destabilizing Twist. *Oncogene* 36:4299–4310.

Rubin C, Litvak V, Medvedovsky H, Zwang Y, Lev S, Yarden Y. 2003. Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr Biol* 13:297–307.

Ruscetti MA, Wu H, Ruscetti MA, Wu H. 2013. Chapter 4 PTEN in Prostate Cancer. *Mol Biol Genet* 16:.

Russo G, Mischi M, Scheepens W, la Rosette JJ De, Wijkstra H. 2012. Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. *BJU Int* 110:E794–E808.

Russo GI, Cimino S, Giranio G, Regis F, Favilla V, Privitera S, Motta F, Caltabiano R, Stenzl A, Todenhöfer T, Morgia G. 2018. Metabolic syndrome is not associated with greater evidences

of proliferative inflammatory atrophy and inflammation in patients with suspected prostate cancer. *Urol Oncol* 36:240.e21-240.e26.

Rylett CM, Walker MJ, Howell GJ, Shirras AD, Isaac RE. 2007. Male accessory glands of *Drosophila melanogaster* make a secreted angiotensin I-converting enzyme (ANCE), suggesting a role for the peptide-processing enzyme in seminal fluid. *J Exp Biol* 210:3601–6.

Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. 1993. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 150:379–85.

Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. 2008. Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell* 133:403–414.

Samatar AA, Poulikakos PI. 2014. Targeting RAS–ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 13:928–942.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. 2008. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science* (80-) 320:1496–1501.

Sancho M, Di-Gregorio A, George N, Pozzi S, Sánchez JM, Pernaute B, Rodríguez TA. 2013. Competitive Interactions Eliminate Unfit Embryonic Stem Cells at the Onset of Differentiation. *Dev Cell* 26:19–30.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. 2006. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159–168.

Sarkar FH, Li Y, Sakr WA, Grignon DJ, Madan SS, Wood DP, Adsay V. 1999. Relationship of p21(WAF1) expression with disease-free survival and biochemical recurrence in prostate adenocarcinomas (PCa). *Prostate* 40:256–60.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Wetering M van de, Barker N, Stange DE, Es JH van, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459:262–265.

Scherl A, Li J-F, Cardiff RD, Schreiber-Agus N. 2004. Prostatic intraepithelial neoplasia and intestinal metaplasia in prostates of probasin-RAS transgenic mice. *Prostate* 59:448–459.

Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211–25.

Schnakenberg SL, Siegal ML, Bloch Qazi MC. 2012. Oh, the places they’ll go. *Spermatogenesis* 2:224–235.

Schultz C, Meier M, Schmid H-P. 2011. Nutrition, dietary supplements and adenocarcinoma of the prostate. *Maturitas* 70:339–342.

Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV. 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9:437–448.

Segatto O, Anastasi S, Alema S. 2011. Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors. *J Cell Sci* 124:1785–1793.

Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721–732.

Seth A, Watson DK. 2005. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41:2462–2478.

Shannon JM, Cunha GR. 1983. Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *Prostate* 4:367–73.

- Shappell SB, Thomas G V, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. 2004. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 64:2270–305.
- Sharifi N. 2013. Mechanisms of Androgen Receptor Activation in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Endocrinology* 154:4010–4017.
- Sharma A, Yeow W-S, Ertel A, Coleman I, Clegg N, Thangavel C, Morrissey C, Zhang X, Comstock CES, Witkiewicz AK, Gomella L, Knudsen ES, et al. 2010. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest* 120:4478–92.
- Shilo B-Z, Bach EA, Paraiso Y, Carraway KL, Noselli S, Perrimon N. 2005. Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development* 132:4017–27.
- Shilo BZ. 2003. Signaling by the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res* 284:140–9.
- Shim E-H, Johnson L, Noh H-L, Kim Y-J, Sun H, Zeiss C, Zhang H. 2003. Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate. *Cancer Res* 63:1583–8.
- Shim J, Gururaja-Rao S, Banerjee U. 2013. Nutritional regulation of stem and progenitor cells in Drosophila. *Development* 140:4647–4656.
- Short SM, Wolfner MF, Lazzaro BP. 2012. Female Drosophila melanogaster suffer reduced defense against infection due to seminal fluid components. *J Insect Physiol* 58:1192–1201.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66:7–30.
- Signoretti S, Pires MM, Lindauer M, Horner JW, Grisanzio C, Dhar S, Majumder P, McKeon F, Kantoff PW, Sellers WR, Loda M. 2005. p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc Natl Acad Sci* 102:11355–11360.
- Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M. 2000. p63 Is a Prostate Basal Cell Marker and Is Required for Prostate Development. *Am J Pathol* 157:1769–1775.
- Siiteri PK, Wilson JD. 1974. Testosterone Formation and Metabolism During Male Sexual Differentiation in the Human Embryo. *J Clin Endocrinol Metab* 38:113–125.
- Simcox AA, Grumblin G, Schnepf B, Bennington-Mathias C, Hersperger E, Shearn A. 1996. Molecular, Phenotypic, and Expression Analysis of vein, a Gene Required for Growth of the Drosophila Wing Disc. *Dev Biol* 177:475–489.
- Soares HP, Ming M, Mellon M, Young SH, Han L, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. 2015. Dual PI3K/mTOR Inhibitors Induce Rapid Overactivation of the MEK/ERK Pathway in Human Pancreatic Cancer Cells through Suppression of mTORC2. *Mol Cancer Ther* 14:1014–1023.
- Sobel R, Sadar M. 2005a. CELL LINES USED IN PROSTATE CANCER RESEARCH: A COMPENDIUM OF OLD AND NEW LINES—PART 1. *J Urol* 173:342–359.
- Sobel R, Sadar M. 2005b. CELL LINES USED IN PROSTATE CANCER RESEARCH: A COMPENDIUM OF OLD AND NEW LINES—PART 2. *J Urol* 173:360–372.
- Sogame N, Kim M, Abrams JM. 2003. Drosophila p53 preserves genomic stability by regulating cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4696–701.

- Sridhar SS, Hotte SJ, Chin JL, Hudes GR, Gregg R, Trachtenberg J, Wang L, Tran-Thanh D, Pham N-A, Tsao M-S, Hedley D, Dancey JE, et al. 2010. A Multicenter Phase II Clinical Trial of Lapatinib (GW572016) in Hormonally Untreated Advanced Prostate Cancer. *Am J Clin Oncol* 33:609–613.
- Srivastava A, Pastor-Pareja JC, Igaki T, Pagliarini R, Xu T. 2007. Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2721–6.
- Stapleton AM, Timme TL, Gousse AE, Li QF, Tobon AA, Kattan MW, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. 1997. Primary human prostate cancer cells harboring p53 mutations are clonally expanded in metastases. *Clin Cancer Res* 3:1389–97.
- Stark MB. 1919. A Benign Tumor that is Hereditary in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5:573–80.
- Steelman LS, Martelli AM, Nicoletti F, McCubrey JA. 2011. Exploiting p53 status to enhance effectiveness of chemotherapy by lowering associated toxicity. *Oncotarget* 2:109–12.
- Stefanou D, Batistatou A, Kamina S, Arkoumani E, Papachristou DJ, Agnantis NJ. 2004. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *In Vivo* 18:155–60.
- Stegmayr B, Ronquist G. 1982. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 10:253–7.
- Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordóñez NG, Killion JJ, Fidler IJ. 1992. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 84:951–7.
- Stevens LJ, Page-McCaw A. 2012. A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing. *Mol Biol Cell* 23:1068–79.
- Stewart MJ, Berry CO, Zilberman F, Thomas G, Kozma SC. 1996. The *Drosophila* p70s6k homolog exhibits conserved regulatory elements and rapamycin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10791–6.
- Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman Ju. 2001. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma : evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor TRANSCRIPTS. *J Urol* 165:688–693.
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J cancer* 21:274–81.
- Sugimura Y, Foster BA, Hom YK, Lipschutz JH, Rubin JS, Finch PW, Aaronson SA, Hayashi N, Kawamura J, Cunha GR. 1996. Keratinocyte growth factor (KGF) can replace testosterone in the ductal branching morphogenesis of the rat ventral prostate. *Int J Dev Biol* 40:941–51.
- Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H. 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6199–204.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73–77.
- Sun XJ, Wang L-M, Zhang Y, Yenush L, Myers Jr MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH,

- White MF. 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377:173–177.
- Sun Y, Wang B-E, Leong KG, Yue P, Li L, Jhunjhunwala S, Chen D, Seo K, Modrusan Z, Gao W-Q, Settleman J, Johnson L. 2012. Androgen Deprivation Causes Epithelial-Mesenchymal Transition in the Prostate: Implications for Androgen-Deprivation Therapy. *Cancer Res* 72:527–536.
- Susic-Jung L, Hornbruch-Freitag C, Kuckwa J, Rexer K-H, Lammel U, Renkawitz-Pohl R. 2012. Multinucleated smooth muscles and mononucleated as well as multinucleated striated muscles develop during establishment of the male reproductive organs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 370:86–97.
- Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, Klagsbrun M. 1997. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* 272:31730–7.
- Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang C-Z, Huang J. 2011. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 71:1668–1679.
- Takahashi H, Shibuya M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 109:227–41.
- Tan PY, Chang CW, Chng KR, Wansa KDSA, Sung W-K, Cheung E. 2012. Integration of Regulatory Networks by NKX3-1 Promotes Androgen-Dependent Prostate Cancer Survival. *Mol Cell Biol* 32:399–414.
- Tanaka M, Komuro I, Inagaki H, Jenkins NA, Copeland NG, Izumo S. 2000. Nkx3.1, a murine homolog of *Drosophila* bagpipe, regulates epithelial ductal branching and proliferation of the prostate and palatine glands. *Dev Dyn* 219:248–60.
- Taniguchi K, Kokuryo A, Imano T, Minami R, Nakagoshi H, Adachi-Yamada T. 2014. Isoform-specific functions of Mud/NuMA mediate binucleation of *Drosophila* male accessory gland cells. *BMC Dev Biol* 14:46.
- Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA, Dam FS van. 2004. Cognitive Impairment Associated With Chemotherapy for Cancer: Report of a Workshop. *J Clin Oncol* 22:2233–2239.
- Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK. 2001. The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* 105:345–55.
- Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, et al. 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18:11–22.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231–241.
- Tenniswood M. 1986. Role of epithelial-stromal interactions in the control of gene expression in the prostate: an hypothesis. *Prostate* 9:375–85.
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG. 2012. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 9:338–350.
- Thangavel C, Boopathi E, Liu Y, Haber A, Ertel A, Bhardwaj A, Addya S, Williams N, Ciment SJ, Cotzia P, Dean JL, Snook A, et al. 2017. RB Loss Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res* 77:982–995.

- Thiery JP. 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442–454.
- Thiery JP. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15:740–6.
- Thiolloy S, Halpern J, Holt GE, Schwartz HS, Mundy GR, Matrisian LM, Lynch CC. 2009. Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-7, but not matrix metalloproteinase-9, contributes to tumor-induced osteolysis. *Cancer Res* 69:6747–55.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA. 2004. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *N Engl J Med* 350:2239–2246.
- Thomsen MK, Francis JC, Swain A. 2008. The role of Sox9 in prostate development. *Differentiation* 76:728–735.
- Thomson AA, Cunha GR. 1999. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development* 126:3693–701.
- Thomson AA, Marker PC. 2006. Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *Differentiation* 74:382–392.
- Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 15:7–24.
- Timms BG. 2008. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* 76:565–577.
- Toivanen R, Shen MM. 2017. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development* 144:1382–1398.
- Toker A, Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673–676.
- Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, Cao Q, Prensner JR, Rubin MA, Shah RB, Mehra R, Chinnaiyan AM. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10:177–88.
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, Kalyana-Sundaram S, Wei JT, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB, Chinnaiyan AM. 2007. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 39:41–51.
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE, Cao X, Wei JT, Rubin MA, Shah RB, Chinnaiyan AM. 2006. *TMPRSS2:ETV4* Gene Fusions Define a Third Molecular Subtype of Prostate Cancer. *Cancer Res* 66:3396–3400.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, et al. 2005. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science* (80-) 310:644–648.
- Tomlinson DC, Freestone SH, Grace OC, Thomson AA. 2004. Differential Effects of Transforming Growth Factor- β 1 on Cellular Proliferation in the Developing Prostate. *Endocrinology* 145:4292–4300.
- Truong LD, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, Scardino PT, Thompson TC. 1993. Association of transforming growth factor-beta 1 with prostate cancer: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 24:4–9.
- Tsai W-B, Aiba I, Long Y, Lin H-K, Feun L, Savaraj N, Kuo MT, Kuo MT. 2012. Activation

of Ras/PI3K/ERK Pathway Induces c-Myc Stabilization to Upregulate Argininosuccinate Synthetase, Leading to Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells.

Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H. 1999. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* 9:661–4.

Turke AB, Song Y, Costa C, Cook R, Arteaga CL, Asara JM, Engelman JA. 2012. MEK Inhibition Leads to PI3K/AKT Activation by Relieving a Negative Feedback on ERBB Receptors. *Cancer Res* 72:3228–3237.

Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166:2472–83.

Udby L, Lundwall A, Johnsen AH, Fernlund P, Valtonen-André C, Blom AM, Lilja H, Borregaard N, Kjeldsen L, Bjartell A. 2005. beta-Microseminoprotein binds CRISP-3 in human seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 333:555–61.

Ueda Y, Hirai S i, Osada S i, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. 1996. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 271:23512–9.

Urban S, Lee JR, Freeman M. 2001. Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107:173–82.

Urban S, Lee JR, Freeman M. 2002. A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all Drosophila membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J* 21:4277–86.

Valdez JM, Zhang L, Su Q, Dakhova O, Zhang Y, Shahi P, Spencer DM, Creighton CJ, Ittmann MM, Xin L. 2012. Notch and TGF β form a reciprocal positive regulatory loop that suppresses murine prostate basal stem/progenitor cell activity. *Cell Stem Cell* 11:676–88.

Vandenbroucke RE, Libert C. 2014. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov* 13:904–927.

Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:195–203.

Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, Rooij HC van, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. 1990. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 173:534–40.

Verhagen AP, Aalders TW, Ramaekers FC, Debruyne FM, Schalken JA. 1988. Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate* 13:25–38.

Verheul HMW, Pinedo HM. 2007. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer* 7:475–485.

Verhoef EI, Koliijn K, Herdt MJ De, Steen B van der, Hoogland AM, Sleddens HFBM, Looijenga LHJ, Leenders GJLH van. 2016. MET expression during prostate cancer progression. *Oncotarget* 7:31029–36.

Verze P, Cai T, Lorenzetti S. 2016. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol* 13:379–386.

Wagenlehner F, Pilatz A, Linn T, Diemer T, Schuppe HC, Schagdarsurengin U, Hossain H, Meinhardt A, Ellem S, Risbridger G, Weidner W. 2013. Prostatitis and andrological

implications. *Minerva Urol Nefrol* 65:117–23.

Walker MJ, Rylett CM, Keen JN, Audsley N, Sajid M, Shirras AD, Isaac RE. 2006. Proteomic identification of *Drosophila melanogaster* male accessory gland proteins, including a pro-cathepsin and a soluble γ -glutamyl transpeptidase. *Proteome Sci* 4:9.

Wang B, Shou J, Ross S, Koeppen H, Sauvage FJ de, Gao W-Q. 2003a. Inhibition of Epithelial Ductal Branching in the Prostate by Sonic Hedgehog Is Indirectly Mediated by Stromal Cells. *J Biol Chem* 278:18506–18513.

Wang H, Sun D, Ji P, Mohler J, Zhu L. 2008. An AR-Skp2 pathway for proliferation of androgen-dependent prostate-cancer cells. *J Cell Sci* 121:2578–2587.

Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. 2006a. Expression of Variant TMPRSS2/ERG Fusion Messenger RNAs Is Associated with Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Res* 66:8347–8351.

Wang M, Liu A, Garcia FU, Rhim JS, Stearns ME. 1999. Growth of HPV-18 immortalized human prostatic intraepithelial neoplasia cell lines. Influence of IL-10, follistatin, activin-A, and DHT. *Int J Oncol* 14:1185–95.

Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, Thomas G V., Li G, Roy-Burman P, Nelson PS, Liu X, Wu H. 2003b. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4:209–221.

Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, Thomas G V, Li G, Roy-Burman P, Nelson PS, Liu X, Wu H. 2003c. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4:209–21.

Wang X-D, Leow CC, Zha J, Tang Z, Modrusan Z, Radtke F, Aguet M, Sauvage FJ de, Gao W-Q. 2006b. Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* 290:66–80.

Wang X, Page-McCaw A. 2014. A matrix metalloproteinase mediates long-distance attenuation of stem cell proliferation. *J Cell Biol* 206:923–936.

Wang Y, Revelo MP, Sudilovsky D, Cao M, Chen WG, Goetz L, Xue H, Sadar M, Shappell SB, Cunha GR, Hayward SW. 2005. Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue. *Prostate* 64:149–159.

Ward JPT. 2008. Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1777:1–14.

Wart HE Van, Birkedal-Hansen H. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5578–82.

Watanabe, Nakayama, Shiraishi, Stemmermann, Yatani. 2000. Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol Oncol* 5:274–283.

Watson KL, Chou MM, Blenis J, Gelbart WM, Erikson RL. 1996. A *Drosophila* gene structurally and functionally homologous to the mammalian 70-kDa s6 kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13694–8.

Webber MM. 1979. Normal and benign human prostatic epithelium in culture. I. Isolation. *In Vitro* 15:967–82.

Weber MJ, Gioeli D. 2004. Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 91:13–25.

Weerden WM van, Romijn JC. 2000. Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. *Prostate* 43:263–71.

- Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, West DW, Teh CZ, Stamey T. 1995. Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* 141:732–40.
- Wilson C, Leiblich A, Goberdhan DCI, Hamdy F. 2017. The *Drosophila* Accessory Gland as a Model for Prostate Cancer and Other Pathologies. *Curr Top Dev Biol* 121:339–375.
- Woenckhaus J, Fenic I. 2008. Proliferative inflammatory atrophy: a background lesion of prostate cancer? *Andrologia* 40:134–137.
- Wolfner MF. 1997. Tokens of love: Functions and regulation of *drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem Mol Biol* 27:179–192.
- Woodhouse E, Hersperger E, Shearn A. 1998. Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes. *Dev Genes Evol* 207:542–50.
- Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LW. 1994. Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J cancer* 57:406–12.
- Wu X, Xu K, Zhang L, Deng Y, Lee P, Shapiro E, Monaco M, Makarenkova HP, Li J, Lepor H, Grishina I. 2011. Differentiation of the ductal epithelium and smooth muscle in the prostate gland are regulated by the Notch/PTEN-dependent mechanism. *Dev Biol* 356:337–349.
- Xu T, Rubin GM. 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117:1223–37.
- Xue L, Noll M. 2000. *Drosophila* female sexual behavior induced by sterile males showing copulation complementation. *Proc Natl Acad Sci* 97:3272–3275.
- Xue L, Noll M. 2002. Dual role of the Pax gene paired in accessory gland development of *Drosophila*. *Development* 129:.
- Yadav SS, Stockert JA, Hackert V, Yadav KK, Tewari AK. 2018. Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*.
- Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. 1999. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126:1211–23.
- Yan G, Fukabori Y, Nikolaropoulos S, Wang F, McKeehan WL. 1992. Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Mol Endocrinol* 6:2123–2128.
- Yang G, Ayala G, Marzo A De, Tian W, Frolov A, Wheeler TM, Thompson TC, Harper JW. 2002. Elevated Skp2 protein expression in human prostate cancer: association with loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and PTEN and with reduced recurrence-free survival. *Clin Cancer Res* 8:3419–26.
- Yang HW, Shin M-G, Lee S, Kim J-R, Park WS, Cho K-H, Meyer T, Do Heo W. 2012. Cooperative Activation of PI3K by Ras and Rho Family Small GTPases. *Mol Cell* 47:281–290.
- Yang RM, Naitoh J, Murphy M, Wang HJ, Phillipson J, deKernion JB, Loda M, Reiter RE. 1998. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 159:941–5.
- Yang Y, Lu Y, Wang L, Mizokami A, Keller ET, Zhang J, Fu J. 2016. Skp2 is associated with paclitaxel resistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 36:559–566.
- Yarnitzky T, Min L, Volk T. 1997. The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates

inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes Dev* 11:2691–700.

Yasuda K, Nagakawa O, Akashi T, Fujiuchi Y, Koizumi K, Komiya A, Saiki I, Fuse H. 2009. Serum active hepatocyte growth factor (AHGF) in benign prostatic disease and prostate cancer. *Prostate* 69:346–351.

Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. 1999. Androgen and epidermal growth factor down-regulate cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and costimulate proliferation of MDA PCa 2a and MDA PCa 2b prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 5:2171–7.

Yoon S, Seger R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21–44.

Yu M, Bushman W. 2013. Differential stage-dependent regulation of prostatic epithelial morphogenesis by Hedgehog signaling. *Dev Biol* 380:87–98.

Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. 2000. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 14:2712–24.

Zhang T-J, Hoffman BG, Ruiz de Algora T, Helgason CD. 2006. SAGE reveals expression of Wnt signalling pathway members during mouse prostate development. *Gene Expr Patterns* 6:310–324.

Zhou Y, Rideout WM, Zi T, Bressel A, Reddypalli S, Rancourt R, Woo J-K, Horner JW, Chin L, Chiu MI, Bosenberg M, Jacks T, et al. 2010. Chimeric mouse tumor models reveal differences in pathway activation between ERBB family- and KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Nat Biotechnol* 28:71–78.

Zhu J, Blenis J, Yuan J. 2008. Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proc Natl Acad Sci* 105:6584–6589.

Zhu M-L, Kyprianou N. 2010. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *FASEB J* 24:769–777.

Ziosi M, Baena-López LA, Grifoni D, Frolidi F, Pession A, Garoia F, Trotta V, Bellosta P, Cavicchi S, Pession A. 2010. dMyc Functions Downstream of Yorkie to Promote the Supercompetitive Behavior of Hippo Pathway Mutant Cells. *PLoS Genet* 6:e1001140.