HAL
open science

# Rôle de la Nucléophosmine (NPM1) dans la physiopathologie prostatique

Rafik Boudra

## To cite this version:

Rafik Boudra. Rôle de la Nucléophosmine (NPM1) dans la physiopathologie prostatique. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22598 . tel-01379611

**HAL Id: tel-01379611**

**https://theses.hal.science/tel-01379611**

Submitted on 11 Oct 2016

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL UNIVERSITE D'AUVERGNE

N° D.U. 2598 Année 2015

***Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement.***

N° d'Ordre 673

# THESE

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

# DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires)

Soutenue publiquement le 25 septembre 2015

**Rafik Boudra**

---

## Rôle de la Nucléophosmine (NPM1) dans la physiopathologie prostatique

---

| | |
|---|---|
| Président | Pr. Pierre Verrelle, EA7283, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand |
| Rapporteurs | Dr. Jocelyn Céraline, INSERM U1113, Université de Strasbourg<br>Dr Carmen Garrido, INSERM U866, Université de Bourgogne |
| Examinateurs | Dr Laurent Le Cam, IRCM, INSERM U1194, Université de Montpellier<br>Dr Serge Manié, CRCL, CNRS UMR 5286, INSERM U1052 Université de Lyon |
| Directeur de thèse | Pr Claude Beaudoin, GReD, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, Clermont-Ferrand |

Laboratoire de Génétique, Reproduction et Développement (GReD)
UMR CNRS 6293, Clermont Université, INSERM U1103

**REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier:

Le Professeur Pierre Verrelle, le Docteur Jocelyn Céraline, le Docteur Carmen Garrido, le Docteur Laurent Le Cam ainsi que le docteur Serge Manié d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

***Les membres de l'équipe "Signalisation Hormonale et Cancer de la Prostate".***

Claude, ça y est nous en sommes venus à bout. Le chemin a été long et semé d'embuches mais le travail que nous avons réalisé en valait bien la peine! Merci de m'avoir fait confiance dès mon entrée en M2 et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Merci pour ton encadrement et pour les bons moments, studieux ou pas, passés dans ce bureau, en salle café, au Nota Bene, ou à la terrasse des bars atypiques de Sitges. J'ai beaucoup appris en travaillant avec toi et j'espère que nous garderons contact après mon départ.

Laurent, tu fais partie de ces professeurs qui, par leur grande pédagogie, éveillent la curiosité et motivent de jeunes étudiants en Master à se lancer dans une carrière scientifique. Ta grande connaissance et ta patience ont fait que les discussions que j'ai pu avoir avec toi ont toujours été un plaisir. Merci pour tous ces bons moments, que ce soit au labo ou sur les pistes de ski à Aussois.

Corinne, merci pour ta disponibilité et ton engagement qui nous ont permis de mener à bien le travail sur les souris transgéniques. Merci pour ta gentillesse et les conseils donnés qui m'ont été précieux.

Cyrille, merci pour ton sens de l'humour si particulier qui nous a permis de passer le temps pendant ces longues matinées de sacrifice. Merci également pour ton engagement dans mon projet et pour toutes ces discussions que nous avons eu à propos de mon projet. Elles m'ont beaucoup aidé à surmonter les moments de creux. Au vu des résultats que tu as obtenu très récemment, je ne doute pas que ton travail portera ses fruits très rapidement.

Sabrina et Gaëlle, je vous remercie de votre accueil dans l'équipe et de tous les petits "trucs et astuces" techniques qui m'ont grandement simplifiés mes manips.

Je voudrai également remercier tous les étudiants passés plus ou moins longtemps, dans l'équipe. Rosyne, Martina et Colin, partager le labo et le bureau avec vous fut un vrai plaisir.

Un grand merci à mes compagnons de labo, Angélique et Jean-Paul. Votre gentillesse et votre dévouement rendent la vie au labo bien plus facile. Je ne manquerait pas de vous laisser une petite compil' de Jazz avant de partir pour que vous ne déprimiez pas trop.

***Les jumeaux maléfiques.***

Silvère et Pierre, je ne vous remercierais jamais assez de l'implication que vous avez eu pour m'aider lorsque je me heurtais à des murs techniques ou conceptuels. Merci également pour les précieux coups de mains concernant l'écriture de mes lettres de motivation et mes CV. Enfin, merci pour tous les bons moments passés hors du labo! Je suis sûr que nos petites taquineries vont vous manquer, même si d'autres ont déjà pris la relève!

***Les membres du GReD "Cézeaux".***

Jean-Marc, à l'image de Laurent, tu fais partie de ces professeurs qui m'ont marqué par leur pédagogie et leur passion pour la science. Au laboratoire, tu m'as également marqué par ton humour fin et racé (ahhh la compote de figue...) et ta bonne humeur quotidienne.

J.-C., sans toi, les pots n'aurait pas eu la même saveur. J'ai beaucoup apprécié tous les moments de déconne que l'on a pu avoir, en salle café, au Nota ou lors des traditionnels barbecues estivaux.

Françoise, merci de ne pas m'avoir brisé les genoux lorsque j'étais en retard pour te donner mes comptes rendus de service de monitorat! Ca a toujours été un plaisir de te côtoyer, même si je sais que Mike fait mieux les commandes que moi...

Isa, merci pour ta bonne humeur permanente et pour le gros travail de l'ombre que tu effectues pour gérer les stocks.

Antoine et Marie, je vous remercie d'avoir toujours été curieux à propos de mon projet, me permettant ainsi d'avoir avec vous des discussions scientifiques très enrichissantes.

David, merci de nous avoir fait apprécier la nourriture du RU en nous affamant lors de tes discussions de 11h30 avec Marine.

Fabrice, au début, c'était mal parti entre nous... Entre la terreur que ton physique nous inspirait en cours (110 kg tout de même!) et l'exécution en règle subie lors de mon rapport de stage de M1 (un peu méritée, j'avoue), nos relation n'étaient pas forcément au beau fixe! Heureusement, la suite a été plus agréable et j'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions, les petits délires et les verres en terrasses!

Ayhan, tu m'as été d'une grande aide lorsque ma motivation était à son plus bas et que j'étais prêt lâcher l'affaire. Je te remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir regonflé à bloc pour mener ce travail à bien.

Marie-Jo Turner et Maryse, merci pour votre gentillesse et pour tout le travail de l'ombre qui nous a grandement facilité la vie pour les déplacements, les commandes, les financements...

Je remercie tous les étudiants, passés ou présents, pour leur bonne humeur et les liens professionnels et amicaux que l'on a tissés durant ces années. Je vous souhaite le meilleur dans votre vie personnelle et professionnelle.

Je remercie aussi les membres du pôle de recherche sur les légumes pour les moments passés ensembles.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer durant ces 4 ans et demi.

***Mon harem,***

Coco, merci d'avoir été notre mère poule! La vie administrative a vraiment été beaucoup plus facile grâce à tes multiples rappels et tes modèles de mails à renvoyer! Au delà du côté pratique, tu as toujours fait preuve d'une grande écoute quand je venais pleurer sur mes manips pourries ou sur ma vie sociale pleine de rebondissements. Malgré tes désormais célèbres "yeux revolver" quand tu t'es levé du mauvais pied, j'ai toujours pris un très grand plaisir à passer des moments avec toi. On se revoit tout bientôt à New York!

Heidi, aka "la surmachine". Tu viens d'une autre planète... D'abord pour ta réussite professionnelle hors du commun! Un peu énervante je dois l'avouer, mais c'est la jalousie qui parle. Et puis ensuite pour ce méga smile accroché à ton visage 24h/24, 7/7. Ne change jamais ça, c'est un don du ciel. Merci pour tous ces moments de bonne humeur que tu injectais dans notre quotidien de thésards dépressifs. J'en suis sûr, une dose de Heidi par jour, ça vaut tous les anxiolytiques du monde!

Marine, tu sais que "qui aime bien châtie bien". Et Dieu sait qu'on s'est châtié pendant cette thèse! Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté, dès le Master 2, lors de ces coups de fils post-boulots, et jusqu'à aujourd'hui, avec mon petit mode d'emploi du parfait demandeur de visa! Petit bémol tout de même: impossible de gagner un prix en congrès quand on est en compète avec toi, à la longue, c'est un peu relou :) Ne lâche rien à l'avenir, je suis sûr que t'es faites pour ce métier!

Marion, ça commence à faire un bail! Et j'espère que ce n'est pas près de s'arrêter! On ne s'est pas vu très souvent ces dernières années à cause de ton installation dans le grand Nord, et il est vrai que je ne suis pas un dingue du téléphone... mais les soirées passées ensembles ont toujours été très agréables, même quand ça tournait en discussion de sourds, que seuls nos esprits de contradiction de compète pouvaient générer! On t'attend pour le post-doc, maintenant t'as plus le choix, il nous faut un pied-à-terre à San Francisco!

Toutes les 4, merci pour ces innombrables litres bus à la terrasse des Beaux-Arts et du P'tit Bouch', pour ces escapades à Sancerre ou à Soulages, pour ces bureaux et ces vidéos de marteaux, pour la leucémie, pour l'assymétrie des grains de beautés, pour la girafe, contre le rhinocéros, pour les nibards en pièce jointe, pour la position 0, pour les pauses de 10h, de midi, de 13h, de 17h, pour le confort visuel, pour les cappus, pour le gour, pour les soirées chez les uns, chez les autres. Merci d'avoir été mes collègues mais surtout, merci d'être mes amies.

Micka, merci de m'avoir culturé au niveau hip-hop ("It's the sound of da police"!), et pour nous avoir préparé tous ces bons petits plats lors des soirées chez vous. Je m'y suis habitué mec, va falloir que tu déchires niveau hamburger quand je viendrai vous voir à NYC!

Gaulthier, merci pour cet humour très...médical et pour tes anecdotes toujours très croustillantes!

Fab, étant donné ta "double-nationalité", ton paragraphe vient après, section "hangouts"!

Stouffy, on ne s'est pas croisé souvent, mais à chaque fois c'était l'occasion de bonnes barres de rire! On remettra ça t'inquiètes!

***Aux copains de la fac,***

JeanJo, il parait un peu loin maintenant le temps des soirées rue Massillon! Je n'oublierai pas ces dix dernières années ensemble, et je peux t'assurer que mon foie non plus. J'espère que tes projets se concrétiseront rapidement et qu'on ne se perdra pas de vue malgré l'éloignement!

Kevin, aka "le Barry White de la Kronenbourg". A chaque fois que je lis "prostate cancer", et ça arrive souvent, j'ai une pensée émue pour tes matins difficiles au labo! Ton humour, qui transparait jusque dans ton intitulé, va me manquer. Presque autant que tes hashtags! J'espère que tu passeras ce concours rapidement pour être calé que tu verras la vie avec Géraldine en rose...et vert.

Ludo, merci pour ces soirées au Baraka, particulièrement celles en mode duvet! T'as décidément un truc avec les couvertures! Et merci pour ta bonne humeur permanente et tes jeux de mots un peu douteux...

Mamie, malgré tes articulations un peu vieillissantes, je dois bien avouer que t'as retrouvé une seconde jeunesse depuis quelque temps! Je suis très content de t'avoir rencontré et je te souhaite de valider ton post-doc comme il se doit. On vous attend, toi et Mike, de l'autre côté de l'Atlantique.

Matthias, Monsieur Confort Visuel, Ricard et Costume 3 pièces! Merci pour ces pauses d'été à siroter un p'tit jaune, et pour ces soirées folles qui se finissaient invariablement sales au Baraka! Continue à bien t'occuper de tes tomates et d'Heidi à Cambridge!

***A la famille "Hangout",***

Vous étiez là bien avant le début de cette aventure, et vous le serez encore bien après. Alors, merci pour toutes nos soirées, tous nos coup de gueules, tous nos fous rires, nos vacances, nos journées à la mer (badibadoum) et nos soirées à Amsterdam. Merci pour les tarots, les belotes, les Mario Kart et les Gros Poulets. Merci pour tous ces fions, pour ces boobs, pour ces pifs, pour ces chicos. Merci pour ces afterwork, ces festivals, ces concerts, ces "blancs". Merci pour tous ces souvenirs, ces pertes de mémoires, ces photos, ces vidéos et même ces averses localisées. Merci de m'avoir supporté mais surtout de m'avoir porté jusque là. Merci de m'avoir fait grandir. Merci d'avoir été là pour le jour J, mais aussi pour tous les autres jours. Merci pour tout. Je vous aime putain!

***A ma famille,***

Mes parents, à qui je dois tout. Merci d'avoir mis votre vie entre parenthèse pour nous offrir un avenir. De vous être constamment battus pour que l'on ne manque de rien, en dépit d'une situation financière critique. De nous avoir imposé une discipline quelquefois quasi militaire pour pas que l'on sombre du côté obscur. De nous avoir inculqué le respect des autres et l'ouverture d'esprit. De nous servir d'exemples, peu de personnes peuvent se targuer d'avoir commencé où vous avez commencé pour arriver où vous en êtes aujourd'hui! Cette réussite, c'est d'abord la votre. Merci pour tout.

Mes soeurs, je vous souhaite de continuer sur cette lancée et de récolter très prochainement le fruit de votre travail. Et surtout gagner un max de flouze (nan j'rigole...)!

Tout le reste de ma famille, d'ici et d'ailleurs, qu'il serait beacoup trop long de citer. Merci pour tous les moments passés ensembles, de Constantine à Dole, en passant par Alger et Paris. Et un petit clin d'oeil à ceux qui ont pu se libérer pour le jour de la soutenance, votre présence a beaucoup compté pour moi!

***A mon Poney,***

T'es arrivé en cours de route, mais j'aurai eu bien du mal à négocier la dernière ligne droite sans ta présence. Ton soutien, tes petits plats, tes constantes attentions ont été de la plus grande importance pendant cette période ô combien difficile. Ce travail, je te le dois en grande partie! Au delà de la thèse, avoir été à tes côtés durant cette dernière année a montré que j'aurai aussi bien du mal à négocier le reste de ma vie sans toi, gros poney!

***A Zizou...***

# Résumé

La Nucléophosmine (NPM1/B23) est une petite chaperonne moléculaire impliquée dans de nombreux processus cellulaires, tels que la régulation de l'expression génique ou le contrôle du cycle cellulaire. De nombreuses études rapportent une surexpression de NPM1 dans divers types de tumeurs solides incluant les cancers de la prostate, et son rôle pro-prolifératif dans des lignées cellulaires tumorales d'origines variées est bien établi. La première partie de notre travail s'est attaché à évaluer le potentiel oncogénique de NPM1 dans l'épithélium prostatique *in vivo.* Pour cela, nous avons généré un modèle de souris transgéniques qui surexpriment NPM1 spécifiquement dans l'épithélium de la prostate. Ces animaux présentent une hyperplasie prostatique associée à une augmentation de l'index prolifératif de l'épithélium. Nos expériences révèlent que NPM1 pourrait lever la quiescence des cellules épithéliales différenciées en dérégulant l'expression de gènes clés de la régulation du cycle cellulaire, comme la Cycline E ou $p27^{kip1}$. Bien que ces souris ne développent pas de lésions néoplasiques, ces données suggèrent que NPM1 participe à la carcinogenèse prostatique en association avec d'autres lésions oncogéniques. La seconde partie du travail visait à comprendre la nature des mécanismes qui supportent la surexpression de NPM1 dans les tumeurs prostatiques. Des données récentes de la littérature indiquent un enrichissement de la protéine kinase mTOR au niveau du promoteur proximal de NPM1 dans des foies de souris. Pour déterminer s'il existe un lien fonctionnel entre mTOR et NPM1, nous avons tiré parti d'un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris invalidés pour le suppresseur de tumeur PTEN dont l'inactivation mène à une hyperactivité de mTOR. Dans ce contexte, les taux d'ARNm et de protéines NPM1 sont augmentés par rapport aux cellules sauvages. Nos résultats montrent également que mTOR contrôle l'expression de NPM1 i) en se fixant sur son promoteur et en stimulant l'expression du gène et ii) en stabilisant l'ARNm de NPM1. Nous avons confirmé le lien entre NPM1 et mTOR *in vivo* grâce à notre modèle de souris invalidées pour PTEN dans l'épithélium prostatique. Enfin, nous avons montré que l'expression de NPM1 est nécessaire pour transduire les effets prolifératifs de la voie PI3K/AKT/mTOR. Ces données placent donc NPM1 comme nouvel effecteur en aval de cette voie de signalisation, faisant de cette protéine une potentielle cible thérapeutique dans les tumeurs présentant une perte de PTEN.

# Abstract

Nucleophosmin (NPM1/B23) is a small molecular chaperone involved in a large array of cellular processes, including the regulation of gene expression and the control of the cell cycle. Several studies have reported the overexpression of NPM1 in solid tumors from various histological origin, including prostate cancer, and its proliferative impact on several human cancer cell line is being well described. The first part of our work aimed at assessing the NPM1 oncogenic properties in the prostate gland *in vivo*. To do so, we generated a new transgenic mouse model that overexpresses NPM1 specifically in the prostatic epithelium. These mice harbor prostatic hyperplasia associated with an increase of the ki67 proliferative index. Our molecular investigations revealed that NPM1 could be an inhibitor of the quiescent state of epithelial cells through a dysregulation of key cell-cycle controlers such as Cyclin E or p27kip1. Although these mice do not develop neoplastic lesions, our data suggest that NPM1 overexpression accelerate prostate cancer progression when associated with other oncogenic alterations. The second part of the work aimed at understanding the mechanisms underlying NPM1 overexpression in prostate tumors. The serine/threonine Kinase mTOR was recently shown to bind to the proximal promoter of NPM1 in the mouse liver. In order to characterize a fonctionnal link between NPM1 and mTOR, we took advantage of murine embryonic fibroblast (MEF) deleted for PTEN, since these cells display a constitutive mTOR activity. In such cells, NPM1 protein and mRNA levels are increased compared to wild type MEF. We also demonstrated that mTOR controls NPM1 expression i) through its binding to NPM1 promoter, thus stimulating NPM1 gene expression and ii) by stabilizing NPM1 mRNA. We have confirmed the functional link between NPM1 and mTOR *in vivo* in a mouse model deleted for PTEN specifically in the prostatic epithelium. Finally, we have shown that NPM1 expression is necessary for the proliferation of PTEN knock-out MEF. These data set NPM1 as a new downstream effector of the PI3K/AKT/mTOR pathway, and suggest that it could be a new potential therapeutic target in PTEN negative human prostate cancer.

**Mots Clés/Keywords:** Prostate, Cancer, Nucleophosmin, NPM1, PTEN, mTOR

## *Liste des Abréviations*

| | |
|---|---|
| **3/17β-HSD** | 3/17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase |
| **4E-BP1** | eucaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1 |
| **ACF :** | ATP-dependant Chromatin and Remodeling Factor |
| **ADN(c) :** | Acide Desoxyribonucléique (complémentaire) |
| **AF1/5 :** | Activating Function 1/5 |
| **AIB1 :** | Amplified In Breast Cancer 1 |
| **AKT/PKB :** | V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog/Protein Kinase B |
| **APAF-1 :** | Apoptotic Protease Activating Factor 1 |
| **AR :** | Androgen Receptor |
| **ARA70 :** | AR Associated Protein 70 kDa |
| **ARE :** | Androgen Responsive Element ou AU-rich Element |
| **ARF :** | Alternative Reading Frame |
| **(mi,si,linc)ARN(m/r/t) :** | (micro,small interfering, long intergenic non-coding) Acide Ribonucléique (messager/ribosomal/de transfert) |
| **ASF1 :** | Anti-Silencing Function 1 |
| **ATP :** | Adenosin Triphosphate |
| **AUF1 :** | AU-rich Element Binding Protein 1 |
| **BARD1 :** | BRCA1 Associated Ring Domain Protein 1 |
| **BAX :** | Bcl-2 Associated X |
| **BMP :** | Bone Morphogenetic Protein |
| **BPH :** | Benign Prostatic Hyperplasia |
| **BRCA1 :** | Breast Cancer 1 |
| **BRF1 :** | Butyrate Responsive Factor 1 |
| **CAD :** | Caspase Activated DNAse |
| **CAF1 :** | Chromatin Assembly Factor 1 |
| **CaP** | Cancer de la Prostate |
| **CARM1 :** | Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1 |
| **CAT :** | Chloramphénicol Acetyltransferase |
| **CBP/p300 :** | CREB-binding Protein/p300 |
| **CD44/117/133** | Cluster of Differentiation 44/117/133 |
| **Cdc-2 :** | Cell Division Cycle Protein 2 Homolog |
| **CDK 2/4/6 :** | Cyclin Dependant Kinase2/ 4/6 |
| **ChIP :** | Chromatin Immunoprecipitation |
| **CIP/KIP :** | CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein |
| **CKII :** | Casein Kinase II |
| **CK 5/8/14/18** | Cytokeratin 5/8/14/18 |
| **CKI :** | CDK Inhibitor |
| **c-Myc :** | cellular-Myelocytose |
| **CRPC :** | Castrate Resistant Prostate Cancer |
| **DBD :** | DNA Binding Domain |
| **DHEA(S) :** | Dihydroepiandrosterone (Sulfate) |
| **DHH :** | Desert Hedgehog |
| **DHT :** | Dihydrotestostérone |
| **dNLP :** | *drosophila melanogaster* Nucleoplasmin-like Protein |
| **DR3 :** | Direct Repeat 3 |
| **DP :** | E2F Dimerization Partner |

| | |
|---|---|
| **E2F1-8 :** | E2 Transcription Factor 1-8 |
| **EGF :** | Epidermal Growth Factor |
| **EGFR :** | Epidermal Growth Factor Receptor |
| **EMT :** | Epithelio-Mesenchymatous Transition |
| **Erk1/2 :** | Extracellular Regulated Protein Kinase |
| **ESC :** | Embryonnic Stem Cell |
| **(b)FGF :** | (basic)Fibroblast Growth Factor |
| **FKBP 12/52 :** | FK506 Binding Protein 12/52 |
| **Gli 1/2/3 :** | Glioma-associated Oncogene 1/2/3 |
| **GRB2 :** | Growth Factor Receptor Bound Protein 2 |
| **GRIP-1** | Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1 |
| **GST :** | Glutathione Sulfotransferase |
| **HA :** | Human Influenza Hemagglutinin |
| **HAT :** | Histone Acetyltransferase |
| **HDAC :** | Histone Deacetylase |
| **HDM :** | Histone Demethylase |
| **HEXIM1 :** | Hexamethylene Bis-Acetamide Inducible 1 |
| **HIF1 :** | Hypoxia-inducible Factor 1 |
| **HIRA :** | Histone Cell-cycle Regulation Defective Homolog A |
| **HMT :** | Histone Methyltransferase |
| **HoxA13/B13/D13 :** | Homeobox A13/B13/D13 |
| **HSP27/40/56/70/90 :** | Heat Shock Protein 27/40/56/70/90 |
| **HuR :** | Human Antigen R |
| **IGF :** | Insulin-like Growth Factor |
| **IHH :** | Indian Hedgehog |
| **IR3 :** | Inverted Repeat 3 |
| **JNK 1/2/3 :** | c-JunN-terminal Kinase 1/2/3 |
| **KD :** | Kinase Dead |
| **KGF :** | Keratinocyte Growth Factor |
| **KLK3 :** | Kallikrein 3 |
| **K-Ras** | Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog |
| **KSRP :** | KH Splicing Type Regulatory Protein |
| **LBD :** | Ligand Binding Domain |
| **LNCaP :** | Lymph Node Carcinoma of the Prostate |
| **MAPK :** | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| **MDM2 :** | Mouse Double Minute 2 |
| **MEK :** | Mapk/Erk Kinase |
| **MMP2 :** | Matrix Metalloproteinase 2 |
| **mTOR :** | mammalian Target of Rapamycin |
| **mTORC 1/2 :** | mTOR Complex 1/2 |
| **NAP1 :** | Nucleosome Assembly Protein 1 |
| **NASP :** | Nuclear Autoantigenic Sperm Protein |
| **NCoA-1/2 :** | Nuclear Receptor Coactivator 1/2 |
| **NCoR :** | Nuclear Receptor Corepressor |
| **Nek2A :** | NIMA-related Kinase 2A |
| **NF-κB :** | Nuclear Factor kappa B |
| **NKX3.1 :** | NK3 Homeobox 1 |
| **NLS :** | Nuclear Localisation Signal |
| **NMD :** | Non-sens Mediated mRNA Decay |
| **NPM 1/2/3 :** | Nucleophosmin 1/2/3 |
| **NSE :** | Neuron Specific Enolase |
| **OIS :** | Oncogene Induced Senescence |

| | |
|---|---|
| **$p27^{kip1}$ :** | p27 Cyclin-dependant Kinase Inhibitor 1 |
| **PARN :** | Poly(A)-specific Ribonuclease |
| **PC-3 :** | Prostate Cancer 3 |
| **pCAF :** | p300/CBP Associated Factor |
| **pCIP :** | CBP Interacting Protein |
| **PCNA :** | Proliferative Cell Nuclear Antigen |
| **PDCD4 :** | Programmed Cell Death protein 4 |
| **PDK 1/2 :** | Phosphoinositide Dependant Kinase 1/2 |
| **PGC1α :** | PPARγ Coactivator 1α |
| **PH :** | Pleckstrin Homology |
| **PI3K :** | Phosphoinositide-3-Kinase |
| **PIKK :** | Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase |
| **(LG/HG)PIN** | (Low Grade/High Grade)Prostatic Intraepithelial Neoplasia |
| **PIP3 :** | Phosphoinositide triphosphate |
| **PLK2 :** | Polo-like Kinase 2 |
| **PPARγ :** | Peroxysome Proliferator-activated Receptor Gamma |
| **PRMT :** | Protein Arginine Methyltransferase |
| **PSA :** | Prostate Specific Antigen |
| **Ptch1 :** | Patched 1 |
| **PtdIns :** | Phosphatidylinositol |
| **PTEN :** | Phosphatase and Tensin Homolog |
| **PTHrP :** | Parathyroid Hormon related Peptide |
| **RAC3 :** | RAR Associated Coactivator 3 |
| **RAF :** | Rapidly Accelerated Fibrosarcoma |
| **Rb :** | Retinoblastoma |
| **RNAi :** | RNA interference |
| **RNApolII :** | RNA polymerase II |
| **RNA-RAP :** | RNA-RNA Antisens Purification |
| **ROS :** | Reactive Oxygen Species |
| **RTK :** | Récepteur Tyrosine Kinase |
| **RT-qPCR** | Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction |
| **S6K :** | Ribosomal Protein S6 Kinase |
| **SCA1 :** | Stem Cell Antigen 1 |
| **SHH :** | Sonic Hedgehog |
| **SKP2 :** | S-phase Kinase Associated Protein 2 |
| **SMAD 4 :** | Similar Mothers Against Decapentaplegic 4 |
| **Smo :** | Smoothened |
| **SMRT :** | Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid Hormone Receptor |
| **SOS :** | Son Of Sevenless |
| **SRC-1/2/3 :** | Steroid Receptor Coactivator 1/2/3 |
| **STAT3 :** | Signal Transducer and Activator of Transcription 3 |
| **SUMO :** | Small Ubiquitin-like Modifier |
| **SV40 :** | Simian Virus 40 |
| **Tfm :** | Testicular Feminization |
| **TGFβ :** | Transforming Growth Factor β |
| **TGFβRI/II :** | Transforming Growth Factor β Receptor I/II |
| **TIF2 :** | Transcriptional Mediator/Intermediary Factor 2 |
| **TIP60 :** | Tat-Interacting Protein 60 kDa |
| **TMA :** | Tissue Macro Array |
| **TRAM1 :** | Thyroid Receptor Activator Molecule 1 |
| **TRAMP :** | Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate |
| **TSC 1/2** | Tuberin Sclerosis Complex 1/2 |

| | |
|---|---|
| **TTP :** | Tristetrapolin |
| **TUNEL :** | Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling |
| **UGM :** | Urogenital Mesenchyme |
| **UGS :** | Urogenital Sinus |
| **UTR :** | Untranslated Region |
| **UV :** | Ultra-Violet |
| **Wnt5a :** | Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5a |
| **YY1 :** | Ying-Yang 1 |

## *Liste des figures*


**Figure 1** Anatomie et histologie de la prostate humaine et murine

**Figure 2** Représentation schématique du sinus uro-génital mâle en coupe transversale

**Figure 3** Etapes du développement de la prostate chez l'homme et la souris

**Figure 4** Importance du mésenchyme uro-génital pour le développement prostatique

**Figure 5** Régulation du branchement de l'épithélium par les andromédines.

**Figure 6** Représentation schématique de la signalisation Hedgehog.

**Figure 7** Contrôle du branchement par sonic-hedgehog

**Figure 8** Coupe histologique et représentation schématique de l'épithélium prostatique humain

**Figure 9** Signature moléculaire des différents types cellulaires prostatiques

**Figure 10** Hierarchisation des cellules souches dans la prostate

**Figure 11** Evolution du carcinome prostatique

**Figure 12** Représentation schématique de la gradation de Gleason.

**Figure 13** Structure du récepteur des androgènes (AR)

**Figure 14** Mode d'action génomique du récepteur des androgènes (AR).

**Figure 15** Structure de la chromatine et des nucléosomes.

**Figure 16** Résidus ciblés par les principales modifications post-traductionnelles au sein des histones.

**Figure 17** Synthèse de testostérone au sein de la prostate.

**Figure 18** Principaux co-activateurs de AR impliqués dans le cancer de la prostate.

**Figure 19** La voie PI3K/AKT/mTOR.

**Figure 20** Régulation de mTORC1 par AKT.

**Figure 21** Composition et cibles du complexe mTORC2.

**Figure 22** La voie de signalisation MAPK/ERK.

**Figure 23** Différentes phases et points de contrôle du cycle cellulaire.

**Figure 24** Fenêtre d'activité des complexes Cyclines/CDK durant le cycle cellulaire.

**Figure 25** Le point de restriction et la transition G1/S.

**Figure 26** Rôle des chaperonnes HSP dans l'homéostasie protéique.

**Figure 27** Inhibition de l'apoptose par les HSP 27, 70 et 90.

**Figure 28.** Rôle des chaperonnes d'histone dans l'assemblage des nucléosomes.

**Figure 29** Principaux domaines structuraux des protéines NPM1, NPM2 et NPM3.

**Figure 30** Motifs et domaines fonctionnels de NPM1.

**Figure 31** Principaux sites de phosphorylation et d'acétylation de NPM1.

**Figure 32** Rôle antiprolifératif de NPM1

**Figure 33** Contrôle de la duplication des centrosomes par NPM1.

**Figure 34** Etapes de maturation des ARN ribosomiques (rRNA).

**Figure 35** Voie apoptotique intrinsèque

**Figure 37** Contrôle de l'activité transcriptionnelle de YY1 par mTOR.

**Figure 38** Effet de la rapamycine et de la Torin 1 sur l'expression de NPM1.

**Figure 39** Dégradation des ARN par les séquences AU-rich (ARE).

**Figure 40** Modèle de stabilisation de l'ARNm de NPM1 par mTOR.

**Figure 41** Technique RNA-RAP.

**Figure 42** Expression de dNLP dans des tumeurs générées dans les glandes accessoires de la drosophile.

**Figure 43** Sensibilité du transgène ARR2PB-NPM1 aux androgènes *in vivo*.

**Figure 44** Principaux marqueurs de différenciation dans l'épithélium prostatique.

**Figure 45** NPM1 induit l'expression de l'EGF.

**Figure 46** Activation des récepteurs de l'EGF dans un contexte sain et néoplasique.

**Figure 47** Index prolifératif dans les prostates de souris Pten$^{pc-/-}$ et PB-NPM1;Pten$^{pc-/-}$.

**Figure 48.** Sites de fixation putatifs des facteurs de transcription dans les promoteurs du gène de l'EGF de l'homme, de la souris et du rat.

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 5


## PHYSIOLOGIE ET DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE PROSTATIQUE 6

**1. ANATOMIE ET FONCTION DE LA PROSTATE 6**

**2. MORPHOGENESE ET DEVELOPPEMENT DE LA PROSTATE 7**

2.1. LES ANDROGENES SONT INDISPENSABLES AUX ETAPES DE DETERMINATION ET D'INITIATION 7

2.2. LES ANDROGENES AGISSENT SUR LE MESENCHYME POUR INITIER UN DIALOGUE AVEC L'EPITHELIUM 8

2.2.1. Les andromédines contrôlent l'élongation et le branchement de l'épithélium 9

a) L'EGF et les membres de la famille FGF stimulent le bourgeonnement épithélial 10

b) Les facteurs inhibant l'élongation des canaux contribuent à la mise en place de l'organisation spatiale des acini 11

c) La voie Hedgehog participe au branchement en régulant la sécrétion de facteurs paracrines par le mésenchyme 13

2.3. LES GENES HOMEOTIQUES PARTICIPENT AUSSI AU DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE PROSTATIQUE 14

2.3.1. La famille Hox 14

2.3.2. NKX3.1 15

**3. LA DIFFERENCIATION TERMINALE PERMET LA MISE EN PLACE D'UN EPITHELIUM HIERARCHISE 16**

## LE CANCER DE LA PROSTATE 18

**1. HISTOIRE NATURELLE DU CANCER DE LA PROSTATE 18**

**2. MECANISMES MOLECULAIRES DE L'INITIATION ET DE LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE 20**

2.1. LE RECEPTEUR DES ANDROGENES JOUE UN ROLE CLE DANS LE DEVELOPPEMENT DU CANCER 20

2.1.1. Le récepteur des androgènes fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires 21

2.1.2. Les co-activateurs de AR facilitent son activité transcriptionnelle en décompactant la chromatine 23

2.1.3. Altérations touchant directement le récepteur des androgènes 23

2.1.4. La synthèse de testostérone au sein de la prostate permet une adaptation à la privation androgénique 25

2.1.5. L'expression et l'activité des cofacteurs de AR sont altérés durant la progression du cancer 26

2.2. ALTERATION DES VOIES SIGNALISATION DES FACTEURS DE CROISSANCE 28

2.2.1. La voie PI3K/AKT/mTOR 29

a) La perte de la phosphatase PTEN est un évènement clé dans la tumorigenèse prostatique 29

b) mTOR est un effecteur important de AKT 30

2.2.2. La voie des MAPK 32

a) L'expression d'une forme constitutivement active de Ras stimule l'oncogenèse prostatique 32

b) La perte des protéines de la famille Sprouty coopère avec la perte de PTEN dans l'oncogenèse prostatique 33

c) La mise en place d'une boucle d'autorégulation autocrine affranchit les cellules malignes de leur dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance 34

2.3. ALTERATION DU CYCLE CELLULAIRE 34

2.3.1. Le cycle cellulaire se divise en quatre phase fonctionelles 34

2.3.2. Le passage entre les différentes phases du cycle est régulé par les complexes Cyclines-CDK 35

a) Les complexes Cycline D-CDK4/6 et Cycline E/CDK2 permettent le passage du point de restriction 37

b) La dérégulation de Rb est un événement fréquent dans la carcinogenèse prostatique 37

c) p53 représente une barrière à la progression tumorale dans la prostate 38

**LES PROTEINES CHAPERONNES ET LEUR ROLE DANS LA TUMORIGENESE PROSTATIQUE. 40**

**1. LES PROTEINES HSP** **40**

**2. LES CHAPERONNES D'HISTONE** **42**

**LA NUCLEOPHOSMINE** **45**

**1. LA FAMILLE NUCLEOPHOSMINE/NUCLEOPLASMINE** **45**

**2. ORGANISATION STRUCTURELLE ET FONCTIONNELLE DE NPM1** **46**

**3. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONELLES DE NPM1** **47**

**4. ROLES DE NPM1 DANS LES CANCERS** **48**

4.1. NPM1 INHIBE LA PROLIFERATION SUITE A UN STRESS ONCOGENIQUE ET EST NECESSAIRE A LA STABILITE GENOMIQUE. 48

4.1.1. NPM1 stabilise p14arf et stimule l'activité de p53 48

4.1.2. NPM1 joue un rôle important dans la réparation de l'ADN et le maintien de la stabilité du génome. 49

4.2. LA SUREXPRESSION DE NPM1 EST FREQUENTE DANS LES TUMEURS SOLIDES 50

4.2.1. La surexpression de NPM1 est associée à un état prolifératif 51

4.2.2. NPM1 inhibe l'apoptose et confère une résistance aux traitements anticancéreux 52

**PRESENTATION DU SUJET DE RECHERCHE** **55**

**QUEL EST L'IMPACT D'UNE SUREXPRESSION DE NPM1 *IN VIVO* ?** **55**

**QUELS FACTEURS SONT A L'ORIGINE DE LA SUREXPRESSION DE NPM1 DANS LE CANCER DE LA PROSTATE *IN VIVO* ?** **55**

**RESULTATS** **57**

**ARTICLE 1** **58**

**ARTICLE 2** **60**

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES 62

**1. NPM1 EST UNE CIBLE EN AVAL DE LA SIGNALISATION PI3K/AKT/MTOR** **63**

MTOR ET YY1 INTERAGISSENT-ILS POUR CONTROLER L'EXPRESSION DE NPM1 ? 64

L'ACTIVITE KINASE DE MTOR EST-ELLE REQUISE POUR LE CONTROLE DE LA TRANSCRIPTION DE NPM1 ? 66

COMMENT MTOR CONTROLE LA STABILITE DE L'ARNM CODANT POUR NPM1 ? 67

QUEL EST L'IMPACT DE LA SUREXPRESSION DE NPM1 INDUITE PAR MTOR ? 69

**2. NPM1 EST-ELLE UN ONCOGENE PROSTATIQUE?** **71**

NPM1 INFLUE-T-ELLE SUR LA DIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM PROSTATIQUE ? 72

QUELLE EST LA PERTINENCE D'UNE SUREXPRESSION D'EGF INDUITE PAR NPM1? 73

PAR QUEL MECANISME NPM1 INDUIT-ELLE L'EXPRESSION DE L'EGF? 75

PAR QUEL(S) MECANISME MOLECULAIRE NPM1 STIMULE-T-ELLE LA PROLIFERATION *IN VIVO* ? 75

NPM1, CYCLINE E ET P27KIP1, DES LIAISONS DANGEREUSES ? 77

# ANNEXES 80

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 81

# *Introduction Bibliographique*

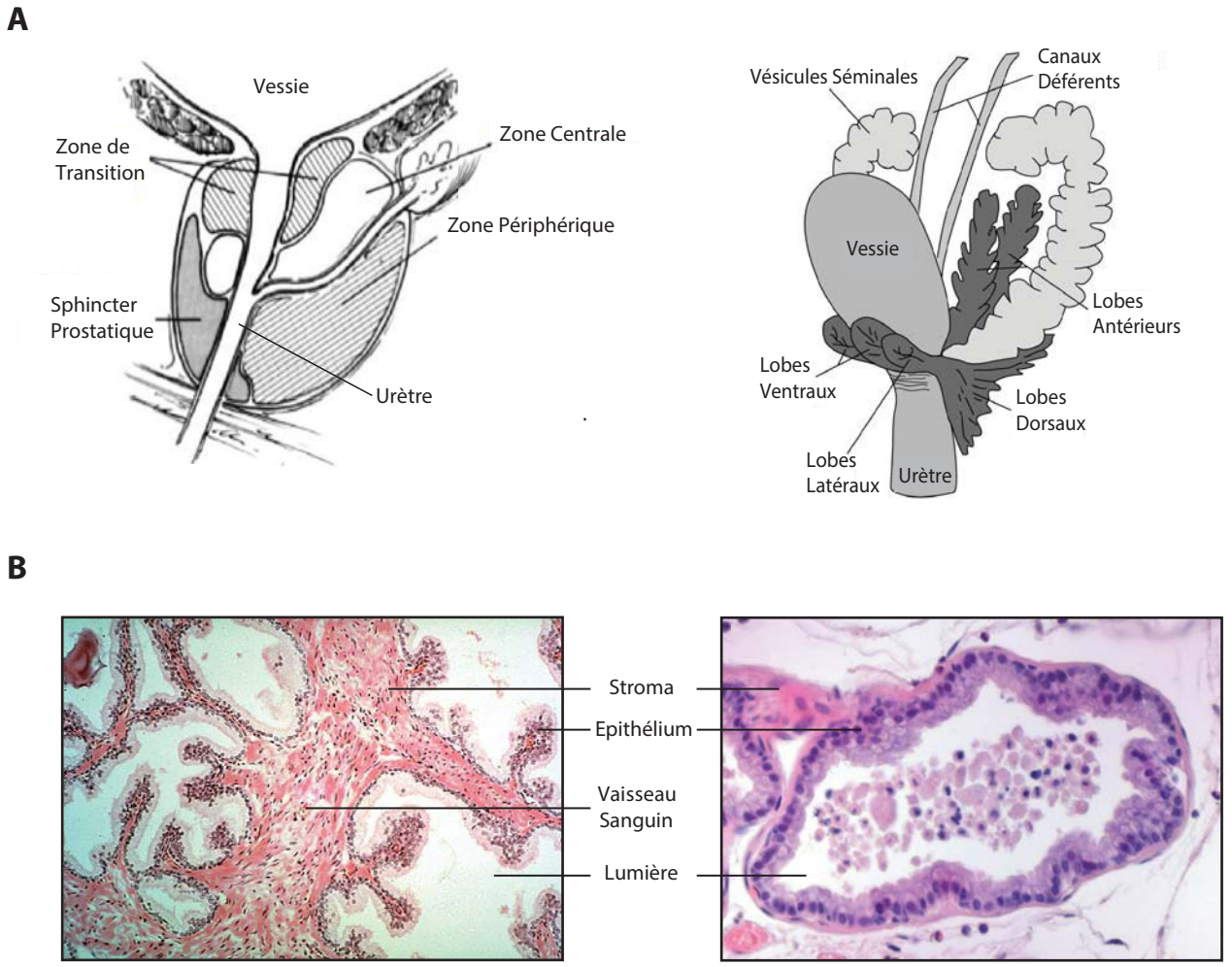



**Figure 1. Anatomie et histologie de la prostate humaine et murine.**
**A.** Localisation et représentation schématique de la prostate humaine (à gauche, coupe sagittale) et murine (à droite, vue latérale). **B.** Coupes histologiques de prostates humaine (à gauche) et murine (à droite) observées après coloration hématoxyline-éosine.

# Physiologie et développement de la glande prostatique

`

## 1. Anatomie et fonction de la prostate

La prostate est une glande exocrine de l'appareil urogénital mâle, située immédiatement sous la vessie et entourant l'urètre. Elle est formée d'une masse unique, approximativement de la taille d'une noix et pèse de 15 à 25 grammes à l'âge adulte. La prostate humaine est subdivisée en trois zones, la zone périphérique, la zone centrale et la zone de transition. Chez la souris et le rat, la prostate est composée de 4 lobes présents en 2 exemplaires chacun : les lobes ventraux, dorsaux, latéraux et antérieurs (**figure 1**). Malgré cette différence morphologique, la prostate chez ces 3 espèces est proche d'un point de vue histologique. Cette glande est constituée de multiples canaux, ou acini, qui permettent de drainer les sécrétions prostatiques vers l'urètre, et qui sont bordés par une couche de cellules épithéliales. L'ensemble de ce compartiment repose sur une lame basale entourée par un stroma fibromusculaire composé notamment de cellules fibroblastiques, de muscles lisses ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques.

La principale fonction de la prostate est la production par les cellules épithéliales du fluide prostatique qui entre à hauteur de 30% dans la composition du sperme. Il est associé au moment de l'éjaculation au liquide séminal qui joue un rôle important dans la protection des spermatozoïdes, en favorisant leur survie et leur pouvoir fécondant dans les voies génitales femelles et en les protégeant contre les agents pathogènes (Sitaram and Nagaraj, 1995). De plus, les kallikréines sécrétées dans le fluide prostatique, dont KLK3 aussi connue sous le nom d'antigène spécifique prostatique (PSA, *Prostate Specific Antigen*), entrainent la liquéfaction du sperme grâce à la protéolyse des séménogelines et de la fibronectine.

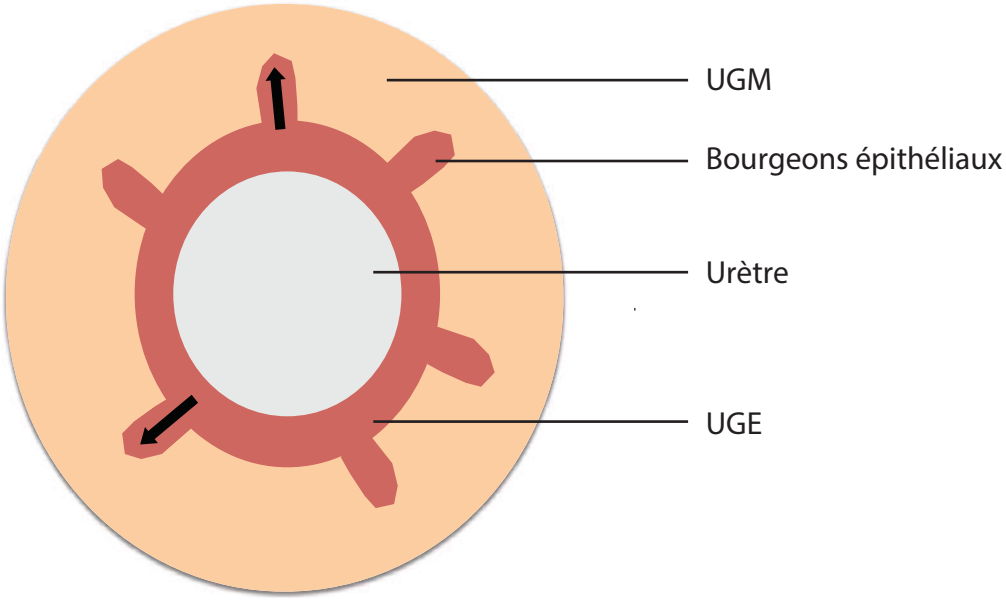



**Figure 2. Représentation schématique du sinus urogénital mâle en coupe transversale.** L'épithélium urogénital (UGE) est situé autour de l'urètre, sous la vessie. Il est enveloppé dans le mésenchyme urogénital (UGM). Lors de l'étape d'initiation, les bourgeons épithéliaux envahissent le mésenchyme selon un axe proximo-distal représenté par les flèches.

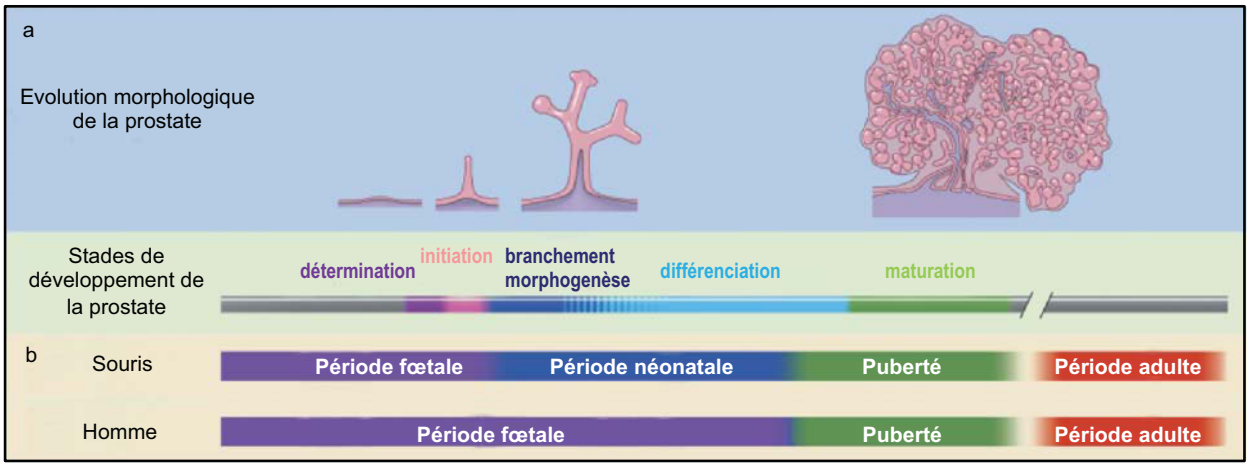



**Figure 3. Etapes du développement de la prostate chez l'homme et la souris**
Le développement initial de la prostate se fait en 4 étapes: la détermination, l'initiation, le branchement et la différenciation. Ces phénomènes ont lieu durant la période foetale chez l'homme alors que le branchement et la différenciation a lieu en péridode néonatale chez les rongeurs. Le pic de sécrétion d'androgènes à la puberté permet ensuite la maturation finale de la glande. Modifié d'après *Prins & Putz, 2008.*

## 2. Morphogenèse et développement de la prostate

La prostate dérive du sinus uro-génital (UGS), composé d'un feuillet épithélial d'origine endodermique (UGE, *UroGenital Epithelium*) entouré d'un feuillet mésenchymateux d'origine mésodermique (UGM, *UroGenital Mesenchyme*) (**figure 2**). Le développement initial de la prostate est un processus qui se subdivise en 4 étapes, à savoir la détermination, qui permet l'engagement irréversible d'une partie de l'UGS vers une différenciation prostatique ; l'initiation, qui consiste en la croissance des bourgeons épithéliaux prostatiques ; le branchement, où l'on assiste à la ramification des bourgeons ; la différenciation cellulaire, qui se déroule en même temps que le branchement (Prins and Putz, 2008) (**figure 3**). Chez l'homme, le développement de la prostate a lieu durant les second et troisième trimestres de vie fœtale pour se terminer à la naissance. Au contraire, chez les rongeurs, la prostate est rudimentaire à la naissance et la majeure partie du développement a lieu durant les 15 premiers jours de vie. L'expression de réseaux de gènes distincts pendant le développement est à l'origine chez les rongeurs comme chez l'homme d'une régionalisation de la glande respectivement en lobes ou en zones hétérogènes d'un point de vue morphologique et moléculaire. La maturation de la glande a lieu durant la puberté chez les rongeurs et l'homme. Elle correspond à la phase de croissance et de différenciation terminale de l'épithélium prostatique qui acquiert alors sa fonction sécrétrice. Tous ces évènements sont le fruit de croisements entre différentes voies de signalisation qui seront déclenchées par l'action d'hormones stéroïdes et peptidiques, et d'un dialogue constant entre le compartiment épithélial et mésenchymateux.

### 2.1. Les androgènes sont indispensables aux étapes de détermination et d'initiation

Les androgènes, et notamment la testostérone produite par les testicules fœtaux, sont essentiels à la détermination de l'UGS vers un devenir prostatique et à l'initiation du bourgeonnement épithélial. Chez la souris, la production de testostérone débute à 14 jours de vie fœtale. Des explants d'UGS prélevés sur des fœtus murins de 12 à 13 jours et cultivés pendant 6 jours en absence d'androgènes ne produisent pas de bourgeons prostatiques. Par

contre, des explants prélevés chez des fœtus âgés de 14, 15 et 16 jours et cultivés selon le même protocole expérimental initient le développement de bourgeons prostatiques pour respectivement 15, 53 et 100% des tissus (Cunha, 1973). Des expériences similaires réalisées chez le rat ont donné les mêmes résultats (Lasnitzki and Mizuno, 1977). De plus, une exposition unique à des androgènes d'explants d'UGS de rat prélevés avant la production de testostérone par les testicules fœtaux suffit à induire un bourgeonnement prostatique. Enfin, l'exposition de sinus uro-génitaux de rat femelles à des androgènes permet d'initier un bourgeonnement prostatique (Takeda et al., 1986). Il apparaît donc qu'une imprégnation androgénique durant la vie fœtale soit essentielle au développement prostatique chez les rongeurs.

L'androgène principalement actif dans la prostate est la dihydrotestostérone (DHT). Cette hormone est issue de la réduction de la testostérone par la 5α-réductase au sein même de l'épithélium prostatique. La DHT est essentielle au développement de la prostate puisque le traitement de rates gestantes avec un inhibiteur de la 5α-réductase inhibe la formation des bourgeons épithéliaux chez les fœtus mâles, et cet effet est renversé par l'administration simultanée de DHT (Wilson and Lasnitzki, 1971). L'importance de la DHT pour le développement prostatique chez l'homme a été mise en évidence par l'étude de patients portant des mutations inactivatrices de la 5α-réductase. Ces patients présentent de très faibles taux de DHT associés à une atrophie de l'épithélium prostatique, alors que les vésicules séminales et les canaux déférents sont présents et normalement développés (Siiteri and Wilson, 1974).

### 2.2. Les androgènes agissent sur le mésenchyme pour initier un dialogue avec l'épithélium

Les effets de la testostérone et de la DHT dans la prostate sont relayés par le récepteur des androgènes (AR), un facteur de transcription inductible par son ligand. Cependant, bien que la production de testostérone soit indispensable à l'engagement de l'épithélium uro-génital (UGE) vers une différenciation prostatique, l'expression de AR pendant la période fœtale n'est détectée que dans le mésenchyme uro-génital (UGM) (Cooke et al., 1991). L'action des

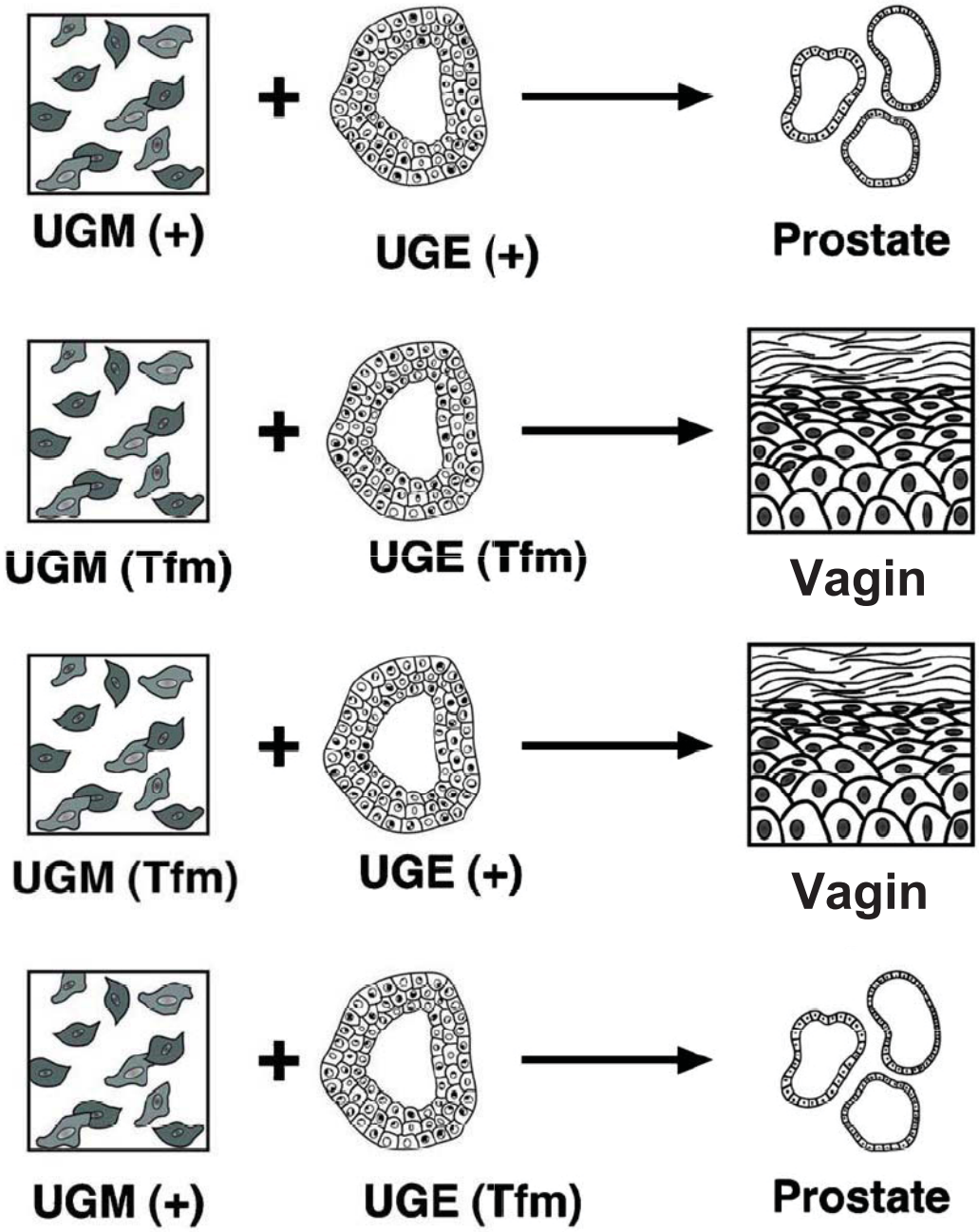



**Figure 4. Importance du mésenchyme urogénital pour le développement prostatique.** Différentes combinaisons de d'UGM et d'UGE provenant de souris sauvages (+) et Tfm ont été réalisées et greffées sous la capsule rénale de souris sauvages. Les combinaisons UGE (+)/UGM Tfm et UGE Tfm/UGM Tfm aboutissent au développement de tissus de type vaginal. Au contraire, la combinaison UGE Tfm/UGM (+) permet le développement d'un épithélium prostatique et la formation des acini. L'absence de protéines clés dans les sécrétions souligne néanmmoins la différenciation incomplète de l'épithélium obtenu.
Modifié d'après *Cunha, 2008*.

androgènes sur le développement précoce de l'épithélium prostatique est donc indirect et nécessite la présence d'un second signal relayé par le mésenchyme. L'existence d'un dialogue moléculaire entre les deux compartiments initié par la signalisation androgénique a été mise en évidence par des expériences de recombinaisons tissulaires réalisées par Cunha et ses collaborateurs (Cunha et al., 1983). Les travaux réalisés par les auteurs 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*). 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, et ont été analysés 4 semaines plus tard afin d'apprécier la différenciation de l'UGE. Cette étude a permis de démontrer que la présence de AR dans l'UGM est une condition nécessaire et suffisante pour le développement de la prostate (**Figure 4**). En effet, la combinaison d'UGM sauvages avec des UGE *tfm* induit un bourgeonnement prostatique, alors que la combinaison d'UGE sauvages avec des UGM *tfm* est inefficace. De plus, l'UGM est également important pour la spécification du tissu épithélial adjacent, puisque des UGM recombinés avec des cellules épithéliales issues de la vessie ou de l'urètre conduit à la différenciation d'un épithélium prostatique (Cunha and Donjacour, 1989).

### *2.2.1. Les andromédines contrôlent l'élongation et le branchement de l'épithélium*

Suite aux étapes d'initiation et de détermination, les bourgeons prostatiques en élongation envahissent le mésenchyme avoisinant. L'invasion du mésenchyme par l'UGE ainsi que sa différenciation se fait selon un axe proximo-distal, à partir de l'urètre. Elle s'accompagne d'une ramification au niveau de la partie distale des canaux en élongation pour mettre en place un réseau dense de canaux sécrétoires. Cette étape de branchement est hautement régulée par des facteurs paracrines sécrétés par le mésenchyme uro-génital en réponse aux androgènes (**figure 5**). Ces facteurs de croissance sont également appelés les « andromédines ». Ils vont intervenir de façon simultanée en exerçant des actions synergiques ou antagoniques afin de coordonner le développement harmonieux de la glande.

### a) L'EGF et les membres de la famille FGF stimulent le bourgeonnement épithélial

L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) est sécrété par le stroma en réponse aux androgènes (Berry et al., 2008). Il joue un rôle important dans le bourgeonnement de l'épithélium prostatique puisque celui-ci est réduit chez les souris invalidées pour le gène de l'EGF (Abbott et al., 2003). De plus, des injections quotidiennes d'EGF à des rats pendant les huit semaines suivant leur naissance induit une augmentation de 50% du poids des lobes ventraux prostatiques, tandis que les lobes dorsaux, antérieurs ainsi que les vésicules séminales ne semblent pas affectées par ce traitement (Tørring et al., 2001). De plus, une inhibition de l'activité kinase du récepteur à l'EGF (EGFR) réduit le développement de la prostate chez le rat (Mellinghoff et al., 2004). Cet effet est renversé par l'administration d'androgènes. Puisque AR n'est pas exprimé dans l'épithélium à ce stade de développement, cela suggère que d'autres andromédines peuvent prendre le relais pour assurer le développement prostatique.

Deux membres de la famille FGF (*Fibroblast Growth Factor*), FGF7 et FGF10, sont particulièrement importants pour stimuler l'élongation des bourgeons prostatiques. Ces facteurs de croissance, synthétisés par l'UGM, se fixent sur leurs récepteurs respectifs présents uniquement au niveau de l'UGE. Leur expression est limitée à la partie distale des canaux en élongation, où ils jouent le rôle de chimioattractant et de facteurs mitogènes vis-a-vis de l'épithélium (Lu et al., 1999; Pu et al., 2007; Thomson, 2001). Chez les rongeurs, la dépendance des lobes prostatiques pour ces molécules diffère, comme en témoigne l'analyse de souris invalidées pour le récepteur aux FGF, où le lobe ventral est absent alors que les lobes dorsaux et latéraux sont présents, même s'ils sont peu développés (Lin et al., 2007). FGF7, aussi connu sous le nom de KGF (Keratinocyte Growth Factor), a été la première molécule identifiée comme possible facteur paracrine responsable du développement de l'épithélium prostatique (Yan et al., 1992). En effet, l'ARNm de FGF7 est exprimé dans les cellules stromales et son expression augmente en réponse à une stimulation androgénique *in vitro*. De plus, un traitement au FGF7 sur des prostates ventrales de rat prélevées à la naissance permet le développement de la glande en absence d'androgènes, et ce de façon dose-dépendante (Sugimura et al., 1996). Malgré ces démonstrations, FGF7 ne semble pas essentiel au développement de la prostate puisque des souris invalidées pour le gène FGF7 présentent une prostate normalement développée (Guo

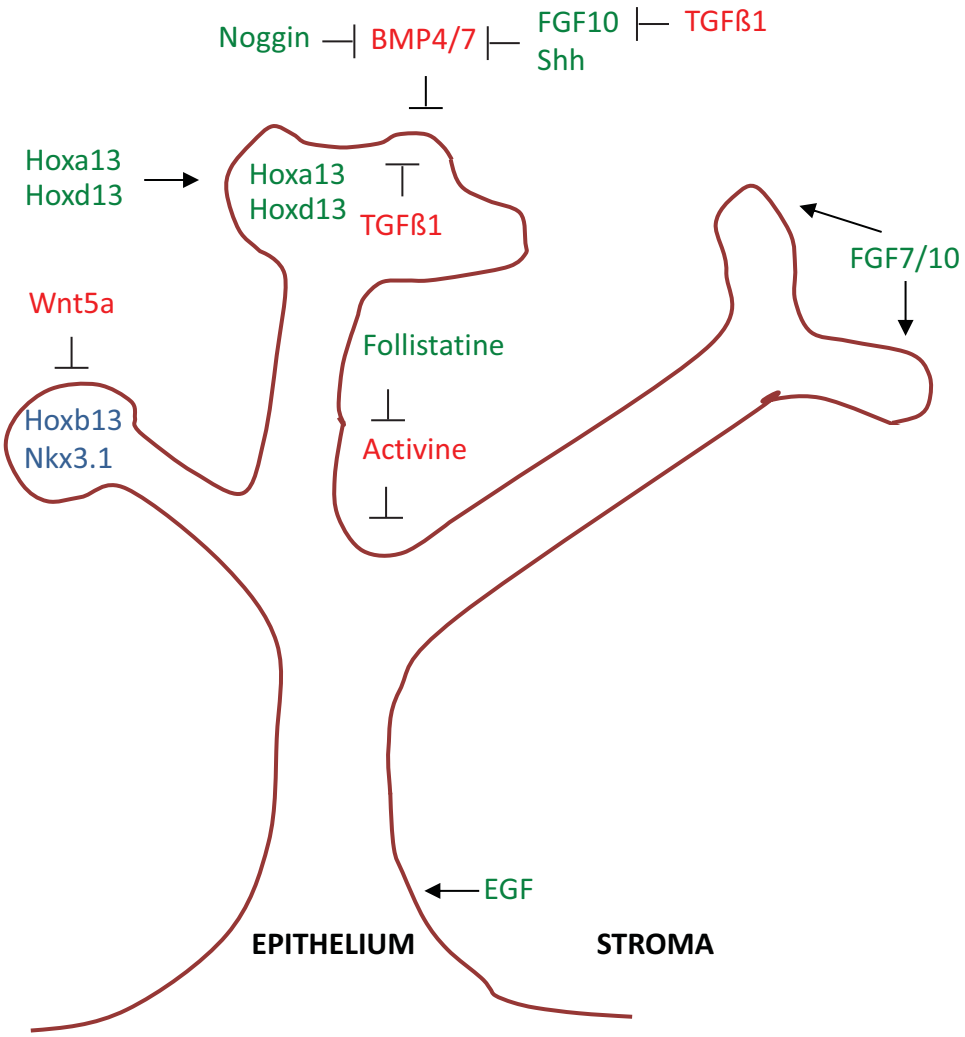



**Figure 5. Régulation du branchement de l'épithélium par les andromédines.**
En réponse aux androgènes véhiculés par la circulation sanguine, les cellules stromales sécrètent des facteurs solubles, les « andromédines », qui régulent l'élongation et le branchement de l'épithélium prostatique. Certaines induisent l'élongation (vert) alors que d'autres l'inhibent (rouge). L'action synchronisée de ces deux types de facteurs conduit à un développement harmonieux de la glande et à une distribution homogène des acini. L'épithélium quant à lui exprime des facteurs permettant sa différenciation (bleu).
D'après Prins & Putz, 2008.

et al., 1996). Au contraire, des souris invalidées pour FGF10 présentent des bourgeons épithéliaux plus petits et beaucoup moins nombreux, suggérant un rôle unique et essentiel de FGF10, contrairement à FGF7 (Donjacour et al., 2003). En accord avec ces résultats, le traitement d'explants d'UGS issus de souris FGF10$^{-/-}$ par du FGF10 et de la testostérone restaure partiellement le développement prostatique. Cependant, le traitement de ces explants avec du FGF10 seul est inefficace. L'expression de FGF10 est donc nécéssaire mais insuffisante pour le développement normal de la prostate. Cela met en exergue le rôle d'autres facteurs clés pour l'élongation et le branchement de la glande.

### b) Les facteurs inhibant l'élongation des canaux contribuent à la mise en place de l'organisation spatiale des acini

Plusieurs facteurs paracrines sécrétés par le stroma au niveau de la partie distale des canaux en élongation sont décrits pour inhiber l'invasion du mésenchyme par les acini en freinant la prolifération épithéliale. L'action synchronisée des facteurs activateurs avec les facteurs inhibiteurs de la croissance des acini conduit à un développement harmonieux de la glande prostatique et à une distribution homogène des acini.

Les BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) inhibent la prolifération épithéliale (**figure 5**). Chez la souris, le facteur Bmp-4 est exprimé dans le mésenchyme uro-génital lors de l'initiation du bourgeonnement épithélial et de la ramification des acini (du 14$^{ème}$ jour fœtal jusqu'à la naissance) (Lamm et al., 2001). Le traitement d'explants d'UGS avec Bmp-4 inhibe l'élongation des bourgeons prostatiques, et les souris haplo-insuffisantes pour Bmp-4 (Bmp-4$^{+/-}$) présentent un taux de branchement dans le lobe ventral supérieur à celui des souris sauvages. Ces données placent Bmp-4 comme un inhibiteur de la croissance épithéliale. L'expression de Bmp-4 est restreinte autour des canaux en élongation, et elle est régulée par d'autres acteurs retrouvés durant la morphogenèse prostatique, comme *Sonic-Hedgehog* (Shh) qui l'active, ou Fgf10 et les androgènes qui l'inhibent. La régulation de l'expression de Bmp-4 par de multiples acteurs permet de créer des gradients de concentration le long des canaux en élongation, contribuant ainsi à la régulation fine du processus de branchement (Huang et al., 2005a). Ces gradients de concentration sont également régulés par la protéine Noggin, qui inhibe l'activité de Bmp-4 en la titrant dans le milieu extracellulaire. Chez les

souris invalidées pour Noggin, le bourgeonnement épithélial dans les lobes ventraux est complètement inhibé, et il est fortement réduit dans les lobes dorsaux et latéraux (Cook et al., 2007).

Comme Bmp-4, Bmp-7 a un rôle inhibiteur sur la croissance des bourgeons épithéliaux (Grishina et al., 2005). Son invalidation conduit à un plus grand nombre de canaux prostatiques et de ramifications. Dans le même sens, le traitement d'explant d'UGS sauvages avec Bmp-7 inhibe la croissance et le bourgeonnement de l'UGE.

La croissance des bourgeons prostatiques est également inhibée par TGFß1. Chez la souris, Tgfß1 est exprimé en période post-natale dans les cellules du mésenchyme alors que ses récepteurs TGFßRI et TGFßRII sont exprimés à la fois dans les cellules mésenchymateuses et épithéliales (Tomlinson et al., 2004). TGFß1 agit donc sur les deux types cellulaires, de façon autocrine en réprimant l'expression de FGF10 par les cellules mésenchymateuses et de façon paracrine en bloquant la prolifération des cellules épithéliale et en stimulant leur différenciation (Chang et al., 1999). D'autres membres de la famille du TGFß influencent également le développement de la prostate, comme les activines. Ces glycoprotéines sécrétées par les cellules mésenchymateuses inhibent la prolifération épithéliale et la ramification des bourgeons en agissant sur leurs récepteurs retrouvés au niveau de l'épithélium (Cancilla et al., 2001). Les activines peuvent être inhibées par la fixation aux follistatines, qui sont exprimées dans la prostate en développement et mature. Le traitement d'explants de prostate de rats nouveau-nés avec de la follistatine stimule la croissance et le branchement des canaux prostatiques en absence de testostérone. Ainsi, il existe une balance entre l'action des activines et de la follistatine qui, au même titre que la balance entre les Bmps et Noggin, permet une régulation fine de la morphogenèse épithéliale au niveau des extrémités distales des canaux.

Plus récemment, la démonstration du rôle de Wnt5a dans le développement de la prostate chez le rat et la souris a permis d'ajouter un acteur à ce réseau coordonné de facteurs paracrines (Huang et al., 2009). Wnt5a est une glycoprotéine sécrétée faisant partie de la famille Wnt. Elle joue un rôle important durant le développement embryonnaire puisque son invalidation conduit à une mortalité périnatale (Yamaguchi et al., 1999). Dans la prostate, la protéine Wnt5a est sécrétée par le mésenchyme au niveau de la partie distale des canaux

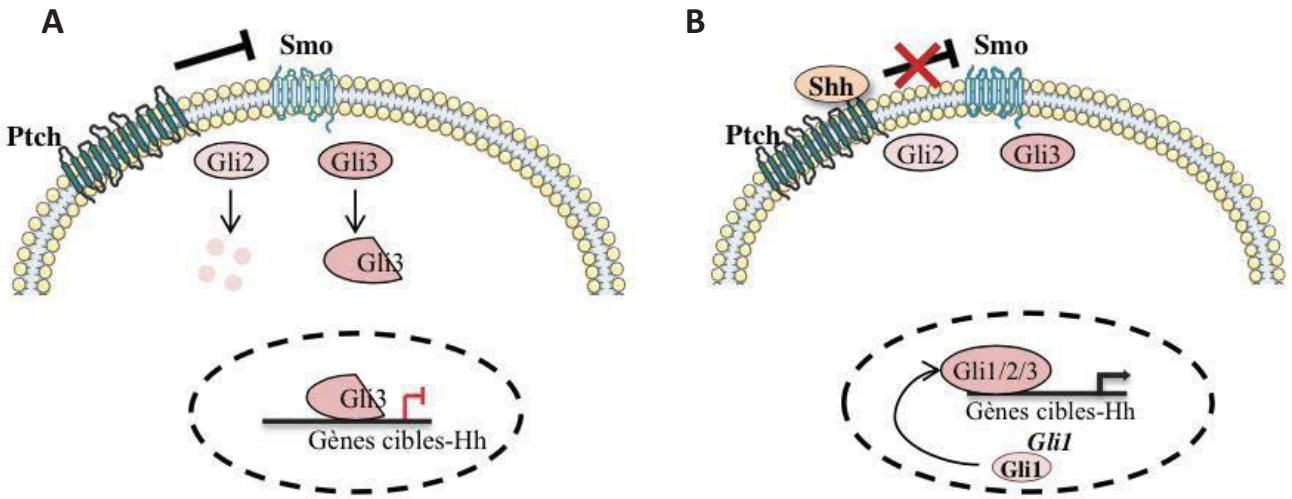



**Figure 6. Représentation schématique de la signalisation Hedgehog**. **A**. En absence de ligand, le récepteur Patched (Ptch) exerce une action inhibitrice sur le récepteur Smoothened (Smo). Cette inhibition conduit à la dégradation du facteur de transcription Gli2 et à la protéolyse du facteur Gli3. Cette forme tronquée de Gli3 agit comme un répressseur transcriptionnel des gènes cibles de la voie Hh. **B**. La liaison du ligand Shh lève l'inhibition exercée par Ptch sur Smo. Les facteurs de transcription Gli2 et Gli3 peuvent alors agir comme activateur transcriptionnel. Le facteur de transcription Gli1 est un des gènes cibles de la voie Hh et agit comme un activateur des gènes cibles de la voie.
D'après Coralie Drelon, Thèse.

en élongation où elle freine la prolifération épithéliale. Cela a comme effet d'inhiber l'invasion du stroma par les acini et donc de réguler le processus de branchement, à l'image de l'effet exercé par les facteurs de la famille du TGF-ß. De plus, la perte de Wnt5a mène à la formation de bourgeons prostatiques irréguliers dans leur forme et dans leur position ce qui souligne le rôle de Wnt5a dans l'organisation des acini. Enfin, Wnt5a est également impliqué dans la polarisation des cellules épithéliales et donc dans la formation de la lumière au sein des acini.

### c) La voie Hedgehog participe au branchement en régulant la sécrétion de facteurs paracrines par le mésenchyme

L'activation de la voie Hedgehog dépend de trois ligands : Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) et Indian Hedgehog (Ihh). Ces protéines sécrétées agissent en liant au récepteur Patched1 (Ptch1) à la surface des cellules. En absence de ligand, Ptch1 inhibe le récepteur à sept domaines transmembranaires Smoothened (Smo) par un mécanisme non encore élucidé. L'inhibition de Smo conduit à la dégradation du facteur de transcription Gli2 et à la protéolyse de Gli3. La forme tronquée de Gli3 agit alors comme un répresseur transcriptionnel des gènes cibles de la voie (**figure 6A**). La liaison des ligands à Ptch1 lève l'inhibition qu'il exerce sur Smo. Les facteurs de transcription Gli2 et Gli3 ne sont plus dégradés et peuvent agir comme activateurs transcriptionnels (Ingham et al., 2011) (**figure 6B**). Gli1, qui agit uniquement comme un activateur transcriptionnel des gènes cibles de la voie, n'est exprimé que lors de l'activation de cette voie de signalisation, ce qui en fait un marqueur des cellules où la signalisation Hedgehog est mobilisée (King et al., 2008).

Il est difficile d'apprécier le rôle de cette voie dans le développement prostatique *in vivo* puisque l'invalidation de Sonic-Hedgehog (Shh) mène à un défaut de structuration de l'endoderme, antérieur au développement de la prostate (Chiang et al., 1996; King et al., 2008). Cependant, des expériences utilisant des greffes d'explants d'UGS de souris invalidées pour Shh sous la capsule rénale de souris sauvages montrent que l'activation de la voie est essentielle à la formation et à l'élongation des bourgeons prostatiques (Podlasek et al., 1999; Berman et al., 2004). Shh est exprimé majoritairement dans les cellules épithéliales situées dans la partie distale des canaux en élongation (Pu et al., 2004). Son récepteur est

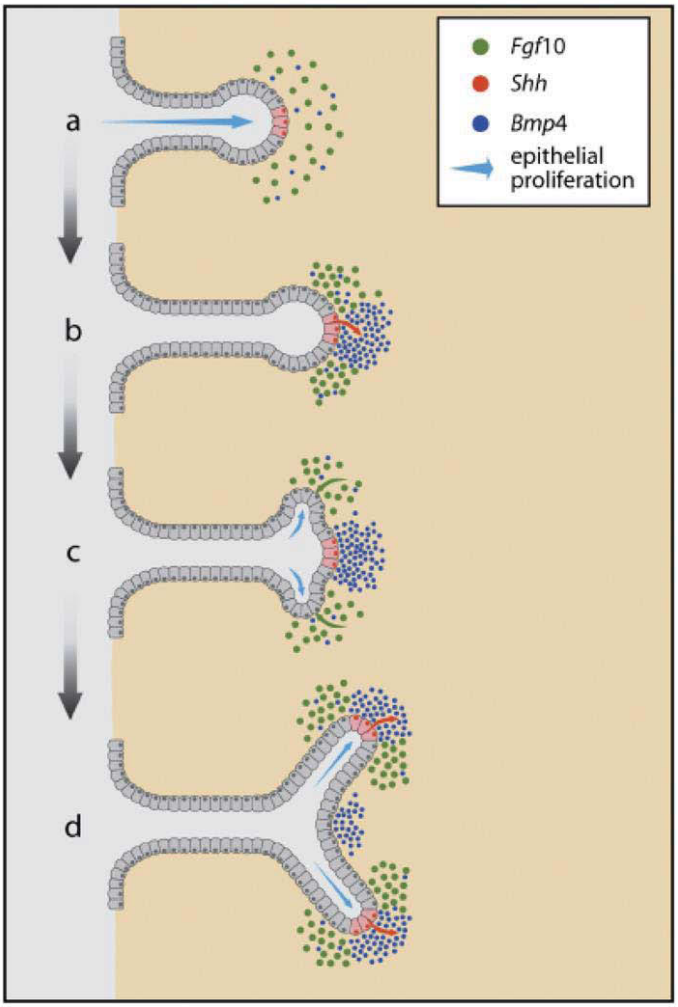



**Figure 7. Contrôle du branchement par sonic-hedgehog**

En réponse aux androgènes, les cellules stromales sécrètent du Fgf10 qui stimule l'élongation de la partie apicale des bourgeons épithéliaux (**a**). Les cellules recevant le signal Fgf10 sécrètent en retour Shh qui inhibe l'expression de Fgf10 et stimule celle de Bmp4 (**b**). Ce dernier déplace le gradient de concentration de FGF10 sur les cotés de l'épithélium, favorisant le branchement latéral (**c**). Cette opération se répète de multiple fois durant le développement, permettant ainsi la mise en place d'un réseau dense d'acini (**d**).

D'après Prins & Putz, 2008.

plutôt exprimé dans le mésenchyme entourant l'extrémité distale des canaux. L'exposition d'UGS à Shh *in vitro* inhibe indirectement la croissance des bourgeons épithéliaux en entraînant une diminution de l'expression de FGF10 et une augmentation de l'expression de BMP-4. (Freestone et al., 2003; Wang et al., 2003a). Le modèle actuellement proposé est que l'expression de Shh dans la partie distale des canaux épithéliaux va diminuer localement l'expression de FGF10 et augmenter celle de BMP-4. Cela permet le déplacement du gradient de FGF10 sur les côtés des canaux stimulant ainsi le branchement de l'épithélium (**figure 7**).

### 2.3. Les gènes homéotiques participent aussi au développement de la glande prostatique

Au delà des molécules sécrétées responsables du dialogue entre l'épithélium et le mésenchyme, la détermination et le positionnement de tous les tissus requiert l'expression de membres spécifiques de la superfamille des gènes homéotiques. Ils codent pour des facteurs de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN très conservé, l'homéodomaine, qui permet de réguler l'expression de leurs gènes cibles. Ces gènes sont contrôlés 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. Un ensemble spécifique de gènes à homéobox a été identifié dans la prostate, comprenant notamment les membres de la famille Hox ou encore de la famille NK.

#### *2.3.1. La famille Hox*

La famille des gènes Hox est la plus étudiée. Elle permet la détermination des différentes régions du corps chez des espèces allant de la drosophile à l'homme. Chez les mammifères, de multiples duplications géniques ont donné naissance à 4 clusters de gènes Hox, sur différents chromosomes, pour un total de 39 gènes. La position des gènes de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' définit le profil d'expression spatio-temporelle dans l'embryon. Ainsi, la

prostate étant un des organes les plus postérieur chez le mâle, les gènes Hox qui s'y expriment, sont situés du côté de l'extrémité 5' des différents clusters. Pendant, le développement de l'UGS, 3 gènes Hox sont actifs, à savoir Hoxa13, Hoxb13 et Hoxd13. Hoxa13 et Hoxd13 sont exprimés dans le mésenchyme et dans l'épithélium uro-génital. L'étude de souris invalidées pour ces gènes a permis de démontrer que Hoxa13 et Hoxd13 stimulent la croissance et le branchement des bourgeons prostatiques (Podlasek et al., 1999b; Podlasek et al., 1997). La délétion de Hoxb13 quant à elle, n'influe pas sur le nombre de bourgeons prostatiques ni sur leur branchement (Economides and Capecchi, 2003). En revanche, Hoxb13 semble essentiel à la différenciation fonctionnelle de l'épithélium dans le lobe ventral, comme en atteste l'absence des protéines sécrétées majoritairement dans ce lobe ainsi que la perte de polarité de l'épithélium. Les études réalisées chez l'homme montrent une dérégulation de l'expression des gènes homéotiques lors du développement de pathologies à l'âge adulte, soulignant le rôle de ces protéines dans l'homéostasie de la glande mature (Waltregny et al., 2002; Miller et al., 2003; Edwards et al., 2005; Jung et al., 2004).

### 2.3.2. NKX3.1

NKX3.1 est un facteur de transcription appartenant à la famille des gènes à homéobox NK. Son expression est restreinte à la prostate et aux glandes de Cowper. Chez la souris, NKX3.1 est déjà exprimé à l'emplacement des bourgeons avant leur formation, mais son pic d'expression a lieu entre les 6$^{ème}$ et 15$^{ème}$ jours postnataux dans l'épithélium prostatique, au moment de la cytodifférenciation (Bieberich et al., 1996). NKX3.1 stimule le bourgeonnement et la différenciation de l'épithélium prostatique, ce qui coïncide avec son profil d'expression. Les prostates des souris NKX3.1$^{-/-}$ ont une diminution du nombre de ramifications des canaux prostatiques. De plus, le profil sécrétoire dans tous les lobes est altéré, suggérant un rôle de NKX3.1 dans la différenciation fonctionnelle de l'épithélium. A l'âge adulte, ces souris développent des lésions hyperplasiques ce qui démontre le rôle important de NKX3.1 dans l'homéostasie prostatique (Bhatia-Gaur et al., 1999). Le rôle différenciateur de NKX3.1 a été indirectement confirmé chez l'homme, chez lequel sa perte

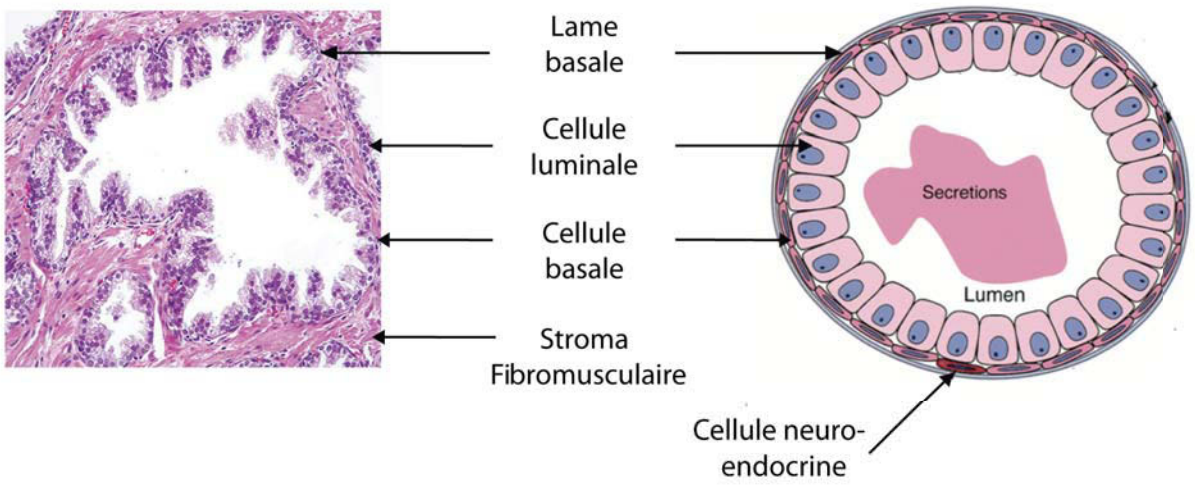



**Figure 8. Coupe histologique et représentation schématique de l'épithélium prostatique humain**
L'épithélium prostatique est composé de cellules épithéliales luminales et basales reposant sur une lame basale composée principalement de laminine, de fibronectine, de collagène et de protéoglycanes. Elle forme une barrière entre le compartiment épithélial et le compartiment stromal.

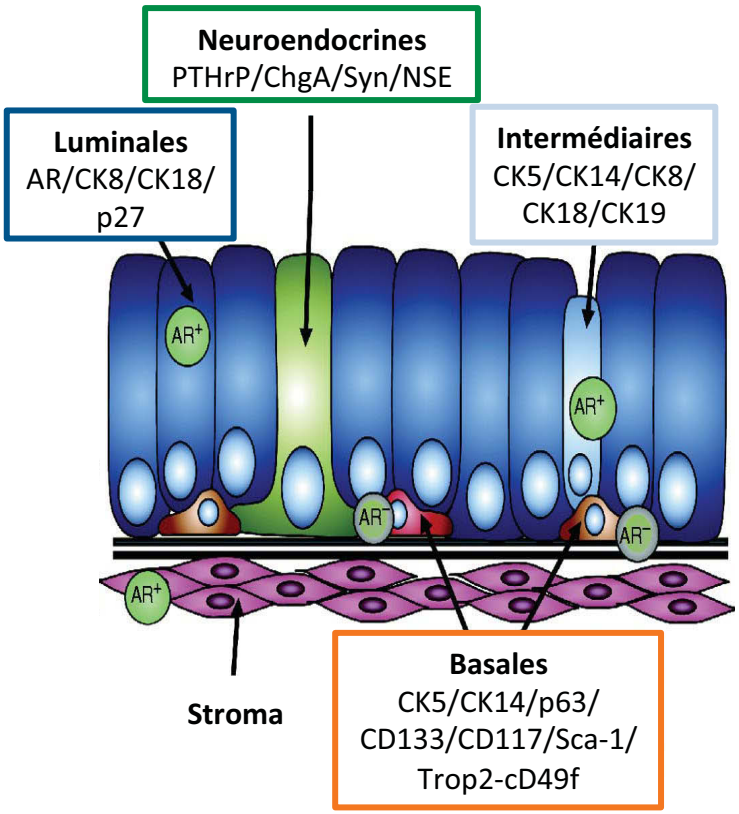



**Figure 9. Signature moléculaire des différents types cellulaires prostatiques**
L'épithélium prostatique est majoritairement composé de cellules luminales, basales, intermédiaires et, dans une moindre mesure, neuroendocrines. Chacun de ces types cellulaires se distingue par sa signature moléculaire unique, qui permet notamment de trier les cellules par cytométrie de flux.
D'après Taylor *et al*, 2010.

est corrélée à la progression tumorale (Bowen et al., 2000; Bethel et al., 2006). Il a par ailleurs été montré que les androgènes stimulent directement l'expression de NKX3.1, ce qui représente une voie supplémentaire par laquelle les androgènes contrôlent le développement et l'homéostasie de la prostate (Pu et al., 2007; Bieberich et al., 1996).

## 3. La différenciation terminale permet la mise en place d'un épithélium hiérarchisé

Cette dernière étape du développement de la prostate est discontinue et elle se déroule en deux temps : d'abord de manière synchronisée avec l'étape de branchement, puis lors de la puberté, lorsque le taux d'androgènes plasmatiques augmente fortement. Elle dépend donc en grande partie de la signalisation androgénique et plus particulièrement de la présence des produits des gènes cibles de l'action des androgènes tels que NKX3.1. Cela aboutit à la formation d'un tissu hautement hiérarchisé d'un point de vue structurel et fonctionnel, constitué majoritairement de cellules épithéliales basales et luminales ainsi que de cellules neuroendocrines (**figure 8**). Ces types cellulaires présentent des caractéristiques morphologiques et moléculaires distinctes. Directement apposées sur la membrane basale, les cellules épithéliales basales constituent chez l'homme une couche continue de cellules de forme triangulaire aplatie et expriment le facteur de transcription p63 et les cytokératines (CK) de hauts poids moléculaires CK5 et CK14. Chez la souris, ces cellules sont moins nombreuses et plus dispersées au sein du compartiment basal. L'expression du récepteur des androgènes n'y est quasiment pas détectable (Wang et al., 2001). L'autre type cellulaire majoritaire de l'épithélium prostatique regroupe les cellules épithéliales luminales. Celles-ci sont situées immédiatement au contact de la lumière des acini et ont un aspect « en colonne ». Elles expriment les cytokératines de faibles poids moléculaires CK8 et CK18 et présentent une forte accumulation du récepteur des androgènes et du marqueur de différenciation terminale $p27^{kip1}$. Ces cellules sont à l'origine des sécrétions prostatiques, et dépendent des androgènes pour leur survie. Les cellules neuro-endocrines sont retrouvées éparpillées à la fois dans le compartiment luminal et dans le compartiment basal de l'épithélium où elles sécrètent des neuropeptides tels que la bombesine, la calcitonine et la neurotensine qui joueraient un rôle dans la croissance et la différenciation de l'épithélium

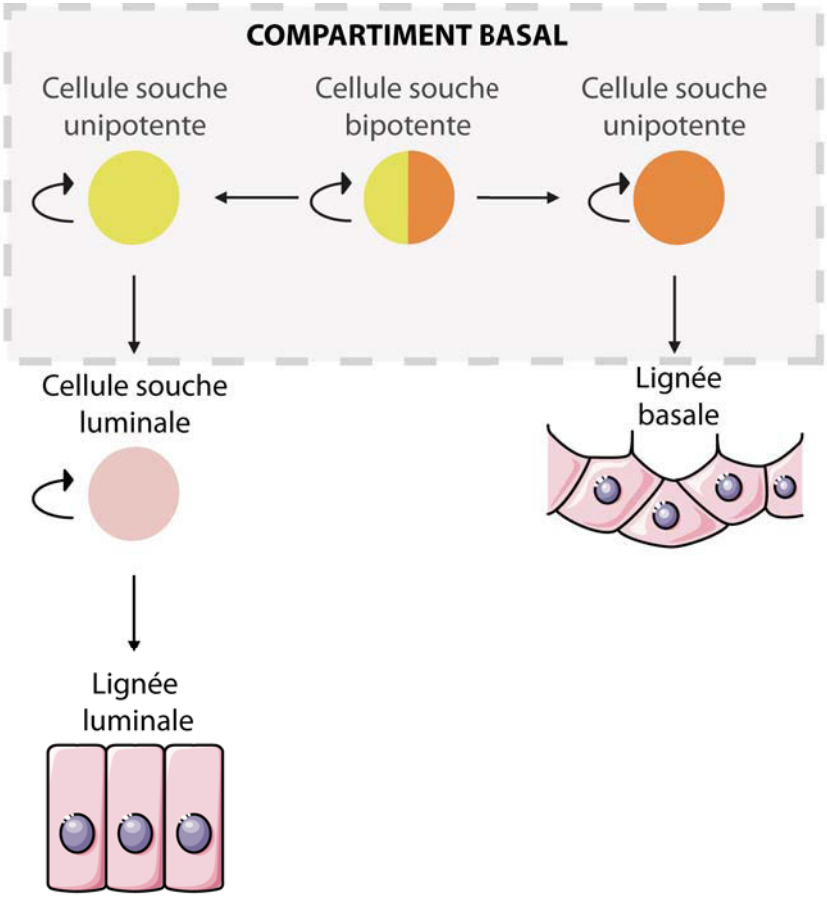



**Figure 10. Hierarchisation des cellules souches dans la prostate.**
En période post-natale, des cellules souches situées dans la partie proximale des canaux prostatiques engendrent des cellules souches engagées vers la lignée luminale ou basale et que l'on retrouve dans l'ensemble des canaux. Hormis les cellules souches luminales, l'ensemble des cellules souches prostatiques se retrouvent dans le compartiment épithélial basal. D'après Ousset *et al.*, 2012.

(Amorino and Parsons, 2004). Elles expriment également des marqueurs spécifiques tels que la chromogranine A, la synaptophysine, la *ParaThyroide Hormone-related Peptide* (PTHrP) ainsi que l'énolase neuronale (*NSE, Neuron Specific Enolase*). Enfin, entre les compartiments basaux et luminaux, il existe des cellules intermédiaires exprimant CK8, CK18, CK5, CK14 et AR. Ces cellules seraient des progéniteurs permettant le renouvellement du compartiment luminal (Díaz-Flores et al., 2006) (**figure 9**).

Des cellules souches sont présentes dans la prostate adulte. En effet, alors que la castration chez la souris entraîne une apoptose massive associée à la perte complète de l'épithélium luminal, l'injection de testostérone permet la régénération totale du compartiment épithélial au sein de la glande. Cependant, la localisation et l'origine de ces cellules sont encore largement débattues et plusieurs hypothèses sont émises quant à leur identité. La première postule que les cellules souches prostatiques sont situées dans le compartiment basal de l'épithélium. Chez les souris dans lesquelles les cellules basales sont absentes suite à l'invalidation de p63 le développement de la prostate est compromis puisque que les bourgeons épithéliaux issus de l'UGS ne se forment pas (Signoretti et al., 2000). La même équipe a montré que les cellules luminales adultes murines dérivent de cellules exprimant p63 grâce à des techniques de lignage cellulaire (Signoretti et al., 2005). Cependant, d'autres modèles ont permis d'appuyer l'hypothèse de l'existence de cellules souches basales et luminales. Choi *et coll.* montrent que la régénération de chacun des compartiments épithéliaux et basaux suite à une castration se fait de façon indépendante (Choi et al., 2012). Il existerait donc des cellules souches luminales et basales. Un dernier modèle récemment publié permet de concilier les deux hypothèses (Ousset et al., 2012) : durant le développement post-natal de la prostate, des cellules souches multipotentes issues du compartiment basal engendrent des lignées de cellules souches unipotentes luminales et basales. Celles-ci vont permettre la regénération de chacun des compartiments à l'âge adulte (**figure 10**). Ce modèle hiérarchisé permet d'expliquer les différences observées dans les études effectuées pendant le développement par rapport à celles effectuées à l'âge adulte par des approches de castration/regénération. Ces cellules souches « originelles » semblent être enrichies dans la partie proximale des canaux prostatiques, proche de l'urètre, et expriment les marqueurs membranaires Sca1, CD133, CD44 et CD117 (Leong et al., 2008).

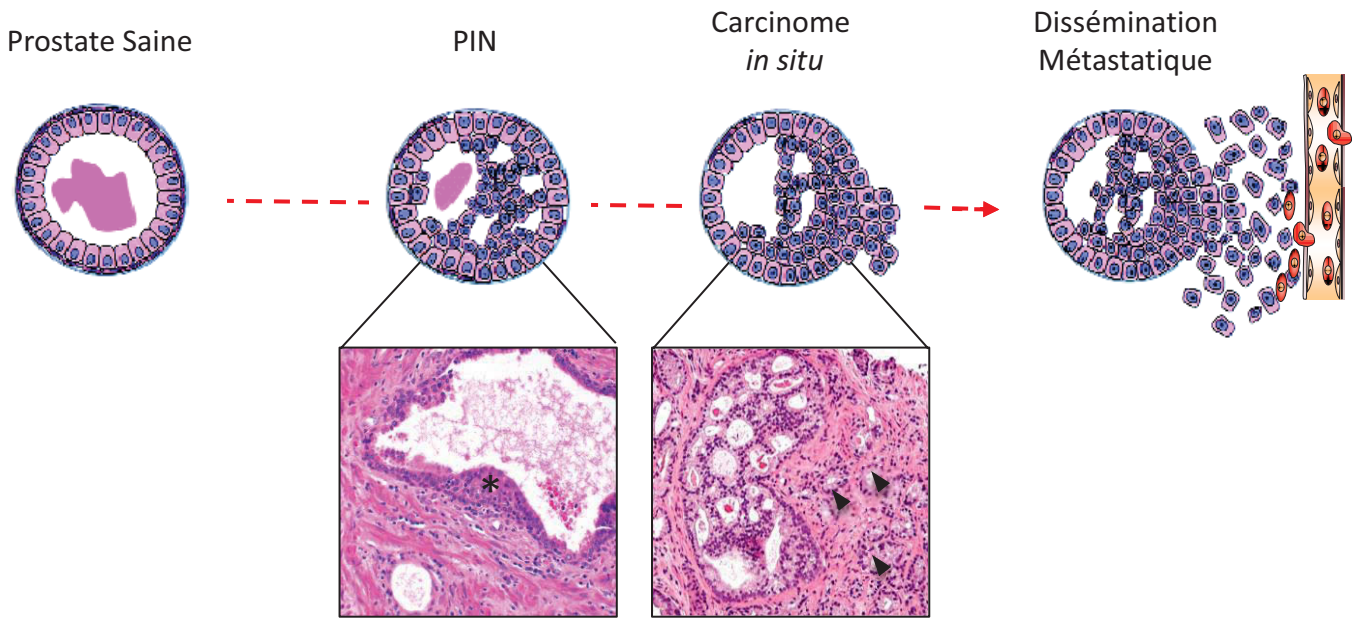


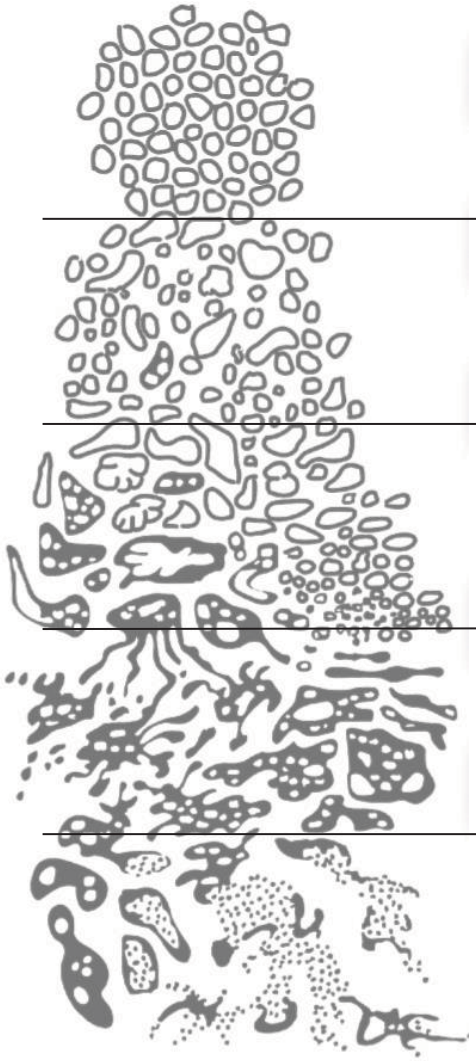

**Figure 11. Evolution du carcinome prostatique.**
Dans la majeure partie des cas, le cancer de la prostate a une origine épithéliale. Les cellules malignes prolifèrent de façon incontrôlée pour aboutir à la formation d'un épithélium poly-stratifié et désorganisé, caractéristique des néoplasies intra-épithéliales prostatiques. La perte de la lame basale permet l'envahissement du stroma par les cellules cancéreuses, signant ainsi l'état de carcinome *in situ*. Enfin, les cellules cancéreuses migrent par les systèmes sanguins et lymphatiques pour former des métastases, principalement au niveau des os. Modifié d'après Abate-Shen & Shen (2000). Les coupes histologiques montrent l'aspect caractéristique des PIN (*) et des carcinomes *in situ* chez l'homme (les têtes de flèches indiquent des cellules épithéliales malignes envahissant le stroma), tel qu'observé au microscope par les cliniciens.

# Le cancer de la prostate

Des anomalies du développement et/ou de l'homéostasie de la prostate sont à l'origine de pathologies de la glande. Ces dérèglements, qui affectent préférentiellement l'homme âgé de 55 ans et plus, sont la prostatite, l'hyperplasie bénigne (BPH, *Benign Prostatic Hyperplasia*) et le cancer. La prostatite est une inflammation aigüe ou chronique de la prostate dont les causes sont le plus souvent bactériennes ou, dans la majorité des cas, idiopathiques. La BPH est une hyperplasie des cellules stromales, des fibres musculaires et de l'épithélium de la zone transitoire. L'augmentation du volume prostatique en découlant entraîne une constriction de l'urètre, plus ou moins importante suivant l'évolution de la maladie, ce qui engendre des troubles de la miction. Enfin, le cancer de la prostate, qui est la pathologie la plus grave pouvant toucher la glande, fera l'objet d'une description détaillée dans ce chapitre.

## 1. Histoire naturelle du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate (CaP) se développe majoritairement dans la zone périphérique de la glande chez l'homme. Dans plus de 95% des cas, une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales luminales est à l'origine de la maladie, que l'on classifiera alors comme étant un adénocarcinome (**figure 11**). Celles-ci s'accumulent de façon désorganisée au sein de l'épithélium et présentent des traits histologiques caractéristiques, tels qu'un nucléole proéminent, un élargissement du noyau et une augmentation de la densité du cytoplasme. A ce stade, on parle de néoplasies intraépithéliales prostatiques (PIN, *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*). En fonction de leur architecture et de leur aspect histologique, elles seront classées en PIN de bas grade (LG, *Low* Grade) et de haut grade (HG, *High* Grade). Les HGPIN présentent de nombreuses altérations moléculaires retrouvées dans les cancers (Tomlins et al., 2007). De plus, elles sont souvent retrouvées à proximité des carcinomes invasifs (DeMarzo et al., 2003), et leur apparition précède très fréquemment l'apparition d'un



**Grade 1**: les acini sont petites, nombreuses et uniformément réparties.

**Grade 2**: les acini sont toujours bien discernables, mais elles sont plus grosses et plus éloignées.

**Grade 3**: les cellules au sein des acini présentent une coloration plus foncée. Certaines envahissent le stroma.

**Grade 4**: quelques acini restent reconnaissables. En revanche beaucoup de cellules malignes ont envahit le stroma

**Grade 5**: Il ne reste quasiment aucun acinus. Le tissu est constitué presque exclusivement de couches de cellules épithéliales malignes.

Différenciation

**Figure 12. Représentation schématique de la gradation de Gleason.**
Les biopsies de patients sont analysées par un anatomopathologiste qui, en fonction de l'aspect des acini et des cellules épithéliales (représentés sur la gauche), attribue un score au cancer. Ce score représente la somme des 2 grades les plus souvent retrouvés dans la tumeur. L'état de différenciation des cellules cancéreuses diminue avec l'augmentation du score.

carcinome dans les dix années qui suivent (Sakr et al., 1993). Pour ces raisons, les HGPIN sont considérées comme étant des lésions pré-malignes précurseurs du CaP, bien que cette relation soit difficile à mettre en évidence expérimentalement. La perte de l'intégrité de la lame basale et l'envahissement par les cellules malignes du stroma environnant signe l'état de carcinome *in situ.* Le cancer s'étend ensuite aux tissus environnants, tels que la vessie, les vésicules séminales, les ganglions lymphatiques ou encore le rectum (Wittekind et al., 2002). Le stade ultime des tumeurs prostatiques se traduit par la formation de métastases. Elles sont associées à une perte d'adhérence des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire, un passage dans le système lymphatique ou sanguin et une colonisation de tissus périphériques tels que les ganglions lymphatiques, les os ou encore le cerveau et le foie (Salvati et al., 2005; Tantivejkul et al., 2004; Zeng et al., 2005).

L'agressivité des tumeurs prostatiques est notamment mesurée par des critères histologiques permettant de définir le score de Gleason (Gleason and Mellinger, 1974) (**figure 12**). Les foyers tumoraux sont gradés par un score allant de 1, pour des formes différenciées et donc peu agressives à 5, pour des tumeurs présentant une population de cellules très atypiques, peu différenciées, et donc plus enclines à la dissémination métastatique. Le score de Gleason est calculé par la somme des deux populations de foyers tumoraux les plus présents lors des analyses anatomopathologiques : les tumeurs de grade 2 à 4 sont qualifiées de cancer de bas grade de malignité, celles de 5 à 7 de cancers de grade intermédiaire et les scores de 8 à 10 de cancers de prostate de haut grade, les plus agressifs et évolutifs. Cette classification, très subjective puisqu'elle dépend du pathologiste effectuant la lecture des lames, reste pourtant l'outil de diagnostic le plus fiable actuellement. D'autres systèmes permettent de classifier les cancers de la prostate, comme la classification TNM qui grade les cancers selon la taille de la tumeur primitive (T), la dissémination au niveau des ganglions lymphatiques (N pour *node*) et la formation de métastases à distance (M). Chaque lettre est affectée d'un coefficient. La lettre T symbolise la tumeur initiale. Elle 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 de 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 métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple.

La classification de D'Amico combine le score TNM, le grade de Gleason et la concentration plasmatique du PSA, dont les niveaux ont tendance à augmenter lors de la perte d'intégrité de la glande, ainsi que lors de la récidive du cancer après son retrait chirurgical (Amico et al., 1998). Toutefois, il reste toujours difficile de discriminer les cancers indolents des cancers agressifs, et de nombreux patients sont sur-traités alors même que leur tumeur présente un faible risque évolutif (Xu et al., 2010). De nombreuses études ont utilisé les outils de séquençage à haut débit pour définir des sous-types de cancers de prostate, afin d'améliorer la prise en charge des patients et définir de nouvelles thérapies ciblées (Taylor et al., 2010; Grasso et al., 2012). Bien que les tumeurs humaines soient très hétérogènes, plusieurs altérations sont fréquemment retrouvées et seront détaillées dans la prochaine partie.

## 2. Mécanismes moléculaires de l'initiation et de la progression du cancer de la prostate

### 2.1. Le récepteur des androgènes joue un rôle clé dans le développement du cancer

La signalisation androgénique joue un rôle primordial dans le développement physiologique de la prostate, mais également dans la survie et le maintien de l'épithélium, normal ou néoplasique, à l'âge adulte. En effet, il est depuis très longtemps connu que l'hormonothérapie qui consiste en la castration chirurgicale ou chimique, entraîne la régression des tumeurs prostatiques (Huggins et al., 1941). Cette thérapie basée sur l'utilisation des antagonistes de AR et/ou des inhibiteurs de l'axe gonadotrope reste encore à l'heure actuelle l'option recommandée lors du diagnostic de cancers localement avancés ou métastatiques et elle présente un taux initial de réponse d'environ 80% avec une disparition des douleurs et une diminution du volume tumoral. L'hormonothérapie est cependant très fréquemment associée à une récidive de la maladie 18 à 24 mois après le

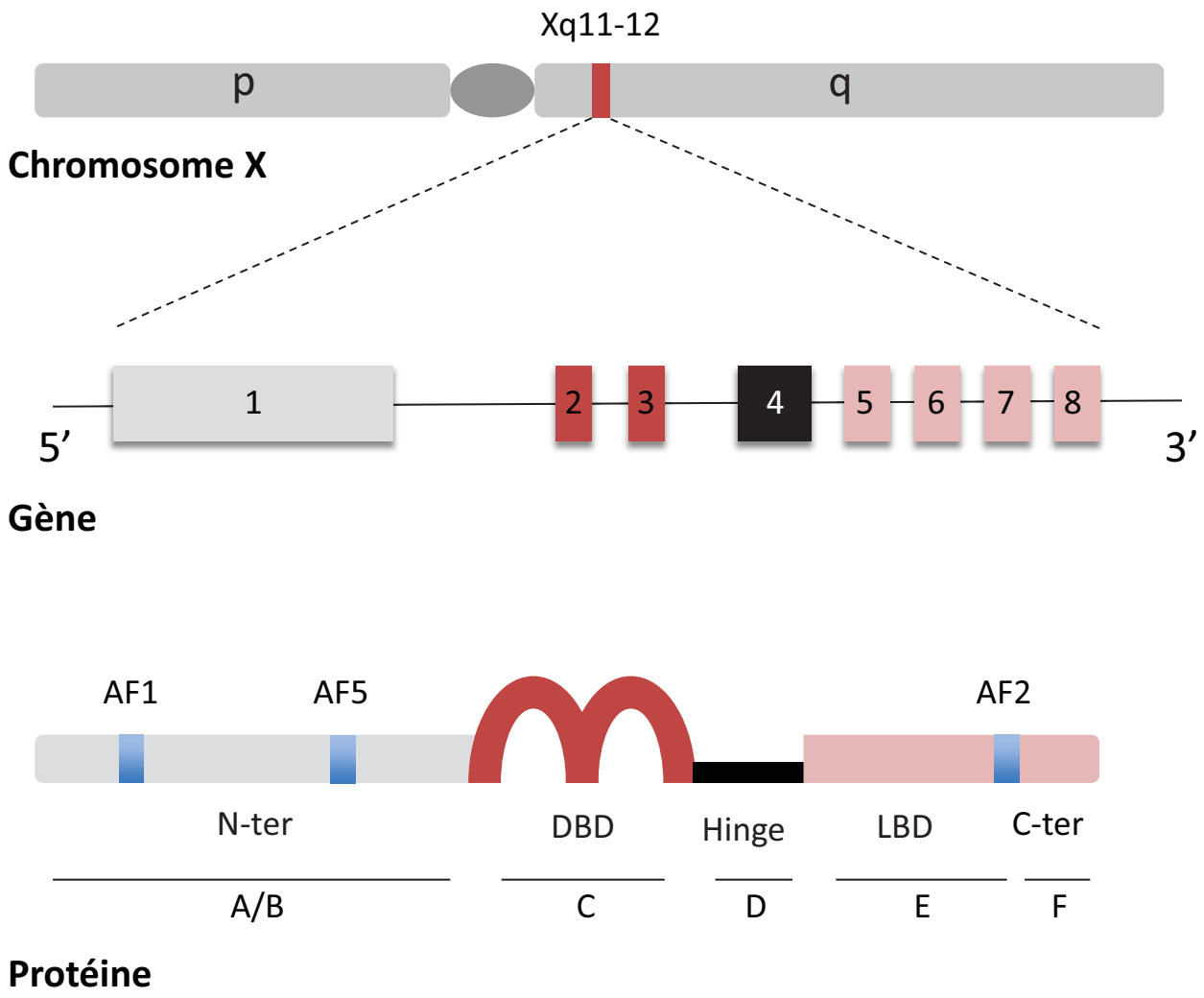



**Figure 13. Structure du récepteur des androgènes (AR)**
Le gène codant pour AR est situé sur le bras long du chromosome X (Xq11-12). Il est composé de 11 exons. La protéine possède plusieurs domaines fonctionnels notés de A à F répartis sur 5 régions: la région amino-terminale (N-ter), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région charnière (Hinge), le domaine de liaison au ligand (LBD) ainsi que le domaine carboxy-terminal (C-ter).

début du traitement (Harris and Reese, 2001), et au développement d'une forme létale du cancer alors qualifié de « résistant à la castration » (CRPC, *Castration Resistant Prostate Cancer*). Cette phase est corrélée à une réactivation de AR en dépit d'une très faible concentration de testostérone plasmatique. Il est donc crucial de comprendre par quels mécanismes moléculaires les cellules cancéreuses prostatiques s'affranchissent de leur dépendance aux androgènes.

### *2.1.1. Le récepteur des androgènes fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires*

Le récepteur des androgènes AR est un facteur de transcription inductible par son ligand appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Comme la majorité des récepteurs nucléaires, AR possède plusieurs domaines fonctionnels notés de A à F (**Figure 13**). La région amino-terminale, qui représente plus de la moitié de la protéine, intervient dans la régulation de la transcription dépendante de AR grâce aux deux domaines transactivateurs AF1 et AF5 (*Activating Function 1/5*), également nommées TAU1 et TAU5 (τ1 et τ5) (Jenster et al., 1995a). Cette région contient de nombreux sites de phosphorylation régulant l'activité, la stabilité ou encore la localisation de AR, et permettant ainsi de moduler son activité biologique de manière dépendante ou indépendante des androgènes. A titre d'exemple, certains résidus sont la cible de kinases effectrices de voies de signalisation dépendante des facteurs de croissance, couplant ainsi l'activité de AR à la prolifération et à la survie cellulaire (Gioeli and Paschal, 2012). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD : *DNA Binding Domain*), hautement conservé entre les différents récepteurs nucléaires, est organisé autour de 2 doigts de zinc. Le premier porte une boîte P responsable de la reconnaissance et de la fixation de AR sur ses éléments de réponse ARE (*Androgen Responsive Element*) (Zilliacus et al., 1995). Ces séquences sont présentes au niveau des régions promotrices des gènes régulés par les androgènes, comme la kallikréine-3 (KLK3) chez l'homme ou la probasine chez les rongeurs. Le second doigt de zinc porte une boîte D responsable de la dimérisation du récepteur et de la stabilisation de son interaction avec l'ADN (van Royen et al., 2012). Cette région est également impliquée dans le changement conformationnel du récepteur

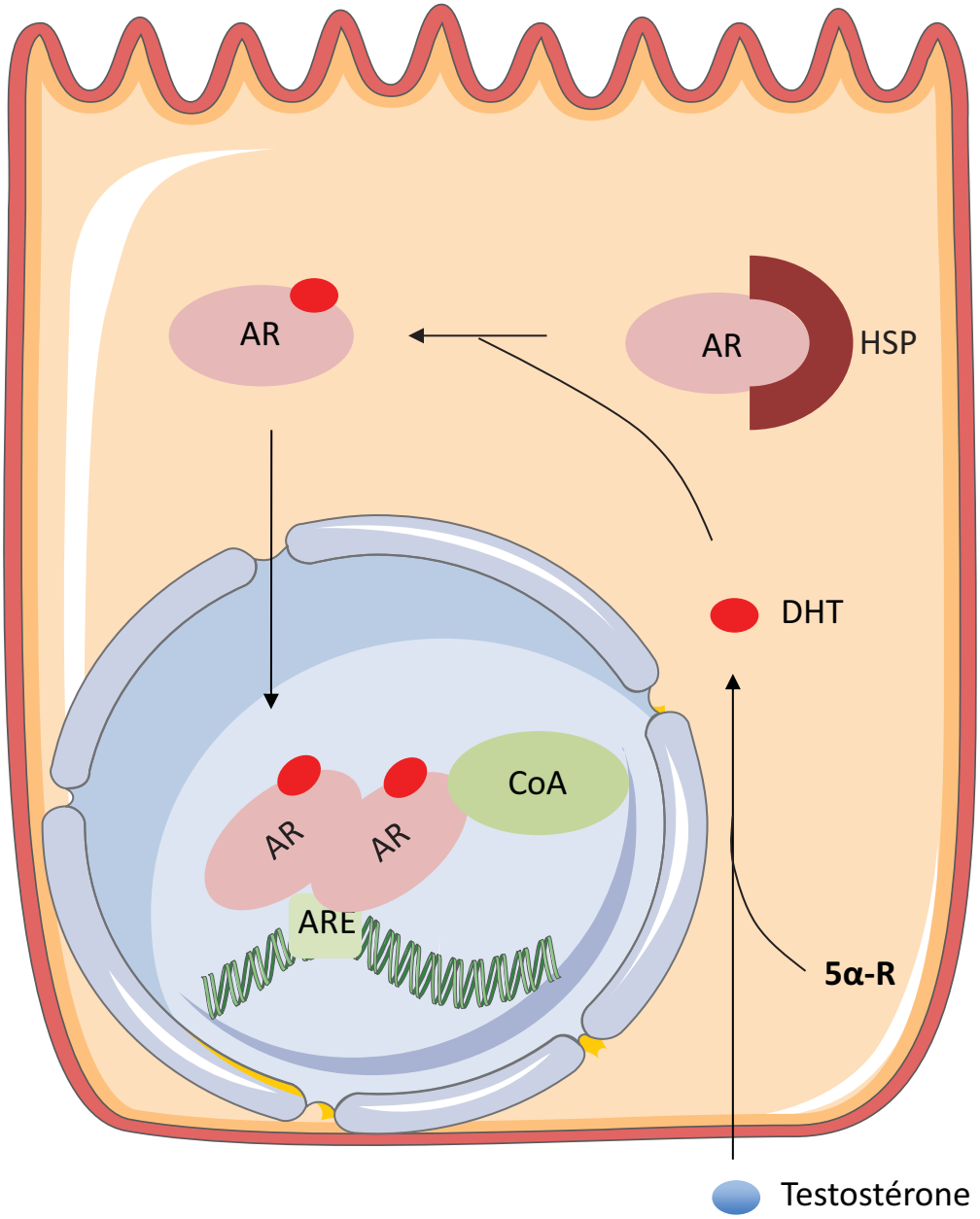



**Figure 14. Mode d'action génomique du récepteur des androgènes (AR).**
La testostérone plasmatique est acheminé aux cellules épithéliales prostatiques via le stroma. Une fois dans le cytoplasme, elle est réduite en dihydrotestostérone (DHT) par la 5α-réductase, ce qui augmente son affinité pour AR. La fixation de la DHT entraine un changement conformationnel de AR. Cela permet sa libération du complexe de chaperonnes HSP ainsi que le démasquage de son signal de localisation nucléaire. Il est alors guidé vers le noyau où il va se fixer sur la chromatine sous forme de dimère au niveau de ses éléments de réponses (ARE). Finalement, le recrutement de coactivateurs et de la machinerie transcriptionelle de base permet la transcription de ses gènes cibles.

induit par la fixation du ligand, et porte un site de phosphorylation nécessaire à l'activité transcriptionelle de AR (Zhou et al., 1995). Enfin, ce domaine est porteur du signal de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localisation Signal*) (Zhou et al., 1994). Le domaine E/F de AR est constitué d'une poche hydrophobe servant à fixer les ligands (LBD, *Ligand Binding Domain*) et d'un domaine de transactivation AF2. La nature des acides aminés qui constituent la poche hydrophobe varie selon les différents récepteurs nucléaires, ce qui leur confère leur spécificité vis-à-vis de leurs ligands. Une fois l'hormone fixée au récepteur, la poche change de conformation ce qui va d'une part, piéger le ligand dans la poche hydrophobe et, d'autre part, permettre l'interaction de co-activateurs transcriptionnels avec le domaine AF2 (van de Wijngaart et al., 2012).

En l'absence de ligands, le récepteur des androgènes est séquestré dans le cytoplasme (**figure 14**). On le retrouve alors associé aux protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 (*Heat Shock Protein*) ainsi qu'aux immunophilines HSP56/FKBP52 et aux co-chaperonnes HSP40/Ydj1, Hop/p60, Hip/p48 et p23 (Prescott and Coetzee, 2006). Ce complexe, appelé « foldosome », est lié à AR principalement au niveau du LBD, et sert notamment à maintenir AR dans une conformation stable présentant une forte affinité pour ses ligands (Fang et al., 1996). Une fois activé, le récepteur se détache du complexe HSP, permettant ainsi le démasquage du signal de localisation nucléaire, et ainsi le guidage de AR vers le noyau. On attribue un rôle clé à la protéine HSP70 pour la prise en charge et la translocation de AR à travers la membrane nucléaire en présence des importines α et ß qui forment un complexe hétérodimérique assurant le pontage avec les pores nucléaires (Tyagi et al., 2000). AR se fixe alors sous une forme homodimérique sur les AREs, séquences palindromiques de type 5'-GGA/TTACAnnnTGTTCT-3' en orientation directe (DR3, *direct repeat*) ou inversée (IR3, *Inverted Repeat 3*), qui lui confèrent sa spécificité d'action envers ses gènes cibles (Claessens et al., 2001). La fixation de AR au niveau de la chromatine avec ses protéines corégulatrices et le complexe d'initiation de la transcription requiert que ce dernier adopte une conformation permettant l'interaction entre ses domaines amino et carboxy-terminaux. La perte de cette interaction communément appelée N/C empêche AR de lier ses éléments de réponse et le rend inapte à activer la transcription (Li et al., 2006). Ce mécanisme d'action déclenché par les androgènes est qualifié de « génomique ».

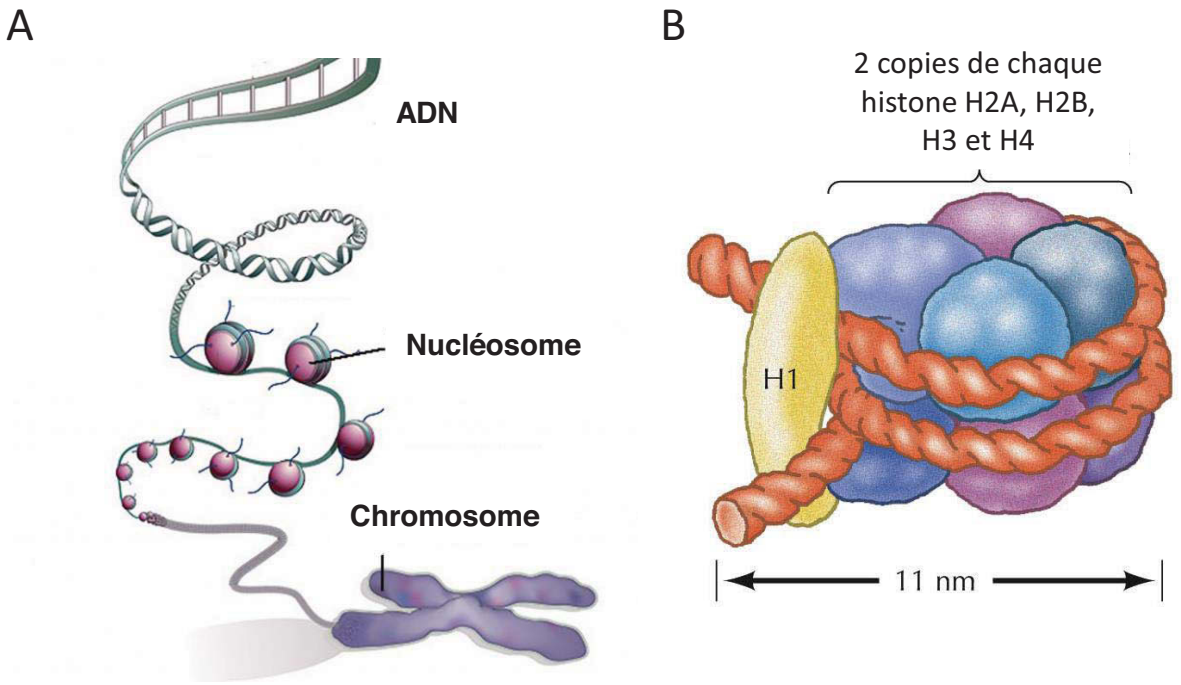



**Figure 15. Structure de la chromatine et des nucléosomes.**
**A**. L'ADN est enroulé de structures protéiques, les nucléosomes, qui permettent sa compaction ou sa décompaction (modifié d'après Qiu *et* al. 2006) **B**. Les nucléosomes sont composés de 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, sur lesquelles viennent s'enrouler 146 paires de bases d'ADN. L'histone H1 vient ensuite sceller ce complexe.

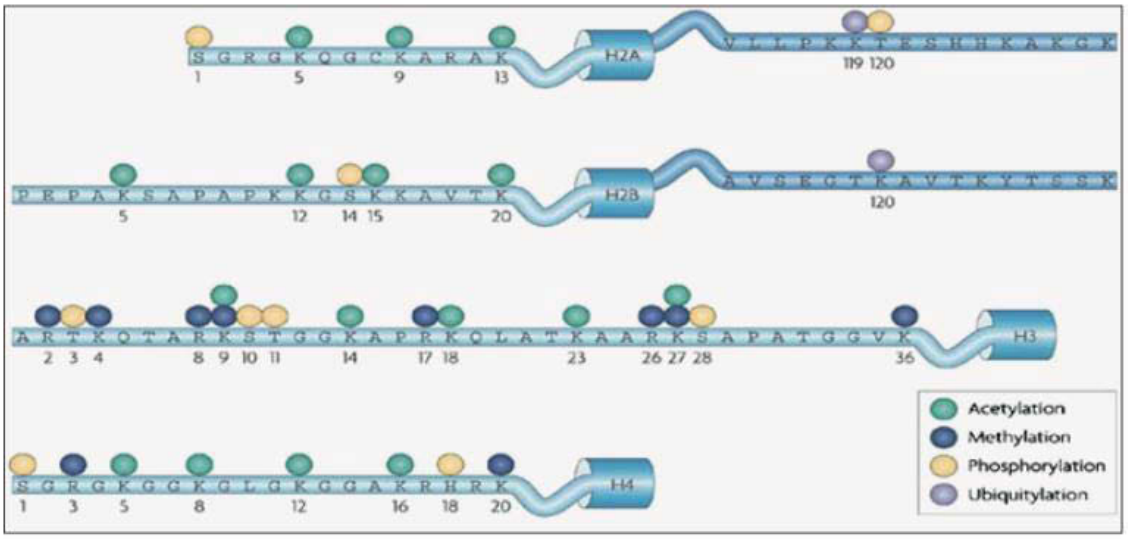



**Figure 16. Résidus ciblés par les principales modifications post-traductionnelles au sein des histones.** Les résidus arginine (R) sont uniquement méthylables alors que les résidus lysines (K) peuvent être méthylés, acétylés et ubiquitinés. La phosphorylation cible spécifiquement les résidus sérine (S) et thréonine (T) et l'ubiquitynation les résidus lysines (K). Une combinaison de ces différentes modifications post-traductionnelles au sein des nucléosomes à un locus donné, permet d'établir un code qui participe à la dynamique chromatinienne et donc à la régulation de l'expression génique.
*D'après Spivakov & Fisher, 2007*

### *2.1.2. Les co-activateurs de AR facilitent son activité transcriptionnelle en décompactant la chromatine*

Après fixation sur les régions régulatrices de ses gènes cibles, AR recrute des partenaires protéiques, les co-activateurs, qui participent à la décompaction de la chromatine, autorisant ainsi le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base. Ces co-activateurs agissent en altérant l'association de l'ADN avec les unités fonctionnelles de la chromatine, les nucléosomes. Ceux ci sont composés d'un octamère de deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 entouré par un brin d'ADN de 146 paires de bases (**figure 15**). Il existe plusieurs types de co-activateurs. Les complexes de remodelage de la chromatine agissent de façon dépendante de l'*adénosine triphosphate* (ATP) en altérant l'association de l'ADN avec les nucléosomes. Les enzymes à activité *histone acétyl-transférase* (HAT) contrôlent le niveau d'acétylation des queues amino-terminales d'histone, permettant ainsi d'augmenter la répulsion électrostatique qui existe entre les histones et l'ADN. Leur action est contrecarrée par des enzymes à activité *histone déacétylase* (HDAC). Enfin, les protéines à activité *histone méthyl-transférase* (HMT) ou *histone déméthylase* (HDM) vont respectivement déposer ou retirer des groupements mono-, di- et triméthyls sur les queues amino-terminales d'histone. Ces groupements chimiques permettent le recrutement de protéines permettant la compaction ou la relaxation de la chromatine, en fonction du résidu ciblé et du nombre de groupements. Ces modifications, parmi d'autres, créent un code complexe que l'on appelle le « code des histones », et qui régule de façon dynamique la structure chromatinienne et donc la transcription génique (pour revue, voir Kouzarides, 2007) (**figure 16**).

### *2.1.3. Altérations touchant directement le récepteur des androgènes*

Les altérations génétiques touchant directement le gène AR ont été les premières à être impliquées dans la survenue du cancer résistant à la castration. En effet, des études cliniques ont montré une amplification du gène AR dans approximativement 1/3 de ces cancers (Visakorpi et al., 1995; Linja et al., 2001). Le rôle d'une surexpression de AR dans l'apparition

du cancer de la prostate a été confirmé *in* vivo, puisque la surexpression ciblée de AR dans l'épithélium prostatique suffit à l'apparition de foyers néoplasiques (Stanbrough et al., 2001).

Des polymorphismes ainsi que des mutations ponctuelles du gène AR ont également été rapportés comme pouvant être la cause de l'apparition et de la progression de la maladie. Au sein du domaine amino-terminal, il existe des répétitions d'acides aminés glutamines (9 à 36 résidus répétés, 20 résidus en moyenne) et glycines (10 à 30 résidus répétés) hautement polymorphiques et dont la longueur est corrélée de façon négative avec l'intégrité et l'activité du récepteur. En accord avec ces données, des personnes ayant un nombre de répétition d'acides aminés glutamine inférieur ou égal à 18 présentent plus de risque de développer un cancer de la prostate métastatique que des personnes ayant plus de 26 répétitions (Giovannucci et al., 1997) . Il existe également des mutations gain-de-fonction de AR qui permettent au récepteur d'être actif même en présence de taux très faibles de testostérone. Parmi celles-ci, la mutation ponctuelle au niveau du codon 877 situé dans le domaine de liason au ligand de AR (LBD, *Ligand Binding Domain*) est la mieux caractérisée. Identifiée dans la lignée humaine de cellules cancéreuses LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*), elle consiste en une substitution d'une thréonine en alanine (T877A) qui permet au récepteur d'être activé par les glucocorticoides, les oestrogènes, la progestérone et même par les antagonistes du récepteur utilisés en thérapie (Zhao et al., 2000; Taplin et al., 1995; Robzyk et al., 2007). D'autres mutations ponctuelles de AR ont été identifiées dans les cellules cancéreuses de prostate. La mutation Valine 515 Méthionine (V515M) et la mutation Leucine 701 Histidine (L701H) confèrent au récepteur des androgènes une activation par les androgènes surrénaliens (*DiHydroEpiAndrostérone* (DHEA) et androstènedione) et par les glucocorticoïdes, respectivement (Tan et al., 1997; Zhao et al., 2000). Ces mutations sont présentes chez certains patients dans une faible population de cellules dans les tumeurs primaires non encore traitées alors qu'elles sont retrouvées plus fréquemment après une thérapie hormonale anti-androgénique (Tilley et al., 1996; Taplin et al., 1999). Ces données suggèrent que ces altérations apparaissent de façon stochastique dans les foyers tumoraux et que la pression de sélection imposée par la privation androgénique et/ou l'administration d'antagoniste de AR favorise la prolifération des cellules ayant acquis ces mutations.

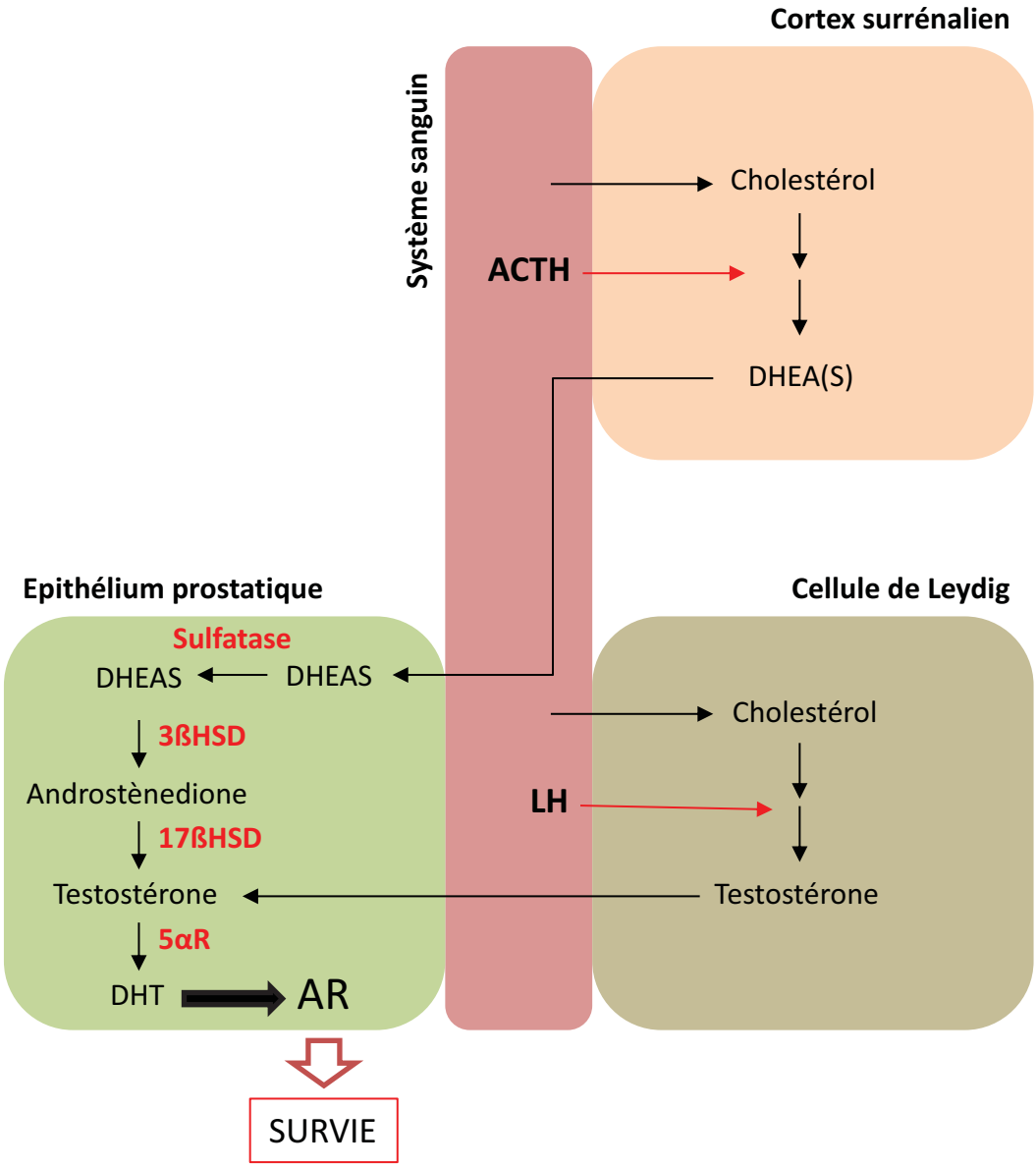



**Figure 17. Synthèse de testostérone au sein de la prostate.**
Sous l'action de l'hormone lutéïnisante (LH) produite par l'hypophyse, le testicule synthétise la testostérone, androgène majoritairement utilisé par la prostate et nécessaire à la survie des cellules épithéliales. La castration physique ou chimique abolit sa production et permet d'induire l'apoptose des cellules androgéno-sensibles dont les cellules cancéreuses.
En réponse à une autre hormone hypophysaire, l'ACTH, le cortex surrénalien humain produit également des androgènes : la dihydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté, la DHEAS. Ces hormones androgéniques n'ont cependant qu'une faible affinité pour AR. Après leur acheminement jusqu'à l'épithélium prostatique via le système sanguin, elles devront donc être convertis en androstènedione, en testostérone et finalement en DHT pour être efficaces. Les deux premières étapes sont rendues possible grâce à l'action de la 3-ßHSD et de la 17-ßHSD, respectivement. Ces deux enzymes clés de la stéroidogenèse sont naturellement exprimées dans la prostate mais leur accumulation anormale dans les tumeurs prostatiques suggère leur implication dans l'apparition de cancers résistants à la castration (CRPC).

Enfin, des anomalies d'épissage de l'ARNm codant pour AR ont été rapportées. Elles génèrent un récepteur dépourvu de son domaine de liaison au ligand (LBD, *Ligand Binding Domain*), lui conférant une activité constitutive (Hu et al., 2009; Guo et al., 2009). En effet, le LBD fonctionne comme un répresseur de l'activité de AR en absence de ligands endogènes (Jenster et al., 1995b). La présence de ces variants d'épissage confère ainsi une résistance des cellules cancéreuses aux traitements anti-androgéniques et démontre leur rôle potentiel dans l'apparition du CRPC.

### *2.1.4. La synthèse de testostérone au sein de la prostate permet une adaptation à la privation androgénique*

L'observation, il y a plus de trente ans, que la concentration de DHT intra-prostatique reste physiologiquement significative même après une castration souleva la question du rôle de la synthèse de testostérone *in situ* dans la progression du cancer vers un stade résistant à la castration. Cette synthèse ectopique peut se faire *via* deux mécanismes, la conversion des androgènes surrénaliens et, dans une moindre mesure, la synthèse *de novo* à partir du cholestérol (**figure 17**). Les androgènes surrénaliens retrouvés abondamment dans la circulation sanguine chez l'homme sont la dihydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté (DHEAS). N'ayant qu'une faible affinité pour AR, leur conversion en DHT est nécessaire pour le maintien des cellules cancéreuses prostatiques. Cette réaction nécessite l'action de deux enzymes clés dans la stéroïdogenèse et naturellement exprimées dans la prostate, la 3-ßHSD et la 17-ßHSD. La 3-ßHSD catalyse la conversion du DHEA en androstènedione. Il a récemment été mis en évidence une mutation ponctuelle dans la séquence du gène codant pour cette enzyme dans 12 à 27% des CRPC (Chang et al., 2013). Cette mutation génère une protéine résistante à l'ubiquitinylation et donc à la dégradation *via* le protéasome. Il en résulte une augmentation de l'accumulation de la 3-ßHSD et une augmentation de la conversion du DHEA en androstènedione. La conversion de l'androstènedione en testostérone est aussi accélérée dans les CRPC puisque l'enzyme catalysant cette réaction, la 17-ßHSD, y est retrouvée fréquemment surexprimée (Stanbrough et al., 2006). De manière intéressante, l'augmentation du ratio 17-ßHSD/5α-

| Co-activateur | Fonction | Expression |
|---|---|---|
| ARA70 | Activation par autres stéroides et anti-hormones | + |
| FHL2 | Activation sans ligand | + |
| TIF-2 | Activation par d'autres voies de signalisation | +++ |
| p300 | Activation par stimulation à l'IL-6 | +++ |
| CBP | Activation par hydroxyflutamide | +++ |
| TIP60 | Régulation du promoteur du PSA | +++ |
| SRC-1 | Potentialise l'action de la DHT | +++ |
| SRC-3 | Inhibition de l'apoptose par activation d'AKT | +++ |
| RNF6 | Ubiquitinylation | + |
| HSP90 | Localisation nucléaire | + |
| Gelsoline | Activation par l'hydroxyflutamide | + |
| Filamine A | Résistance aux anti-androgènes | + |

**Figure 18. Principaux co-activateurs de AR impliqués dans le cancer de la prostate.**
Les fonctions décrites sont dirigées envers AR, sauf pour SRC-3. Les expressions représentent celles observées dans une tumeur par rapport au tissu sain. +: présence; +++: surexpression; +++: surexpression après castration.

réductase chez les patients ayant subi une castration entraîne une forte diminution du ratio DHT/ testostérone, qui passe de 10:1 chez des patients non castrés à 0,25:1 chez des patients castrés présentant des métastases (Montgomery et al., 2008). Ces données suggèrent alternativement que le cancer hormono-résistant devient plus dépendant de la testostérone que de la DHT au fur et à mesure de sa progression, ou que de forts taux de testostérone intratumoraux suffisent à la survie et au maintien des cellules malignes.

### *2.1.5. L'expression et l'activité des cofacteurs de AR sont altérés durant la progression du cancer*

Plusieurs types de co-activateurs de AR ont leur expression augmentée dans les cancers de prostrate hormono-résistants (**figure 18**). Les co-activateurs de la famille p160, parmi lesquels sont retrouvés SRC1/NcoA-1, SRC2/GRIP1/NcoA-2/TIF2 et SRC3/pCIP/ACTR/AIB1/TRAM1/RAC3 ont largement été étudiés dans la pathologie prostatique. Ces protéines facilitent la transcription dépendante de AR en se comportant comme des plateformes de recrutement pour des co-facteurs à activité HAT tels que CBP/p300 (*Creb-Binding Protein/*p300) et pCAF (*p300/Cbp Associated* Factor) et des co-facteurs à activité HMT tels que CARM1 (*Coactivator-Associated aRginine Methyltransferase* 1) et PRMT1 (*Protein aRginine n*-MethylTransferase). Il est clairement établi que SRC1 est surexprimé dans les cancers hormono-résistants par rapport aux cancers hormono-dépendants et aux hyperplasies bénignes de la prostate (BPH, *Benign Prostatic* Hyperplasia) (Gregory et al., 2001). De plus, il existe une corrélation entre le niveau d'accumulation de SRC1, le score de Gleason et la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques de la région pelvienne (Agoulnik et al., 2005). De même, SRC2 est également surexprimé dans le noyau des cellules cancéreuses de patients en hormono-résistance par rapport à des échantillons de tumeurs hormono-sensibles ou des échantillons de BPH (Gregory et al., 2001). Dans le modèle de xénogreffes de cellules cancéreuses de prostates humaines CWR22, la surexpression de SRC1 ou de SRC2 autorise l'activation de AR par des androgènes surrénaliens. SRC3 semble aussi être plus fortement accumulé dans les cellules cancéreuses et son niveau d'accumulation est corrélé à une vitesse de prolifération

supérieure et à un index apoptotique inférieur des cellules cancéreuses analysées sur les biopsies (Zhou et al., 2005). Enfin, la surexpression de SRC-3 est associée à un pronostic défavorable pour les patients (Gnanapragasam et al., 2001). Il semble néanmoins que les effets d'une surexpression de SRC-3 dans les cellules cancéreuses prostatique mobilise la voie de survie cellulaire PI3K/AKT et soient donc en partie indépendants du récepteur des androgènes (Zhou et al., 2003).

Des anomalies de localisation cellulaire ont aussi été rapportées, comme pour le co-activateur TIP60 qui présente une accumulation nucléaire dans 87% des cancers hormono-résistants alors que sa distribution est beaucoup plus diffuse au niveau des hyperplasies bénignes ou des cancers non traités (Halkidou et al., 2003). TIP60 serait impliqué dans l'acétylation de AR permettant sa translocation dans le noyau pour stimuler la transcription de ses gènes cibles, et la relocalisation ou la surexpression de TIP60 suite à une privation androgénique pourrait ainsi participer à l'acquisition de l'androgéno-indépendance (Shiota et al., 2010).

L'histone méthyltransférase CARM1 catalyse la méthylation de l'arginine 17 de l'histone H3 sur les promoteurs de gènes cibles de AR en réponse à une stimulation androgénique. La diminution de son expression par interférence ARN induit un arrêt de prolifération ainsi qu'une apoptose dans les cellules cancéreuses prostatiques (Majumder et al., 2006). Dans les échantillons cliniques, son accumulation est plus importante dans les cellules épithéliales d'adénocarcinomes que dans les PINs, elle-même plus importante que dans le tissu sain. Ces différences de marquage se vérifient aussi bien au niveau du cytoplasme que du noyau des cellules (Hong et al., 2004). De plus, il apparaît que son expression augmente dans des tumeurs hormono-résistantes par rapport à des tumeurs de patients non-traités, suggérant son rôle dans l'apparition du CRPC.

En plus de conférer aux cellules cancéreuses une sensibilité accrue aux androgènes après castration, des altérations dans l'expression de certains co-activateurs, peuvent changer l'action d'un antagoniste de AR en un agoniste. C'est le cas par exemple de ARA70, premier co-activateur de AR à avoir été identifié (Yeh and Chang, 1996). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués ne soit pas clairement définis, on sait qu'une surexpression de ARA70

permet à AR de répondre positivement à l'hydroxyflutamide, un anti-androgène utilisé en thérapie (Hu et al., 2004).

La fixation d'antagonistes, comme le bicalutamide, sur le récepteur des androgènes induit le recrutement de complexes de co-represseurs, comme NCoR 1 (*Nuclear Receptor Corepressor*) ou NCoR/SMRT (*Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid hormone Receptor*) (Hodgson et al., 2005). Ces complexes contiennent notamment des protéines à activité histone déacétylase induisant la compaction de la chromatine et donc l'inhibition de la transcription. Des données plus récentes montrent cependant qu'une surexpression de NCoR stimule l'activité de AR en présence de DHT dans des lignées de cellules humaines de cancer de prostate (Laschak et al., 2011). De plus, l'activation de NCoR *via* sa phosphorylation par la caséine kinase 2 (CK2) est nécessaire aux capacités invasives des cellules androgéno-indépendantes PC-3 (Yoo et al., 2013). Ces données sont confortées par le fait qu'une phosphorylation accrue de NCoR dans des échantillons tumoraux humains est corrélée à un mauvais pronostic. Au final, le rôle des corépresseurs de AR reste encore mal compris dans l'étiologie moléculaire du cancer de la prostate.

### 2.2. Altération des voies signalisation des facteurs de croissance

Les voies de signalisations dépendantes des facteurs de croissance sont depuis longtemps incriminées dans de nombreux types de cancers, parmi lesquels le cancer de la prostate. En effet, la dérégulation de l'expression ou de l'activité de facteurs sécrétés, comme l'EGF ou l'IGF (*Insuline-like Growth* Factor), de leurs récepteurs et des protéines intracellulaires effectrices, est souvent observée dans les cancers de prostate. Ces voies régulent de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération, la survie cellulaire ou encore la régulation du métabolisme, permettant ainsi aux cellules cancéreuses de s'adapter aux contraintes qu'elles rencontrent au fur et à mesure de la progression tumorale.

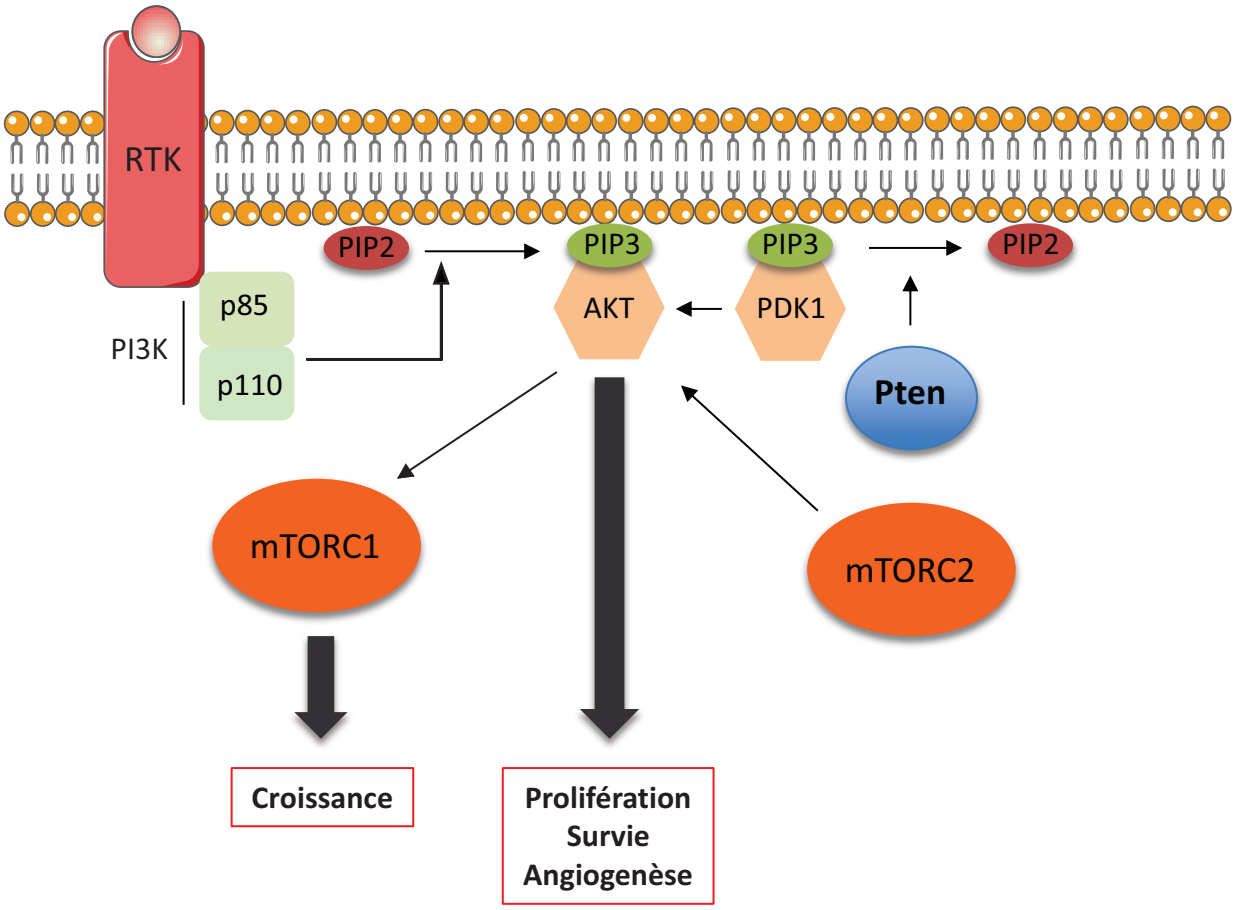



**Figure 19. La voie PI3K/AKT/mTOR.**
L'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase par fixation de son ligand (facteurs de croissances ou cytokines) entraine son homodimérisation et la transphosphorylation de son domaine intracellulaire. Un changement de conformation permet alors le recrutement de la PI3K. Celle-ci catalyse la phosphorylation de phosphatidylinositols diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) qui servent de points d'ancrage pour des protéines à domaine PH (*Pleckstrin Homology*) telles que PDK1 et AKT. PDK1 active alors partiellement AKT par phosphorylation sur son résidu thréonine 308. Une phosphorylation supplémentaire réalisée par le complexe mTORC2 (PDK2) sur son résidu sérine 473 entraine son activation complète. AKT peut alors phosphoryler de nombreuses cibles cellulaires, pour stimuler la prolifération, la survie, l'angiogenèse ou encore la croissance. La phosphatase PTEN joue un rôle régulateur crucial, puisqu'elle permet de déphosphoryler les PIP3 en PIP2 pour éteindre la voie.

### *2.2.1. La voie PI3K/AKT/mTOR*

La voie PI3K/Akt/mTOR est altérée dans 40% des tumeurs prostatiques primitives et dans la quasi totalité des cancers métastatiques, ce qui souligne son importance fondamentale dans la carcinogenèse prostatique (Taylor et al., 2010a). Ces altérations mènent à une activation aberrante de la voie et sont associées à un mauvais pronostic (Kreisberg et al., 2004). L'importance de cette voie dans la transformation maligne s'explique par son implication dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux, comme la régulation de la survie cellulaire, de la prolifération, du métabolisme ou encore de l'angiogenèse.

#### a) La perte de la phosphatase PTEN est un évènement clé dans la tumorigenèse prostatique

La diminution ou la perte totale de l'expression de PTEN (*Phosphatase and TENsin Homolog*) constitue l'un des événement les plus fréquents conduisant à l'activation aberrante de la voie PI3K/AKT/mTOR dans les cancers de la prostate (Ruscetti and Wu, 2013). Cette phosphatase a un rôle antagoniste vis-à-vis de la PI3K (*Phosphatidyl-Inositol-3-phosphate Kinase*) qui augmente le niveau de phosphorylation de lipides membranaires de type phosphatidylInositols (PtdIns), en réponse à un signal mitogénique. Ces messagers secondaires permettent le recrutement à la membrane de protéines possédant le domaine *Pleckstrin Homology* (PH) de fixation aux PtdIns phosphorylés. Parmi elles, AKT/PKB (*Protein Kinase B*) est activée par la phosphorylation de ses résidus thréonine 308 (T308) et sérine 473 (S473) par les *Phosphoinositide-Dependant Kinases* (PDK) 1 et 2, respectivement. Akt ainsi activée peut modifier le degré de phosphorylation d'un vaste panel de cibles en aval pour exercer son action biologique (**figure 19**). En absence de PTEN, la voie devient beaucoup plus sensible aux facteurs de croissance puisque les messagers secondaires produits par la PI3K ne sont plus recyclés. Cela entraîne une augmentation de la prolifération et la promotion de la tumorigenèse *in vivo*. En effet, les souris invalidées pour PTEN spécifiquement dans l'épithélium prostatique, développent les différentes étapes du cancer observées chez l'homme, jusqu'à l'apparition d'un CRPC 6 jours après leur castration (Wang et al., 2003b). Outre sa valeur prédictive sur la progression du cancer de la prostate

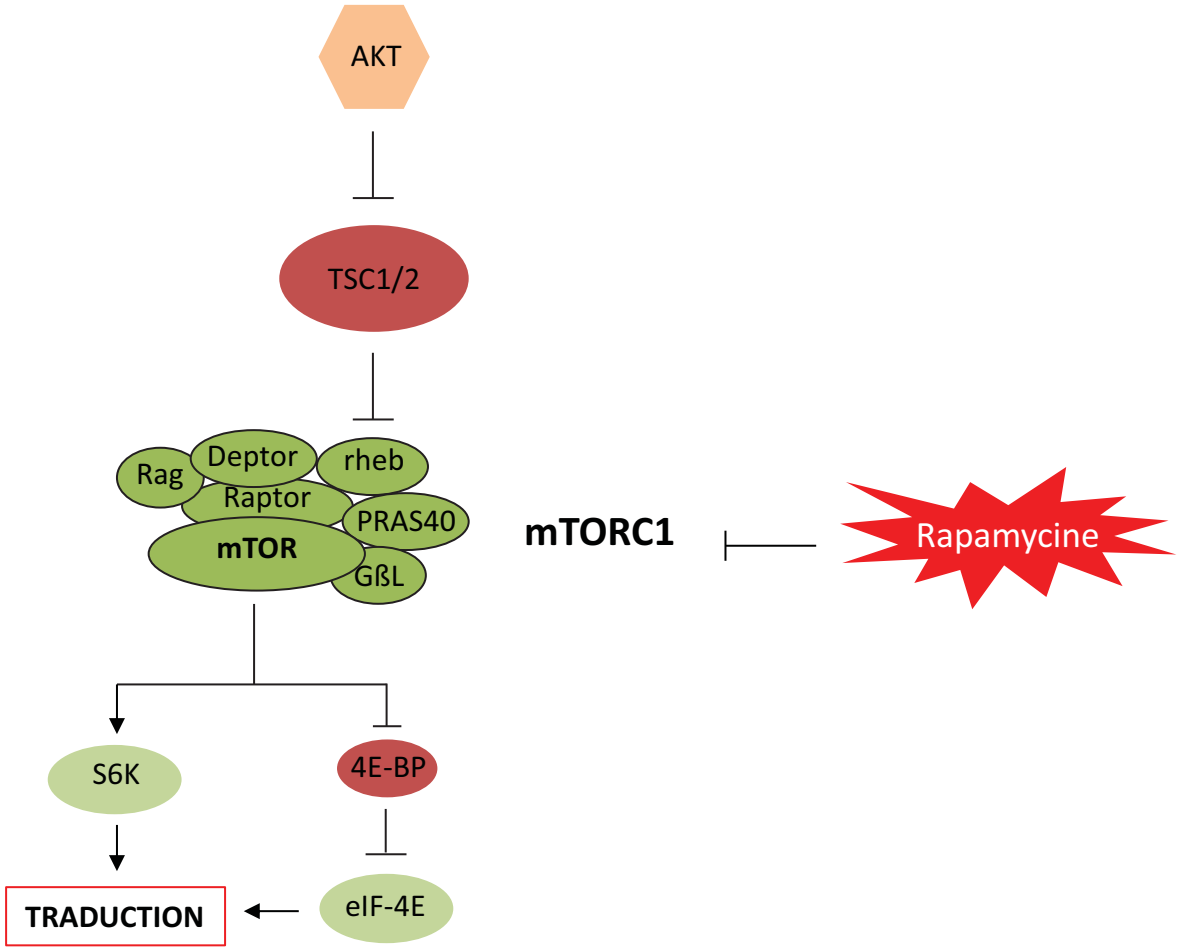



**Figure 20. Régulation de mTORC1 par AKT.**
Le complexe mTORC1 est composé de 7 protéines. Au delà de mTOR, ce complexe comprend les GTPases Rheb et Rag, importantes pour la régulation de mTOR dépendante du complexe TSC1/2 et de la concentration intracellulaire en acides aminés, respectivement; RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR),* qui est impliqué dans l'assemblage du complexe et dans le recrutement des protéines cibles de mTOR; GßL (aussi connu sous le nom de mLST8 (*mammalian Lethal with Sec13 protein 8*)) dont le rôle est mal compris; PRAS40 (*Proline Rich Akt Substrate 40 kDa*) et Deptor (*DEP-domain-containing mTOR interacting protein*) qui sont phosphorylées par mTOR, ce qui entraîne leur dissociation et l'activation du complexe. AKT inhibe TSC1/2 par phosphorylation, autorisant en cascade l'association Rheb-GTP et l'activation de mTORC1. Parmi ses cibles les mieux caractérisées, nous retrouvons les protéines S6K et 4E-BP, toutes deux impliquées dans la traduction et donc la synthèse protéique. mTORC1 peut être rapidement inhibé en aval de TSC1/2 par un traitement à la rapamycine.

vers des stades métastatiques (Lotan et al., 2011), la perte de PTEN stimule la prolifération des cellules cancéreuses en absence d'androgènes, en renforçant l'activité de AKT (Carver et al., 2011; Mulholland et al., 2011). De plus, des études précliniques ont montré que la perte de PTEN est associée à une dédifférenciation des cellules cancéreuses qui acquièrent alors des caractéristiques de cellule mésenchymateuse. Ce phénomène, la transition epithélio-mésenchymateuse (EMT), permet l'envahissement du stroma environnant et est nécessaire à la dissémination métastatique (Dubrovska et al., 2009; Mulholland et al., 2012). Enfin, plusieurs études ont fait part d'une coopération entre la perte de PTEN et d'autres lésions oncogéniques, comme la perte de SMAD-4 ou l'activation de K-RAS, dans le développement et la progression du cancer vers sa forme létale (Ding et al., 2011; Mulholland et al., 2012).

### b) mTOR est un effecteur important de AKT

Les protéines de la famille TOR sont activées par la voie PI3K/AKT et jouent un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme, la croissance, la prolifération ainsi que la migration cellulaire. Chez les mammifères, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) est une sérine/thréonine kinase de 280 kDa appartenant à la famille des *Phosphatidyl Inositol Kinase-related Kinase* (PIKK). Alors que les mutations ou les surexpressions de mTOR dans les cancers sont rares, sa position d'effecteur essentiel de la voie PI3K/AKT en a fait une potentielle cible thérapeutique de choix dans le traitement du cancer de la prostate. De fait, des études précliniques utilisant des modèles de souris hyperactives pour la voie PI3K/AKT montrent un ralentissement de la progression tumorale suite à l'administration d'inhibiteurs spécifiques de mTOR appartenant à la famille de la rapamycine (rapalogues) (Majumder et al., 2004). A ce jour, ces effets inhibiteurs sur la progression tumorale n'ont pas été mis en évidence chez l'homme suggérant l'existence d'altérations concomitantes d'effecteurs plus en aval dans la voie ou de co-activateurs de mTOR (Amato et al., 2008; Templeton et al., 2013).

mTOR est impliqué dans la formation de 2 complexes différents. Le premier (*mTOR Complex 1*, mTORC1) joue un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme et de la croissance cellulaire et son activité est régulée par la disponibilité en nutriments et par les signaux de croissance extracellulaires qui activent notamment la voie PI3K/Akt/mTOR (**figure 20**). En

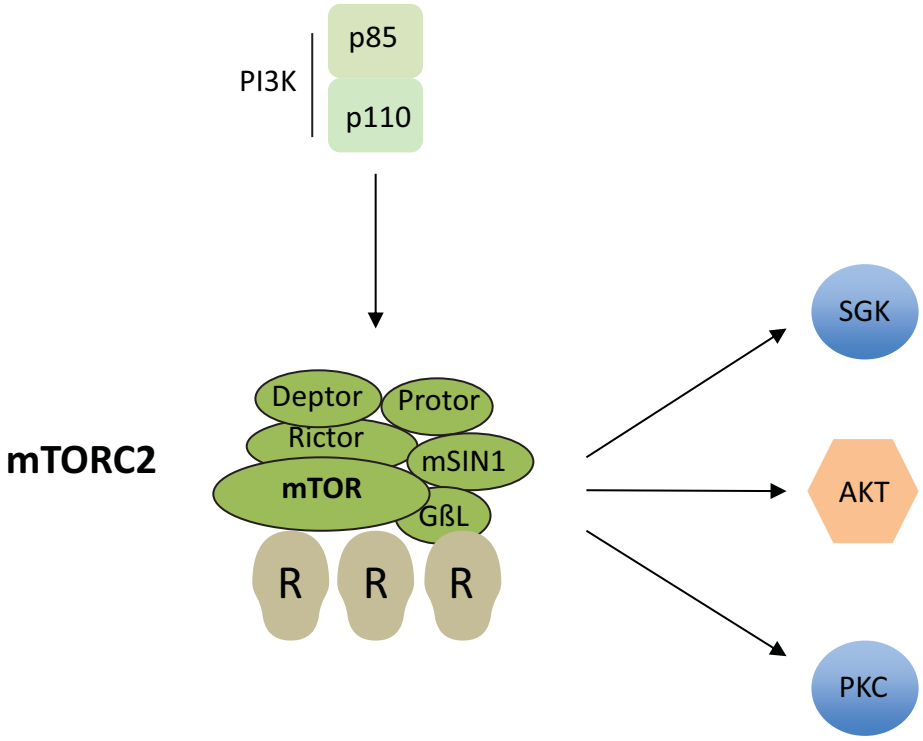



**Figure 21. Composition et cibles du complexe mTORC2.**
Le complexe mTORC2 est composé de 5 protéines en plus de mTOR. Deux sont communes avec le complexe mTORC1 (GßL et Deptor). Les protéines contenues exclusivement dans le complexe mTORC2 sont: Rictor (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*) qui joue un rôle similaire à celui de Raptor dans le complexe mTORC1; mSIN1 (*mammalian Stress-actvated protein kinase INteracting protein*) qui contribue avec Rictor à la stabilisation du complexe; et Protor (*PRotein Observed with ricTOR-1*) dont la fonction n'est à ce jour pas encore définie. Peu de données sont disponibles quant aux mécanismes permettant de contrôler en amont l'activité de mTORC2. Il a toutefois été montré que la PI3K active mTORC2 en permettant son interaction avec les ribosomes (R). Parmi les quelques cibles décrites comme étant activées par mTORC2, nous pouvons citer la SGK (*Serum and Glucocorticoid-induced protein Kinase*), AKT, ou encore la protéine kinase C (PKC).

condition basale, le complexe composé des protéines *Tuberin Sclerosis Complex 1* et 2 (TSC1/TSC2) inhibe l'activité de mTORC1. En présence de facteurs de croissance, l'activation de AKT conduit à la phosphorylation inactivatrice de TSC2 afin de lever la répression qu'il exerce sur mTORC1. Lorsqu'il est activé, le complexe mTORC1 stimule la croissance cellulaire en favorisant la synthèse protéique. Cet effet est relayé notamment par deux de ses cibles, S6K (*ribosomal protein S6 Kinase*) et 4E-BP1 (*eucaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1*). S6K est une kinase qui, une fois activée, phosphoryle et inhibe l'activité de PDCD4 (*Programmed Cell Death protein 4*), un inhibiteur de la traduction (Dorrello et al., 2006). Une autre cible de S6K est la protéine ribosomale S6, dont la phosphorylation sert de marqueur d'activité du complexe mTORC1. Néanmoins, la fonction de S6 n'est pas connue à ce jour. Finalement, la phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR lève l'inhibition exercée sur le facteur d'élongation eiF4-E, ce qui favorise la traduction (Fingar et al., 2002). mTORC1 est le principal complexe ciblé par la rapamycine. Celle-ci se fixe sur la protéine FKBP12 du complexe mTORC1 et inhibe alors une partie de l'activité kinase de mTOR, notamment envers S6K (Sarbassov et al., 2005).

Contrairement à mTORC1, le complexe mTORC2 (mTOR Complex 2) est insensible à la rapamycine, même si une étude a montré qu'un traitement prolongé peut aussi l'inhiber en jouant sur la disponibilité de mTOR (Sarbassov et al., 2006). Les mécanismes contrôlant l'activité de mTORC2 sont encore peu connus, et peu de cibles moléculaires de ce complexe ont été identifiées (**figure 21**). Il a toutefois été montré que la stimulation de la voie PI3K/Akt par l'insuline induit l'activation de mTORC2 alors qu'un inhibiteur de la PI3K, le Wortmannin, la diminue (Huang et al., 2008). Cette activation semble dépendre de l'interaction de mTORC2 avec les ribosomes, bien que les mécanismes mis en jeu soient pour l'instant inconnus (Zinzalla et al., 2011). Inversement, l'invalidation des gènes codant pour les protéines présentes dans le complexe mTORC2 abolit la phosphorylation de la sérine 473 d'AKT *in vivo* (Guertin et al., 2006; Jacinto et al., 2004). Ces données identifient donc mTORC2 comme étant le facteur PDK2, l'un des activateurs essentiels de la protéine AKT. Ainsi, AKT et les autres cibles de mTORC2, incluant SGK (*Serum and Glucocorticoid-induced protein Kinase*) et la PKC (*Protein Kinase C*) seraient impliquée dans le rôle pro-prolifératif et anti-apoptotique de mTORC2 (Sparks and Guertin, 2010).

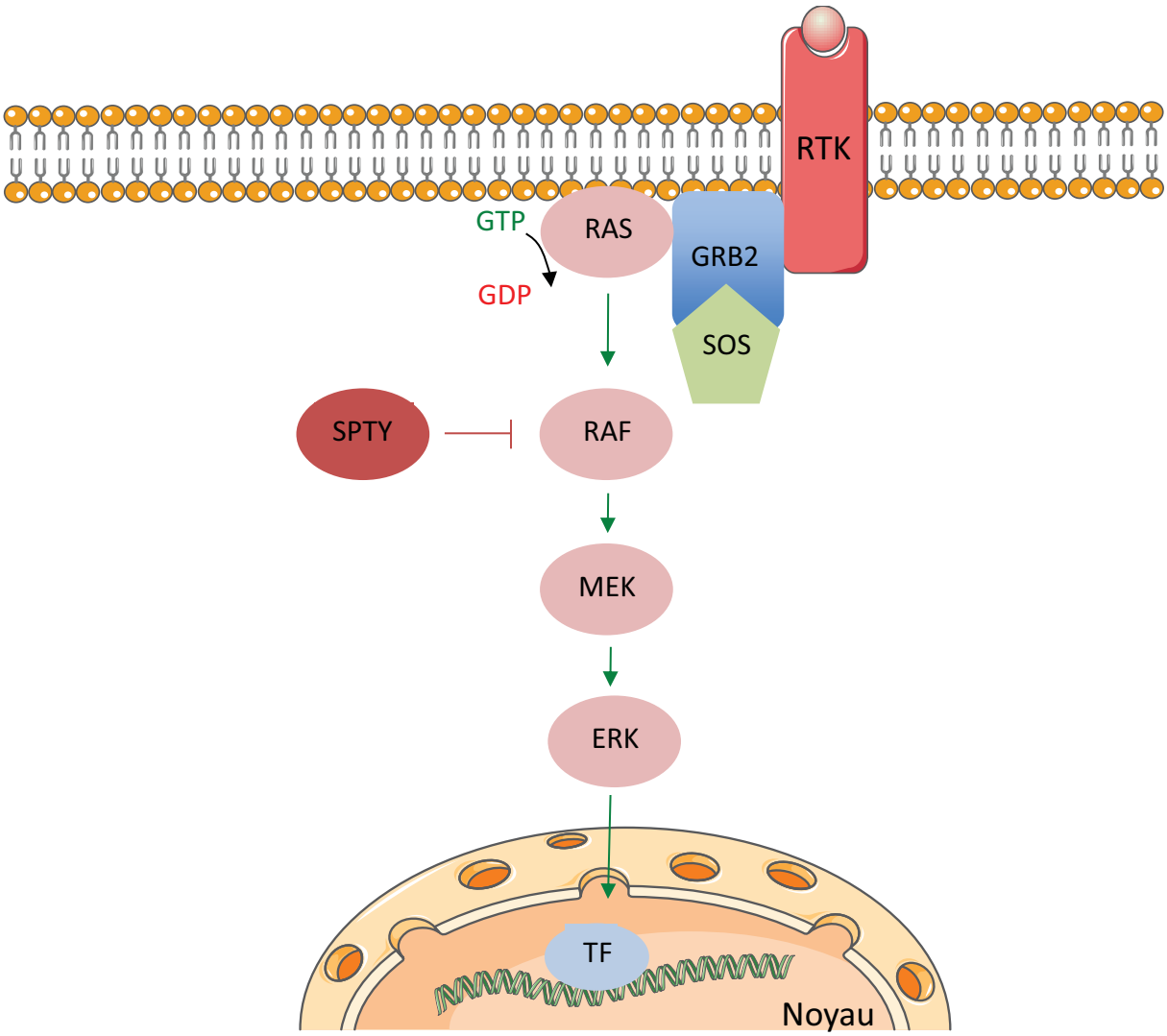



**Figure 22. La voie de signalisation MAPK/ERK.**
De la même façon que pour la voie PI3K/AKT/mTOR, la fixation d'un ligand sur le récepteur de type RTK provoque la phosphorylation de son domaine intracellulaire et un changement de conformation permettant le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2. Grb2 interagit alors avec la protéine SOS, qui devient active et retire le GDP fixé sur la GTPase Ras. Ras ainsi activé se fixe et active la kinase Raf, entrainant une cascade de phosphorylation menant à l'activation de MEK puis de ERK. Cette dernière est responsable de la phosphorylation de facteurs de transcription menant à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire. Cette voie de signalisation est notamment contrôlée par les protéines de la famille Sprouty (Spty) qui inhibent l'activation de Raf.

### *2.2.2. La voie des MAPK*

L'activation aberrante de la signalisation dépendante des *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) est aussi corrélée avec la progression du cancer de la prostate, l'acquisition de l'indépendance vis-à-vis des androgènes ainsi qu'à un pronostic défavorable pour les patients (Abreu-Martin et al., 1999; Gioeli et al., 1999; Mukherjee et al., 2005; Weber and Gioeli, 2004). Cette voie est hyperactive dans 43% des tumeurs prostatiques primaires et jusqu'à 90% des tumeurs métastatiques, soulignant son importance dans l'étiologie moléculaire du cancer de la prostate (Taylor et al., 2010a).

#### a) L'expression d'une forme constitutivement active de Ras stimule l'oncogenèse prostatique

L'activation de la voie des MAPK dans le cancer de la prostate est due principalement à une surexpression des facteurs de croissance tels que l'EGF, le TGF-α, le KGF, le bFGF ainsi que IGF-1 (Culig et al., 1994a, 2000, 2002). En effet, peu de mutations activatrices ou d'altérations chromosomiques touchant des effecteurs de la voie des MAPK ont été rapportées dans les échantillons cliniques, contrairement à d'autres cancers comme ceux du colon, du pancréas ou du poumon (Bryant et al., 2014; Tan and Du, 2012; Tímár, 2014). L'utilisation d'une forme mutante constitutivement active de Ras est cependant utilisée en recherche fondamentale afin de mimer l'activation de la voie des MAPK observée dans les tumeurs prostatiques. RAS est recrutée à la membrane plasmique suite à l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que l'EGFR pour activer en cascade les protéines RAF, MEK (*Mapk/Erk Kinase*) et ERK1/2 (*Extracellular Regulated protein Kinase*) qui est l'effecteur le plus en aval de la voie (**figure 22**). Bien que l'activation de RAS ne soit pas suffisante pour l'initiation de la tumorigenèse prostatique, sa combinaison avec d'autres altérations telles que la surexpression de AR, l'activation de la ß-caténine ou encore la perte de PTEN aboutit à une accélération du phénotype tumoral avec formation de métastases, acquisition d'une androgéno-indépendance et une mortalité accrue chez la souris (Cai et al., 2012; Mulholland et al., 2012; Pearson et al., 2009). Chez l'Homme, l'activation des MAPK est corrélée à la progression du cancer de la prostate et à l'acquisition de l'indépendance des

cellules tumorales vis-à-vis des androgènes (Gioeli et al., 1999). Conformément à cette observation, les facteurs de croissance tels que IGF-1 ou encore l'EGF sont capables d'activer la signalisation dépendante de AR en absence d'androgènes (Culig et al., 1994b). En effet, il a été montré que l'activation de la voie des MAPK peut conduire à la phosphorylation activatrice de co-activateurs de AR ou de AR lui-même, permettant une activation de AR indépendante de la présence d'androgènes (Feldman and Feldman, 2001; Gregory et al., 2004).

Au delà de ERK1/2, la voie des MAPK permet aussi de répondre à des signaux de stress osmotiques, inflammatoires ou génotoxiques par le biais des kinases JNK1/2/3 et p38α/ß/γ/δ pour entraîner des réponses opposées à celles relayées par ERK1/2, telles que l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, ces observations réalisées en condition physiologiques ne reflètent souvent pas les mécanismes mis en jeu dans un contexte pathologique. On sait par exemple que l'induction de l'apoptose par p38 est dépendante de l'intégrité du gène PTEN dans des lignées cellulaires de cancers prostatiques humaines (Skjøth and Issinger, 2006). De plus, une autre étude montre que dans un contexte néoplasique, l'activation de p38 stimule la migration et l'invasion des cellules cancéreuses en permettant l'activation de la métalloprotéinase 2 (MMP2). Cette enzyme est essentielle pour dégrader la matrice extracellulaire et pour permettre la migration des cellules malignes vers des sites distants afin de former des métastases. Ces données permettent en partie d'expliquer que l'activation de la voie des MAPK doit être associée à d'autres altérations génétiques pour accélérer la croissance tumorale et le développement de métastases.

### b) La perte des protéines de la famille Sprouty coopère avec la perte de PTEN dans l'oncogenèse prostatique

Les protéines de la famille Sprouty (Sprouty 1 à 4) s'opposent à la signalisation dépendante des MAPK notamment en inhibant Raf (Hanafusa et al., 2002; Yusoff et al., 2002). L'expression de Sprouty 1 et de Sprouty 2 est diminuée dans 40% et 70% des cancers prostatiques, respectivement. Leur diminution concomitante est corrélée à la récidive après prostatectomie radicale, ce qui suggère un rôle protecteur des protéines Sprouty vis à vis de la dissémination métastatique (Fritzsche et al., 2006). Les expériences réalisées *in vivo* ont

confirmé le rôle suppresseur de tumeur des protéines Sprouty dans la prostate puisque l'invalidation de Sprouty 1 et 2 conduit à l'apparition de HGPIN alors que la surexpression de Sprouty 2 en l'absence de PTEN ralentit fortement le développement tumoral (Schutzman and Martin, 2012). Enfin, l'invalidation de Sprouty 2 et de PTEN accélère le développement tumoral et favorise la dissémination métastatique (Patel et al., 2013). Ces données sont cohérentes avec les observations cliniques, où la perte de Sprouty 2 et de PTEN diminue le temps de survie des patients.

#### c) La mise en place d'une boucle d'autorégulation autocrine affranchit les cellules malignes de leur dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance

Une des caractéristiques des cellules malignes est l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance (Hanahan and Weinberg, 2011a). Les cellules tumorales prostatiques s'affranchissent de l'apport stromal de l'EGF en mettant en place une boucle de régulation autocrine. Dans une prostate saine, l'EGF est sécrété à la fois par les cellules stromales, en réponse aux androgènes, et par les cellules épithéliales. Le récepteur EGFR possède toutefois une localisation restreinte dans la glande. Il est situé dans le compartiment épithélial au niveau de la membrane baso-latérale, sous les jonctions serrées. Cette disposition empêche le récepteur d'être activé par l'EGF sécrété par les cellules luminales (Montano and Djamgoz, 2004a). Lors de la tumorigenèse, la désorganisation du compartiment épithélial s'accompagne d'une perte de ces jonctions, permettant ainsi aux cellules malignes de s'autoalimenter en facteurs de croissance, dont l'EGF. Cette boucle de régulation autocrine affranchit les cellules malignes des régulations paracrines venant du stroma, et participerait également à l'acquisition de l'androgéno-indépendance.

## 2.3. Altération du cycle cellulaire

### *2.3.1. Le cycle cellulaire se divise en quatre phase fonctionelles*

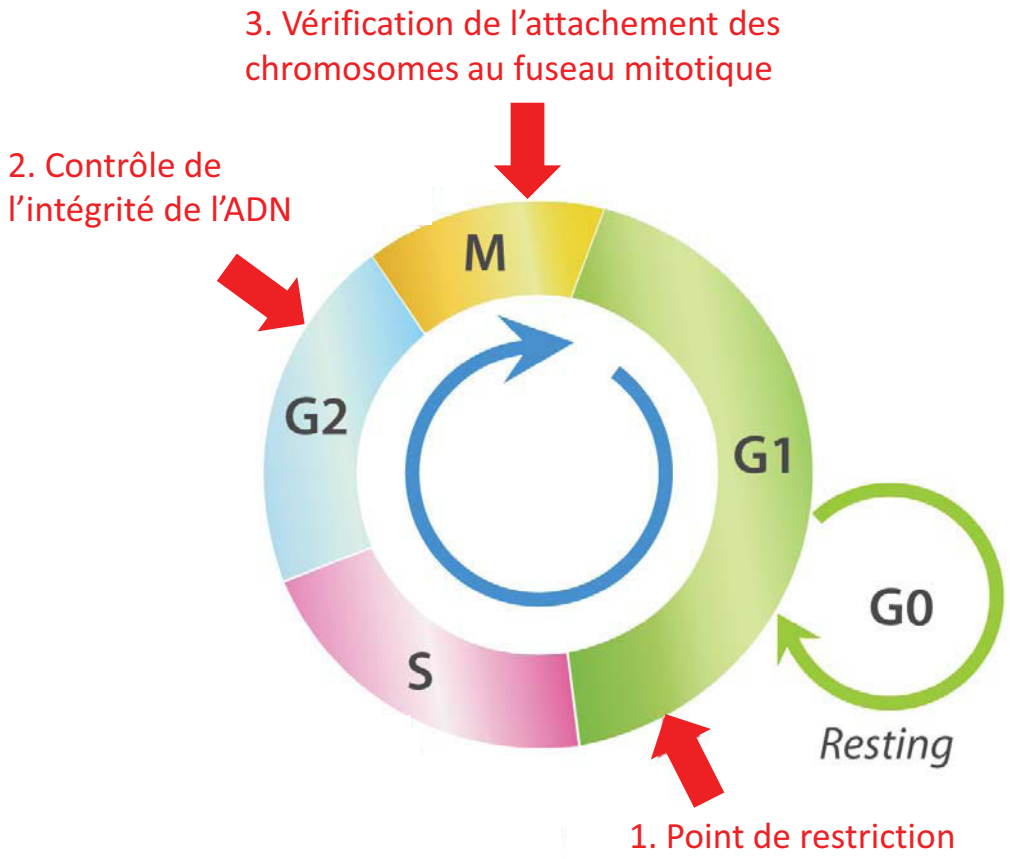



**Figure 23. Différentes phases et points de contrôle du cycle cellulaire.**
Le cycle cellulaire se divise en 4 phases fonctionnelles distinctes: G1, pendant laquelle la cellule se prépare à la division cellulaire après réception d'un signal mitogénique; S, qui correspond à la phase de réplication de l'ADN nucléaire; G2, au cours de laquelle la cellule se prépare à la division; et enfin M qui correspond à la phase de mitose. Plusieurs points de contrôle au cours de ce cycle permettent de s'assurer du bon déroulement du processus. En fin de phase G1, la cellule vérifie que sa taille et l'intégrité de son ADN sont propices à la division cellulaire. Après cette vérification, elle franchit le point de restriction qui est un point de non-retour après lequel elle s'engage à compléter le cycle. En fin de phase G2, un autre point de contrôle est crucial pour s'assurer que la réplication est bien achevée et qu'aucun dommage n'a été fait à l'ADN durant ce processus. Un 3ème point de contrôle permet de tester l'appariement et l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique pendant la métaphase, afin d' assurer une ségrégation correcte. Source : http://www.ck12.org/user:amFtamFtMTcxM0B5YWhvby5jb20./section/Cell-Division-and-the-Cell-Cycle-%253A%253Aof%253A%253A-The-Cell-Cycle-and-Mitosis/

L'intégration des signaux relayés par les facteurs de croissance et les hormones sexuelles modulent les capacités prolifératives des cellules prostatiques en modifiant le cycle cellulaire. Celui-ci fonctionne comme une horloge biochimique finement régulée qui, *in fine,* permet la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Chez les mammifères, le cycle cellulaire est classiquement divisé en quatre phases fonctionnelles distinctes (G1, S, G2, M) (**figure 23**). Plusieurs points de contrôles, ou « checkpoints », sont d'une importance particulière pour l'arrêt ou la mise en route de la division cellulaire. Ils mettent en jeu un ensemble de protéines de surveillance de l'intégrité génomique qui peuvent stopper le cycle cellulaire *via* l'activation des protéines de la famille p53. Ces dernières sont des facteurs de transcription et ils contrôlent l'expression de protéines inhibant la progression du cycle, favorisant la réparation de l'ADN, ou entrainant la mort cellulaire par apoptose lorsque les dommages de l'ADN sont trop importants (Abraham, 2001).

Une des étapes majeures du cycle cellulaire a lieu lors de la première étape de l'interphase (la phase de croissance cellulaire, ou phase G1). Ce point de « non-retour », le point de restriction, divise la phase G1 en deux parties inégales, nommées phase G1 précoce et tardive. La première, plus longue, dépend de *stimuli* mitogéniques comme une exposition aux facteurs de croissance qui activent les voies de signalisations sous-jacentes pour induire l'expression de la cycline D1. Celle-ci en s'associant avec les kinases CDK6/4 favorise leur activité, ce qui permet l'entrée en phase G1 tardive dont la progression est indépendante de la présence de facteurs mitogènes. La cellule est alors irréversiblement engagée dans le cycle cellulaire, les seules alternatives restantes étant la division ou la mort par apoptose si des anomalies sont détectées par la suite (Zetterberg et al., 1995). Il n'est donc pas étonnant que cette étape soit particulièrement touchée dans les cellules cancéreuses.

### *2.3.2. Le passage entre les différentes phases du cycle est régulé par les complexes Cyclines-CDK*

Le passage entre les différents évènements qui ont lieu durant l'interphase et la mitose sont régulés principalement par des complexes de protéines, les cyclines/CDK (*Cyclin-Dependant Kinases*). Les CDK sont des kinases dont l'activité est dépendante de l'association avec une

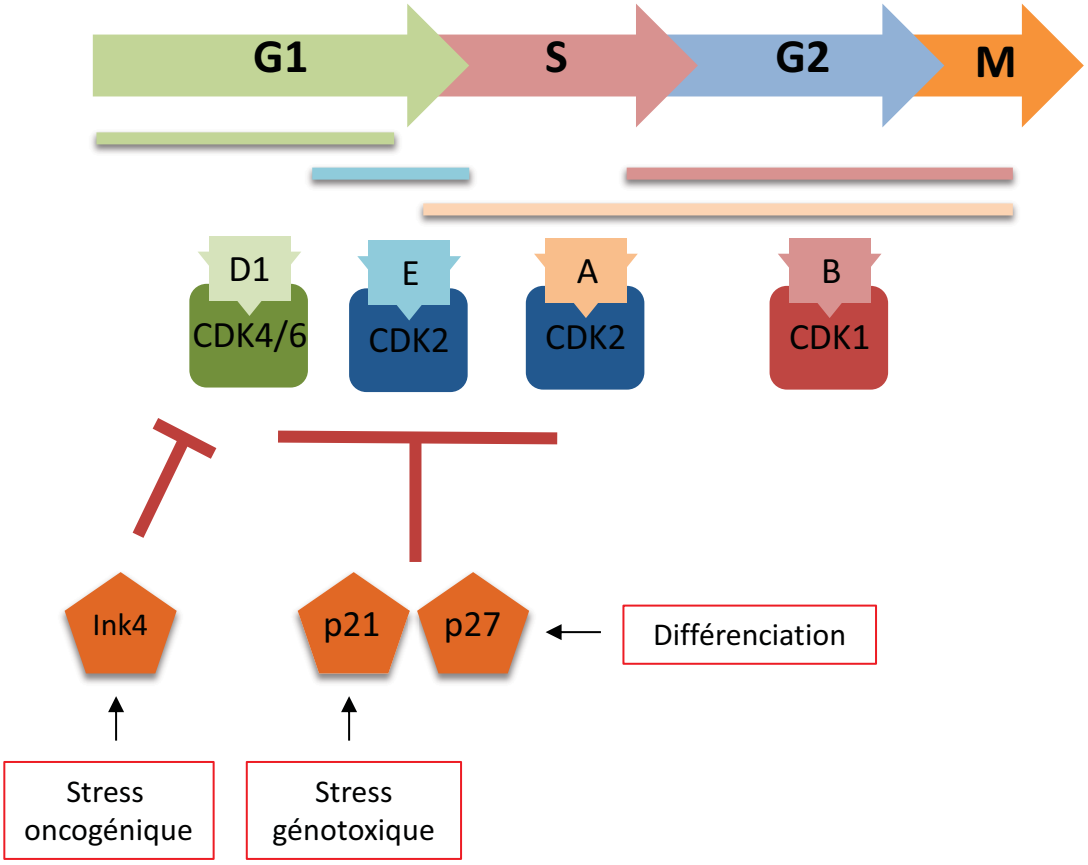



**Figure 24. Fenêtre d'activité des complexes Cyclines/CDK durant le cycle cellulaire.**
La séquence d'évènements ayant lieu durant le cycle cellulaire est régulée principalement par l'activation cyclique des différents complexes cycline/CDK. L'activité de ces derniers est elle-même contrôlée par l'expression, la dégradation et la localisation des cyclines. Un dernier niveau de régulation est régi par les inhibiteurs de CDK (CKI), dont p21, p27 et les CKI de la famille Ink4. Ces différentes protéines répondent à des stimuli différents: l'expression de p21 est stimulée suite à un stress génotoxique par l'intermédiaire de p53; p27 voit sa traduction augmentée lors de la différenciation pour maintenir les cellules dans un état quiescent; enfin l'expression du locus codant pour la famille de protéine Ink4 augmente suite à un stress oncogénique, comme une activation de c-myc ou de la voie des MAPK.

cycline et qui, par phosphorylation, contribuent à activer ou à inactiver différentes cibles cellulaires permettant de progresser d'une étape à l'autre du cycle (Morgan, 1995). L'activation séquentielle des complexes cyclines/CDK, dans des fenêtres temporelles précises, résulte principalement des modifications de l'état de phosphorylation de ces CDK et de la dégradation protéolytique des cyclines dépendante de l'ubiquitine (DeSalle and Pagano, 2001). La possibilité pour une CDK donnée de s'associer à plusieurs cyclines permet d'obtenir un répertoire sophistiqué de combinaisons qui participent également à la régulation du cycle cellulaire**.** Ainsi, pour chacune des transitions du cycle cellulaire, l'activité des complexes CDK-cycline est contrôlée non seulement au niveau de leur cinétique d'assemblage mais aussi au niveau de l'expression de leurs constituants et par les modifications qu'ils subissent. Brièvement, les complexes Cycline D/CDK4 et Cycline E/CDK2 contrôlent le passage du point de restriction ; la complexe Cycline A/CDK2 permet le bon déroulement de la réplication de l'ADN durant la phase S ainsi que le passage du point de contrôle G2/M ; et les complexes Cycline A/CDK2 et Cycline B/CDK1 interviennent durant la mitose (phase M) pour assurer la division cellulaire et garantir la bonne ségrégation des chromosomes (**figure 24**).

Au-delà de l'assemblage séquentiel des complexes CDK-cycline, la régulation du cycle cellulaire met en jeu des mécanismes additionnels faisant intervenir une famille de protéines inhibitrices des sous-unités catalytiques appelées CKI (*Cyclin dependant-kinase inhibitors*). Ces dernières ont pour fonction de bloquer le cycle en phase $G_1$ et leur classification repose à la fois sur leur structure et leur affinité pour les différentes CDK (Hunter et Pines, 1994). A ce jour, deux grandes familles de CKI ont pu être identifiées. Le premier de ces deux groupes est composé des protéines de la famille Ink4 ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ et $p19^{INK4d}$). Elles inhibent spécifiquement les CDK4 et CDK6. Le second est formé des protéines Cip/Kip ($p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$). Elles bloquent également l'activité des complexes CDK2-cycline A/cycline E et CDK4/6-cycline D (Roussel, 1999; Sherr et Roberts, 1995).

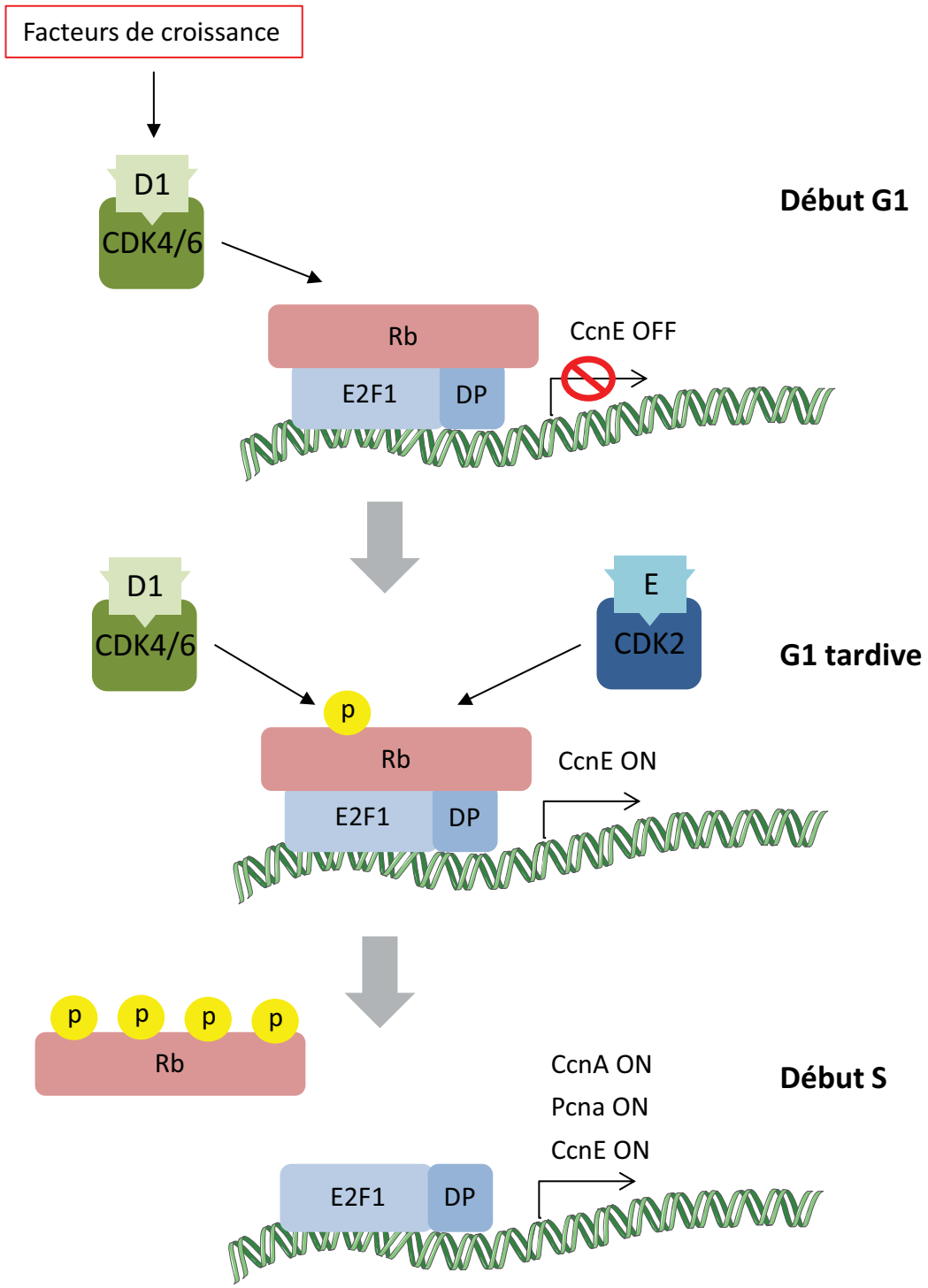



**Figure 25. Le point de restriction et la transition G1/S.**
En début de phase G1, la protéine du rétinoblastome (Rb) interagit avec le complexe E2F1-DP pour inhiber son activité transcriptionnelle. EN réponse à un signal mitogénique, l'expression de la cycline D augmente. Celle-ci s'associe avec les CDK 4 et 6 pour les activer et stimuler la phosphorylation de Rb. Cela permet l'activation de gènes cibles d'E2F1 impliqués dans le passage du point de restriction, dont la cycline E (CCNE). De la même façon que pour le couple Cycline D/CDK4-6, la cycline E s'associe avec la CDK2 qui, à son tour, phosphoryle Rb. Cette forme hyperphosphorylée de Rb se détache du complexe E2F-DP et libère complètement son activité transcriptionnelle. E2F1-DP activent alors l'expression de gènes nécessaires à la réplication de l'ADN, dont ceux codant PCNA et la Cycline A (CCNA).

### a) Les complexes Cycline D-CDK4/6 et Cycline E/CDK2 permettent le passage du point de restriction

L'entrée en phase G1 du cycle cellulaire en réponse à un stimulus mitogénique comme une exposition à des facteurs de croissance, nécessite une augmentation de l'expression des cycline D (D1, D2 et D3). La cycline D1 reste la plus étudiée d'entre elles. Il a été montré que le contrôle de son expression intervient implique 3 niveaux de régulation : transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel (Witzel et al., 2010). Les cyclines D se fixent sur les CDK4 et 6 pour stimuler leur activité catalytique, et permettent ainsi la phosphorylation inactivatrice de la protéine du rétinoblastome Rb. Celle-ci, ainsi que ses analogues p107 et p130, sont des inhibiteurs du cycle cellulaire qui séquestrent les facteurs de transcription de la famille E2F (E2F1 à 6). Les protéines de la famille E2F et Rb se retrouvent associées à une protéine de la famille DP (DP1-2) pour constituer un complexe multiprotéique répresseur du passage G1-S. En début de phase G1, la protéine Rb est majoritairement retrouvée sous une forme hypophosphorylée qui lui permet d'interagir avec les membres de la famille E2F pour masquer leur domaine transactivateur et recruter des protéines impliquées dans la compaction et donc le verrouillage de la chromatine. La phosphorylation de Rb par les complexes Cycline D-CDK4/6 abolit cette interaction. Le complexe E2F-DP contrôle notamment l'expression de gènes essentiels à la duplication de l'ADN qui aura lieu en phase S, tels que PCNA et la cycline A. D'autres cibles de E2F1 sont également connues pour inhiber et/ou dégrader des protéines inhibitrices du cycle cellulaire. C'est le cas , d'une part, de l'ubiquitine E3-ligase SKP2 qui conduit à la dégradation du CKI $p27^{kip1}$, et d'autre part, de la cycline E, qui, *via* CDK2, conduit à la phosphorylation et donc à l'inhibition de Rb (pour revue voir Massagué, 2004) (**figure 25**).

### b) La dérégulation de Rb est un événement fréquent dans la carcinogenèse prostatique

L'inactivation complète de Rb est suffisante pour passer le point de restriction et permettre à la cellule de répliquer son ADN. Il n'est donc pas étonnant que la signalisation dépendante de Rb soit retrouvée fréquemment dérégulée dans de nombreux cancers, dont la prostate. En effet, 34% des tumeurs primaires et 74% des tumeurs métastatiques présentent un dysfonctionnement dans la régulation de cette voie menant à une activation aberrante de

E2F1 (Tomlins et al., 2007). L'une des altération fréquemment retrouvée est la perte de la région chromosomique 13q qui contient le gène Rb (Cooney et al., 1996; Li et al., 1998; Melamed et al., 1997). Il a été récemment démontré qu'en plus de son rôle sur la régulation du cycle cellulaire, la perte de Rb est importante dans la progression du cancer de la prostate vers des stades résistants à la castration puisqu'elle permet une augmentation de l'expression et de l'activité de AR, celui-ci étant un gène cible de E2F1 (Sharma et al., 2010). Chez la souris, le rôle suppresseur de tumeur de Rb a été démontré par son invalidation spécifique dans l'épithélium prostatique. Cela conduit à la formation de néoplasies intra-épithéliales qui n'évoluent pas en carcinomes (Maddison et al., 2004a) ; par contre, l'invalidation de l'ensemble de la famille de protéines Rb (Rb/p107/p130) induit la formation d'adénocarcinomes avec une pénétrance complète, suggérant une redondance fonctionnelle entre ces différents membres (Hill et al., 2005).

### c) p53 représente une barrière à la progression tumorale dans la prostate

La perte de p53 dans la grande majorité des cancers à un stade avancé souligne l'importance de cette protéine dans le maintien de l'homéostasie de la glande prostatique (Heidenberg et al., 1995). p53 joue un rôle crucial dans la détection et la réparation des dommages causés à l'ADN durant la progression du cycle cellulaire, ainsi que dans le déclenchement de l'apoptose lorsque les lésions ne peuvent pas être réparées. p53 est également impliqué dans le déclenchement de la sénescence cellulaire en réponse à un stress oncogénique (OIS, *Oncogene Induced Senescence*) qui est un mécanisme intrinsèque servant à freiner la progression néoplasique et mettant en jeu notamment les CKI (Lowe et al., 2004). A titre d'exemple, il est connu que l'invalidation de PTEN chez la souris déclenche une sénescence dans la prostate, ce qui limite la dissémination métastatique. Par contre, l'invalidation de PTEN couplée à celle de p53 abolit le phénomène d'OIS, et résulte en l'apparition de tumeurs très agressives, menant à la formation de métastases et à l'augmentation de la létalité chez la souris (Chen et al., 2005). Enfin, dans le modèle de cancer de la prostate TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*), l'initiation des lésions causées par la surexpression de l'antigène T du virus SV40 dans l'épithélium prostatique est le fruit de la double inactivation de p53 et de Rb (Hurwitz et al., 2001). Les tumeurs observées chez ces souris sont également très agressives et la progression du cancer est complètement insensible à la castration.

**Au vu des informations accumulées jusqu'ici, il apparaît clairement que le cancer de la prostate est la résultante de plusieurs dérèglements d'expression génique, concomitants ou successifs, qui conduisent à l'apparition et à l'évolution de la pathologie. Les altérations décrites jusqu'ici ne constituent pas une liste exhaustive, puisque certaines, bien que non traitées dans ce chapitre, sont retrouvées dans les cancers prostatiques (pour revue, voir (Shen and Abate-Shen, 2010)). Parmi elles, les protéines « chaperonnes » ont été associées à la progression de nombreux cancers et à l'acquisition de la résistance thérapeutique. Cette classe de protéines fera l'objet d'une étude plus approfondie dans le prochain chapitre.**

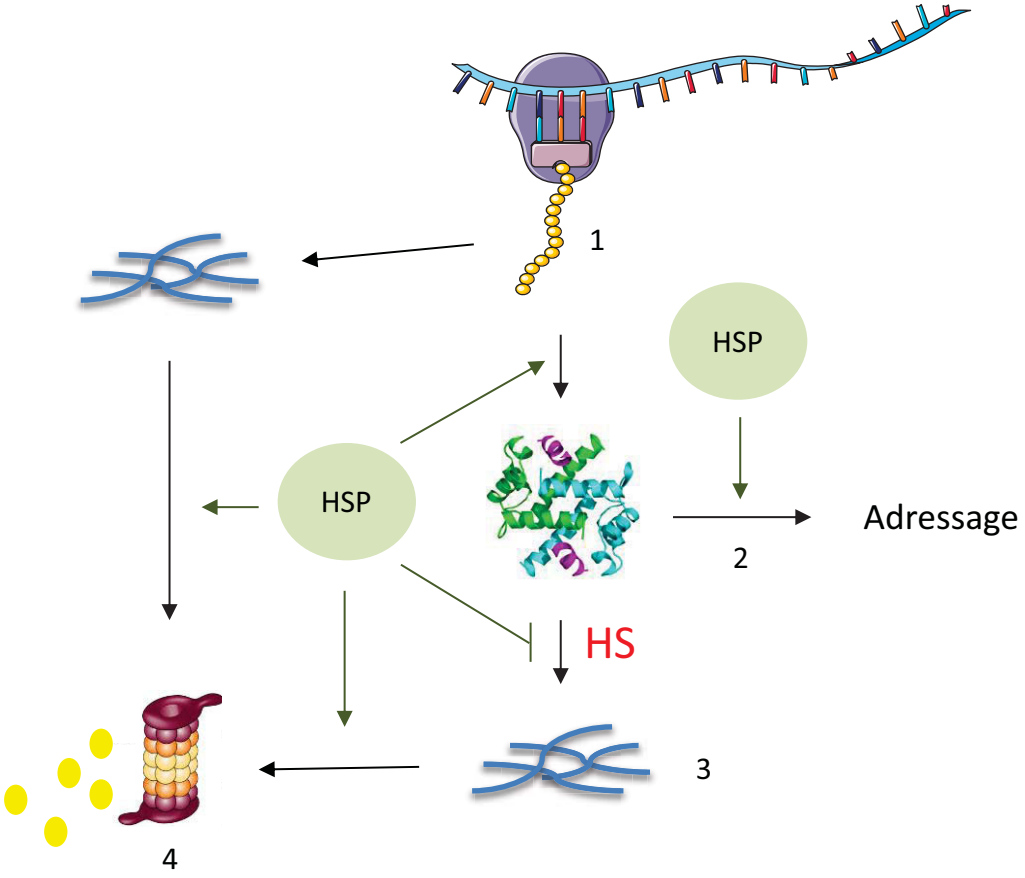



**Figure 26. Rôle des chaperonnes HSP dans l'homéostasie protéique.**
Les HSP interviennent lors de différentes étapes de la maturation et de la dégradation des protéines. Elles prennent en charge la protéine naissante (1) pour favoriser son bon repliement et l'adoption de sa structure tridimensionnelle. Elles sont aussi impliquées dans l'adressage des protéines dans les différents compartiments cellulaires (2). Lors d'un stress thermique (HS, *Heat Shock*), les protéines peuvent être dénaturées et former des agrégats cytotoxiques (3). Les HSP interviennent alors en 1) empêchant la dénaturation des protéines, 2) permettant le repliement des protéines dénaturées, ou 3) favorisant la poly-ubiquitinylation des protéines dénaturées pour permettre leur destruction par le protéasome (4).

# Les proteines chaperonnes et leur rôle dans la tumorigenèse prostatique.

Une cellule humaine contient une quantité phénoménale de protéine, pour une concentration allant de 50 à 300 mg/mL, proche de la saturation retrouvée dans les cristaux de protéines (Asherie, 2004; Finka and Goloubinoff, 2013). La régulation de ce protéome constitue un défi majeur pour la cellule, et dépend de la balance entre la synthèse, le repliement permettant aux protéines d'adopter une conformation tridimensionnelle propice à leur activité, et la dégradation. Les chaperonnes moléculaires constituent une classe de protéines jouant un rôle important dans le repliement des protéines et leur remodelage, participant ainsi au « contrôle qualité » du protéome, en évitant notamment la formation d'agrégats protéiques cytotoxiques. La plupart des chaperonnes peuvent remodeler les protéines nouvellement synthétisées par des réactions enzymatiques dépendantes de l'ATP, comme c'est le cas pour les HSP90, HSP70 et HSP60 (*Heat Shock Protein*) (**figure 26**). D'autres, comme les petites HSP, se fixent sur les protéines, permettant de protéger certaines sous-unités pendant le processus de remodelage (Hartl et al., 2011). En dehors de ce rôle essentiel au maintien de l'intégrité du protéome, d'autres fonctions des chaperonnes ont été identifiées, telles que la régulation de l'activité des récepteurs aux hormones stéroïdes ou encore de l'assemblage et de la dynamique chromatinienne. Deux types de chaperonnes seront étudiées dans ce chapitre : la famille des HSP ainsi que les protéines chaperonnes d'histones.

## 1. Les protéines HSP

La superfamille des HSP a d'abord été identifiée comme des protéines dont l'expression est fortement augmentée suite à stress cellulaire, comme les chocs thermiques, d'où elles tirent leur nom (Kampinga et al., 2009). Suivant leur taille, les HSP chez les mammifères ont été

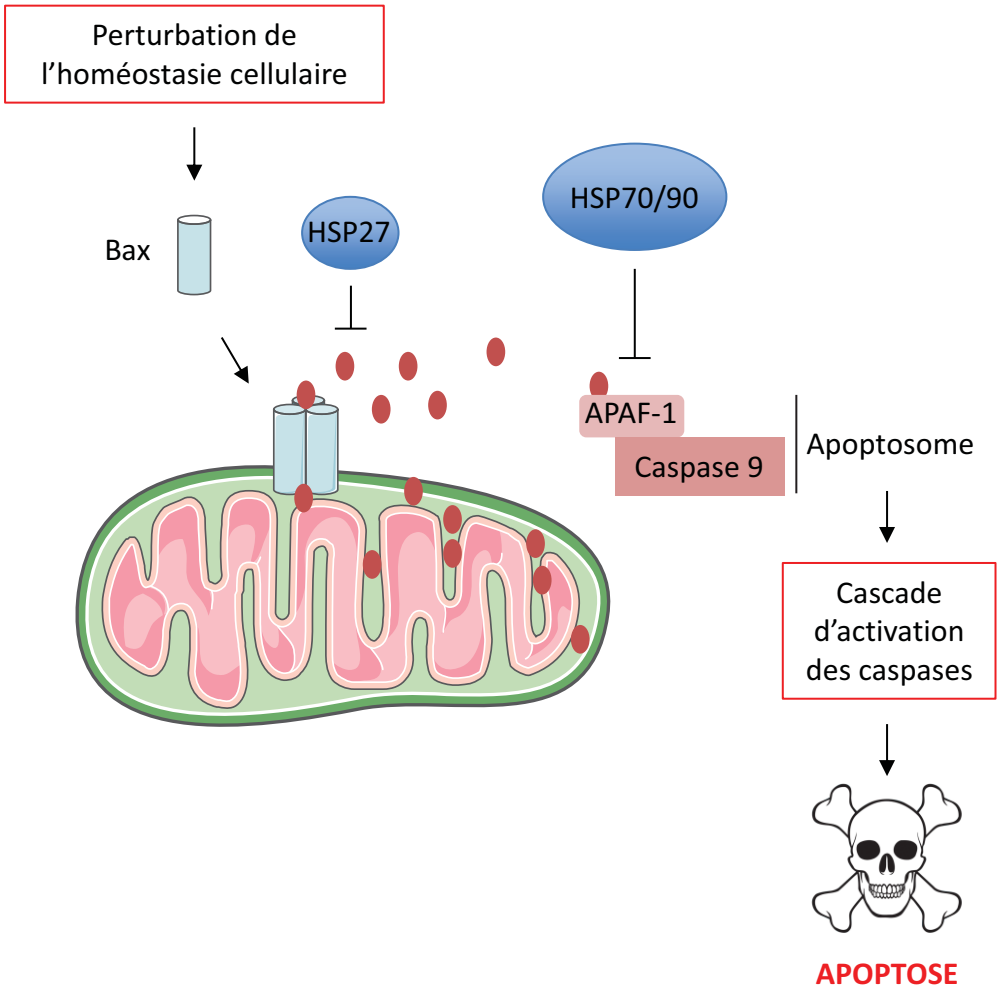



**Figure 27. Inhibition de l'apoptose par les HSP 27, 70 et 90.**
Des perturbations de l'homéostasie cellulaire, telles que les cassures double brin de l'ADN, induisent l'expression de la protéine proapoptotique BAX. Sous forme oligomérique au niveau de la membrane mitochondriale externe, BAX favorise la libération du cytochrome c qui se complexe ensuite avec les protéines Apaf1 et caspase 9 pour former l'apoptosome. L'apoptosome induit la cascade d'activation des caspases, ce qui mène à la mort cellulaire par apoptose. Les chaperonnes HSP27 et HSP70/90 inhibent ce processus en titrant le cytochrome c ou en inhibant la protéine Apaf1, respectivement.

classées dans quatre familles, selon leur taille : HSP90, HSP70, HSP60, et les petites HSP (de 15 à 30 kDa, parmi lesquelles on retrouve la HSP27). D'une manière générale, les HSP de haut poids moléculaires ont une activité ATP-dépendante, contrairement aux petites HSP.

Il est connu que les HSP régulent la stabilité ou la dégradation de protéines à activité oncosuppressive ou de protéines à activité oncogénique comme le récepteur des androgènes et les récepteurs de l'EGF (Lanneau et al., 2007; Parcellier et al., 2006). De plus, les HSP ont un puissant rôle cytoprotecteur et c'est pourquoi il existe une bonne corrélation entre l'expression de ces protéines et la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies (Garrido et al., 2006). Ce potentiel cytoprotecteur fait intervenir plusieurs mécanismes moléculaires. Tout d'abord, leur rôle dans le repliement et l'intégrité des protéines est particulièrement important dans les cellules cancéreuses. En effet, l'activité métabolique des cellules cancéreuses est généralement très augmentée par rapport à celle de cellules saines, ce qui conduit à une synthèse protéique largement accélérée, notamment via l'activation du complexe mTORC1. Ce phénomène génère un besoin plus important en ce qui concerne le maintien du protéome afin d'éviter la formation d'agrégats protéiques conduisant à la mort de la cellule. De plus, les HSP sont connues pour inhiber de façon directe les processus apoptotiques. Il a été montré que HSP27 est capable de se fixer et d'inhiber l'activité du cytochrome c, et les HSP70 et HSP90 inhibent quant à elles APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*), ce qui empêche l'activation des caspases en aval et stoppe donc le processus de mort cellulaire (Bruey et al., 2000) (**figure 27**). Dans le cas du cancer de la prostate, les HSP90, -70 et -27 sont surexprimées dans les tissus néoplasiques par rapport aux tissus sains adjacents (Cardillo and Ippoliti, 2006; Foster et al., 2009; Kurahashi et al., 2007). De plus l'expression de HSP27 est corrélée au grade de Gleason et à la progression du cancer vers des stades résistants à la castration. Une des raisons à cela est que HSP27 est impliquée dans l'apparition d'une androgéno-indépendance en favorisant la survie cellulaire par l'intermédiaire de l'expression et de l'activation de Stat-3 (Rocchi et al., 2005). La combinaison de traitements utilisés en chimiothérapies avec des inhibiteurs de HSP réduit la prolifération de lignées cellulaires prostatiques cancéreuses humaines, soulignant ainsi le potentiel intérêt de ces molécules comme cible thérapeutiques (Ku et al., 2014; Zaarur et al., 2006). Enfin, une étude a mis en évidence la présence de HSP70 dans le plasma de patients atteints de cancers de la prostate dès les stades précoces de la maladie, alors même que le

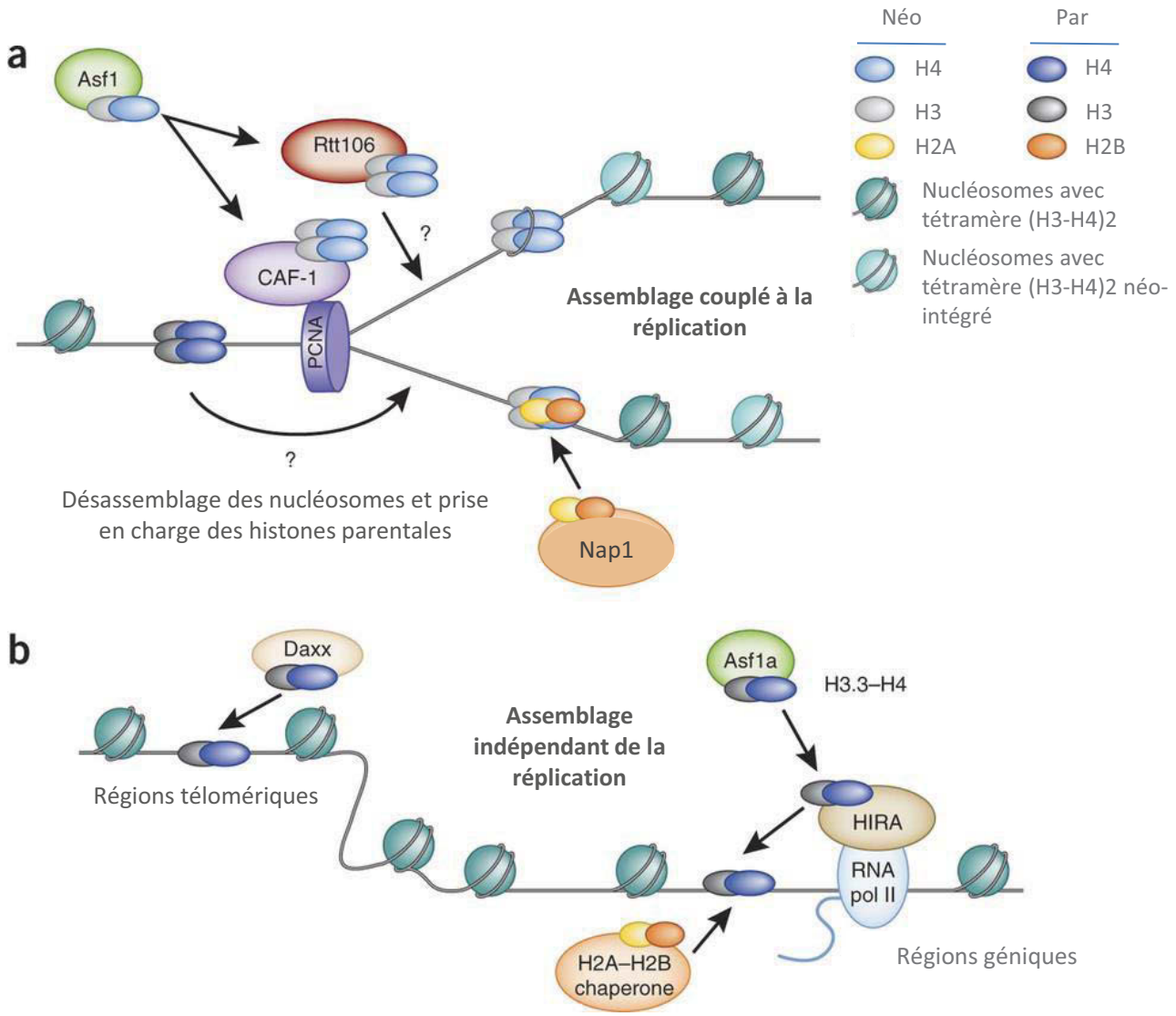



**Figure 28. Rôle des chaperonnes d'histone dans l'assemblage des nucléosomes.**
**A**. Au cours de la réplication de l'ADN, les histones H3-H4 nouvellement synthétisées (néo) sont importées dans le noyau principalement par Asf1. Celle-ci les transfère ensuite à Rtt106 ou à CAF-1 qui les intègre à l'ADN sous forme de tétramère $(H3\text{-}H4)^2$ après le passage de la fourche réplicative. La chaperonne NAP1 permet l'intégration des dimères H2A-H2B. Les acteurs participant à la prise en charge des nucléosomes parentaux (par) restent inconnus à ce jour. **B.** En dehors des phases de réplication de l'ADN, différentes chaperonnes participent à la dynamique d'assemblage des nucléosomes en fonction de la zone chromatinienne. Au niveau des régions géniques, l'intégration des histones H3-H4 après le passage de l'ARNpol II se fait grâce au couple Asf1a et HIRA. En revanche, elle sera réalisée par Daxx dans les régions télomériques. Les facteurs participant à l'intégration des dimères H2A-H2B hors réplication de l'ADN n'ont pour l'heure toujours pas été identifiés.
D'après Burgess *et al*., 2013.

taux sérique de PSA était normal (Abe et al., 2004). Ces données placent les HSP comme des acteurs à part entière dans la carcinogenèse prostatique et comme des potentiels outils diagnostics et pronostics de l'évolution de la pathologie.

## 2. Les chaperonnes d'histone

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN est lié à des protéines structurales appelées histones. L'ensemble constitue la chromatine, qui peut être divisée en de multiples unités structurales, les nucléosomes. Le « cœur » du nucléosome est constitué de 2 exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, sur lequel s'enroulent 146 paires de bases d'ADN. La présence de l'histone H1 à l'entrée et à la sortie du nucléosome permet de sceller l'ensemble. La présence et la position des nucléosomes sont dynamiques afin de permettre la compaction ou la relaxation de la chromatine. Ce processus permet de réguler l'accès des facteurs de transcription et de la machinerie transcriptionelle à l'ADN, et ainsi contrôler l'expression génique. Ces mécanismes de régulations, dits « épigénétiques », dépendent de plusieurs classes de protéines. Les protéines de modification des histones déposent des groupements chimiques (e.g. méthyls ou acétyls) sur les queues amino-terminales des histones. Ces modifications altèrent la structure chromatinienne, soit par répulsion électrostatique du groupement vis-à-vis de l'ADN comme c'est le cas de l'acétylation, soit en permettant le recrutement d'autres complexes de modifications des histones ou de remodelage chromatinien. Elles constituent ainsi un code complexe, le code des histones, régissant l'état de la chromatine. Les complexes de remodelage chromatinien peuvent dérouler ou enrouler l'ADN autour des histones de façon ATP-dépendante. Enfin, les chaperonnes d'histones régulent l'intégration ou le retrait des histones sur l'ADN. Les chaperonnes d'histones interviennent à plusieurs niveaux. D'abord elles régissent le dépôt des histones sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé lors de la phase S du cycle cellulaire (**figure 28A**). La stabilité, la disponibilité et l'import nucléaire des dimères d'histones H3-H4 nouvellement synthétisés dépendent des chaperonnes NASP et ASF1 (Campos et al., 2010). Le mécanisme gouvernant la formation des tétramères d'histones H3-H4 n'est toujours pas bien compris à l'heure actuelle, mais il est connu que leur intégration à l'ADN nouvellement

formé est tributaire de la chaperonne CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) qui interagit de façon directe avec la protéine PCNA (*Proliferative Cell Nuclear Antigen*), un des constituant de la machinerie réplicative (Shibahara and Stillman, 1999). Les histones parentales retirées au fur et à mesure de l'avancée de la fourche de réplication servent également de source à la fois pour le brin parental et néosynthétisé, mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore identifiés. La présence d'histones parentales et nouvellement synthétisées contribuerait au maintien d'une mémoire épigénétique au fil des divisions cellulaires (Margueron and Reinberg, 2010). Les dimères d'histones H2A-H2B sont pris en charge principalement par la chaperonne Nap1 (*Nucleosome Assembly Protein* 1). Elle contrôle leur import nucléaire ainsi que leur intégration à la chromatine de façon directe, conjointement avec le complexe de remodelage chromatinien ACF (*ATP-dependant Chromatin and remodeling Factor*), ou de façon indirecte en éliminant les interactions aspécifiques entre les histones et l'ADN pour faciliter la formation des nucléosomes (Andrews et al., 2010; Ito et al., 1997; Mosammaparast et al., 2002). D'autres chaperonnes sont impliquées dans la dynamique d'assemblage des nucléosomes indépendamment de la réplication de l'ADN, comme lors de la transcription (**figure 28B**). La chaperonne HIRA interagit avec l'ARN polymérase II (RNApol II) et permet la réintégration des tétramères H3-H4 après le passage de la machinerie transcriptionnelle (Goldberg et al., 2010). D'autres chaperonnes comme Daxx interviennent plutôt dans les régions intergéniques en réintégrant les tétramères H3-H4 dans les régions régulatrices et les régions télomériques (Drané et al., 2010; Goldberg et al., 2010). DEK, quant à elle, est impliquée dans l'intégration de l'histone H3 au niveau des régions hétérochromatiques *via* son interaction avec la protéine HP1α (Kappes et al., 2011). En ce qui concerne les dimères H2A-H2B, peu d'informations sont disponibles quant aux chaperonnes impliquées dans leur dépôt et leur retrait, bien qu'il semble que ce soit les mêmes que celles impliquées lors de la réplication de l'ADN. Par leur rôle dans l'assemblage de la chromatine et le maintien de l'intégrité du génome, la régulation de l'expression des chaperonnes d'histones et la régulation de leur activité sont primordiales au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. En effet, de nombreuses altérations touchant ces protéines ont été identifiées comme étant associées à l'apparition de pathologies chez l'homme, dont le cancer. Dans le cancer de la prostate, la surexpression de CAF-1 est retrouvée dans les tumeurs de mauvais pronostic et de haut grade (Staibano et al., 2009). De plus, la diminution de tNASP, une des isoformes de la chaperonne NASP, par interférence

ARN dans des cellules cancéreuses de prostates humaines androgéno-indépendantes induit un arrêt de prolifération ainsi que l'induction de l'apoptose (Alekseev et al., 2011). L'isoforme tNASP est exprimée préférentiellement dans les cellules malignes, et constitue donc une cible de choix dans le traitement du cancer puisque les cellules saines sont insensibles à son inhibition. Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe d'accueil avait montré que la chaperonne d'histones NPM1 (*NucleoPhosMine 1*) est surexprimée dans le cancer de la prostate indépendamment du grade des tumeurs (Léotoing et al., 2008a). Cette chaperonne, qui a fait l'objet de ce travail de thèse, sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant.

# La Nucleophosmine

La nucleophosmine (NPM1), également appelée B23, NO23 ou Numatrin, a d'abord été identifiée comme une petite phosphoprotéine nucléolaire exprimée préférentiellement dans les cellules en prolifération (Chang et al., 1988). Elle fait partie de la famille des nucléophosmines/nucleoplasmines, parmi lesquelles on retrouve NPM1, NPM2, NPM3. Ces protéines multifonctionelles sont impliquées dans divers processus clés de l'homéostasie cellulaire et leur dérégulation est impliquée dans de nombreux types de cancers.

## 1. La famille Nucléophosmine/Nucléoplasmine

La famille Nucléophosmine/Nucléoplasmine constitue un groupe de petites protéines dont la fonction initialement identifiée est celle de chaperonne d'histones. En effet, la nucléoplasmine (NPM2), purifiée à partir d'œufs de *Xenopus laevis*, a été la première chaperonne d'histone identifiée grâce à sa capacité à lier les histones et à les assembler *in vitro* sur une molécule d'ADN nue (Laskey et al., 1978). Il a par la suite été montré un rôle de NPM2 dans la décondensation de la chromatine spermatique après fécondation. Pour cela, NPM2 retire les protamines, qui remplacent les histones dans les gamètes mâles au cours de la spermiogenèse et qui induisent une forte condensation de la chromatine, pour permettre l'assemblage des histones H2A-H2B (Philpott and Leno, 1992). NPM1 a été identifiée en premier lieu comme une abondante protéine nucléolaire nécessaire à la biogenèse des ribosomes. Enfin, NPM3 n'a été identifiée que beaucoup plus tard, et peu d'études relatives aux fonctions de cette protéine sont disponibles (MacArthur and Shackleford, 1997). On sait néanmoins qu'elle participe à la régulation de la biogenèse des ribosomes en interagissant avec NPM1 et qu'elle est capable de lier les histones pour participer à la régulation de l'expression génique (Gadad et al., 2010; Huang et al., 2005b; Motoi et al., 2008).

Les protéines NPM1, NPM2 et NPM3 sont codées par des gènes différents localisés chez l'homme sur les régions chromosomiques 5q35, 8p21.3 et 10q24.31, respectivement. Leur

**Figure 29. Principaux domaines structuraux des protéines NPM1, NPM2 et NPM3.**
Ces 3 protéines possèdent une région amino-terminale très conservée. Elle permet l'oligomérisation de la protéine et son interaction avec les histones *via* les domaines acides A1, A2 et A3. La région carboxy-terminale est beaucoup plus variable. Elle est impliquée dans l'interaction avec d'autres protéines *via* le domaine HD, *HeteroDimerisation domain*) et avec les acides nucléiques *via* le domaine DBD (*Dna Binding Domain*). Seul NPM1 possède un signal de localisation nucléolaire (NoLS, *Nucleolus Localisation Signal*).
D'après Lindström, 2010.

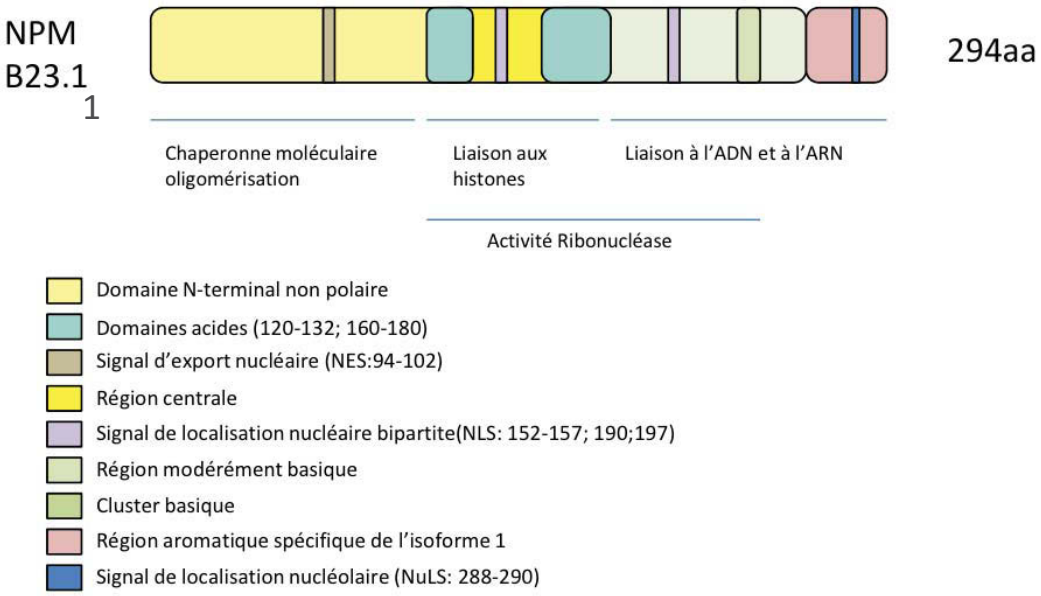



**Figure 30. Motifs et domaines fonctionnels de NPM1.**
La partie N-terminale est caractérisée par un domaine non polaire responsable de l'oligomérisation et l'hétérodimérisation. Un signal d'export nucléaire (NES) fonctionnel est présent dans cette région . La portion centrale de la protéine contient 2 domaines acides (Ac) importants pour la liaison aux histones, et un signal de localisation nucléaire bipartite (NLS); cette région est impliquée dans l'activité ribonuclease de la protéine. Le C-terminus de la protéine possède également une activité ribonucléase et contient des régions basiques impliquées dans la liaison aux acides nucléiques. Enfin, il est suivi par un domaine aromatique spécifique de l'isoforme 1 qui contient 2 résidus tryptophane (288 et 290) nécessaires à la localisation nucléolaire de la protéine (NoLS).
D'après Grisendi *et al*, 2006.

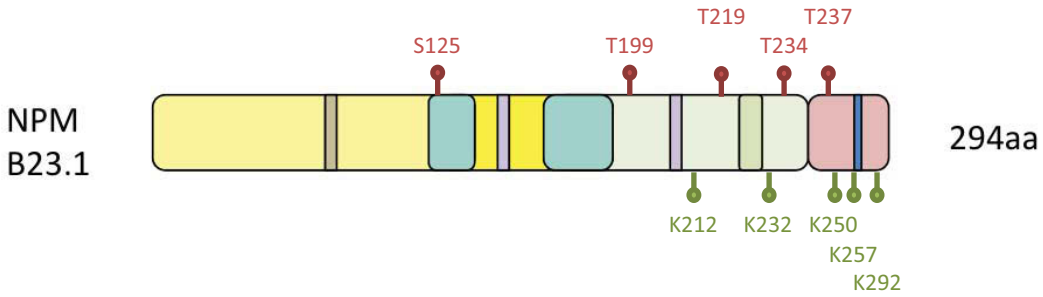
domaine cœur amino-terminal servant à l'oligomérisation et à l'activité chaperonne d'histone est le plus conservé (Frehlick et al., 2007). Au contraire, la partie C-terminale, servant notamment à l'interaction avec d'autres protéines, ou à la liaison aux acides nucléiques dans le cas de NPM1, est la plus variable. Les 3 membres de la famille possèdent un signal de localisation nucléaire bipartite, mais seule NPM1 possède un domaine de localisation nucléolaire et un signal d'export nucléaire (**figure 29**).

NPM1 reste le membre de la famille le plus étudié du fait de son expression ubiquitaire et de son implication de nombreuses pathologies cancéreuses.

## 2. Organisation structurelle et fonctionnelle de NPM1

La gène NPM1 comporte 12 exons chez l'homme et code pour 3 isoformes : NPM1.1, NPM1.2 et NPM1.3. La protéine NPM1.1 est obtenue après transcription des 12 exons, alors que NPM1.2 est obtenue grâce à un épissage alternatif dans la partie 3' de l'ARNm, résultant en une protéine plus courte (Umekawa et al., 1993). Peu d'études portent sur l'isoforme NPM1.3. On sait toutefois qu'il lui manque une partie interne du domaine carboxy-terminal (C-ter), sans pour autant en connaître les conséquences fonctionnelles. Comme toutes les protéines de la famille nucléoplasmine/nucléophosmine, NPM1 possède un domaine cœur amino-terminal (N-ter) très conservé. Ce domaine contient une séquence d'acides aminés acides, appelée A1, et qui permet notamment sa liaison avec les histones H3 et H4. La présence des séquences d'acides aminés acides A2 et A3 situées en aval du domaine cœur est indispensable à la fixation des histones H2A et H2B (Okuwaki et al., 2001). La partie C-terminale de la protéine, retrouvée uniquement dans NPM1, est constituée d'acides aminés basiques suivis d'acides aminés aromatiques, et est impliquée notamment dans la fixation aux acides nucléiques ainsi que dans la fonction ribonucléasique (Hingorani et al., 2000; Wang et al., 1994). C'est également dans cette partie qu'est situé le signal de localisation nucléolaire (**figure 30**).

NPM1 est présente essentiellement sous forme d'hexamères, bien qu'elle puisse exister sous forme monomérique (Umekawa et al., 1993). Le passage de NPM1 des formes




| Résidu ciblé | Protéine effectrice | Effet sur l'activité de NPM1 |
|---|---|---|
| K125 | Casein Kinase II | Localisation nucléolaire; Activité chaperonne |
| T199 | CDK1 et CDK2 | Dissociation des centrioles; perte d'affinité pour les ARN |
| T219 ➔ T237 | CDK1 | Perte d'affinité pour les centrioles |
| K212 ➔ K292 | p300 | Transcription génique |

**Figure 31. Principaux sites de phosphorylation et d'acétylation de NPM1.**
Les sites de phosphorylation sont écrits en rouge. Les sites d'acétylation sont écrits en vert. K: Lysine; S: Sérine; T: Thréonine.
Modifié d'après Grisendi *et al*. 2006

monomériques aux formes hexamériques joue un rôle important sur la fonction de la protéine puisque son degré d'oligomérisation influence sa localisation nucléaire (Jian et al., 2009). En réponse à sa phosphorylation par la CDK cdc-2 durant la mitose, NPM1 forme également un hétérodimère avec NPM1.2, ce qui diminue son affinité de liaison avec l'ARN, suggérant un rôle inhibiteur de NPM1.2 sur la biogenèse des ribosomes (Okuwaki et al., 2002a). Il a aussi été mis en évidence des interactions avec d'autres membres de la famille des nucléoplasmines/nucléophosmines, comme NPM2. Enfin, il est à noter que l'association de NPM1 avec d'autres protéines non apparentées a été rapportée, comme c'est le cas pour le récepteur des androgènes (AR). Cette partie sera développée plus en détail à la fin de ce chapitre.

## 3. Modifications post-traductionelles de NPM1

NPM1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles (**figure 31**). La phosphorylation joue un rôle crucial pendant le cycle cellulaire. Le complexe cycline E/CDK2 induit la phosphorylation de NPM1 sur la thréonine 199 pendant la phase G1, ce qui permet sa dissociation des centrioles et l'initiation de la duplication du centrosome (Tokuyama et al., 2001). De plus, NPM1 inhibe l'épissage des pré-ARNm lorsqu'elle est phosphorylée sur la thréonine 199 (Tarapore et al., 2006). La phosphorylation des thréonines 199, 219, 234 et 237 durant la mitose par CDK1, un autre membre de la famille des CDK, abolit l'affinité de NPM1 pour les ARN (Okuwaki et al., 2002b). La localisation nucléolaire de NPM1 étant due en partie par sa forte affinité pour les ARN, il est possible que ce mécanisme participe à la sortie de NPM1 des nucléoles et permette ainsi leur désassemblage. On peut également citer la phosphorylation sur la sérine 125 par la caséine kinase II (CKII) qui régule la localisation nucléolaire ainsi que l'activité chaperonne de NPM1 (Negi and Olson, 2006; Szebeni et al., 2003). D'autres modifications post-traductionnelles ont été identifiées, comme l'ubiquitinylation, la SUMOylation ou encore l'acétylation. La polyubiquitinylation de NPM1 peut être réalisée par le complexe BRCA1-BARD1 ou par la biais des suppresseurs de tumeurs p14ARF/p19ARF, bien que dans ce dernier cas, l'ubiquitine-ligase impliquée ne soit pas connue (Itahana et al., 2003a; Sato et al., 2004). Dans les deux cas, cela induit une perte

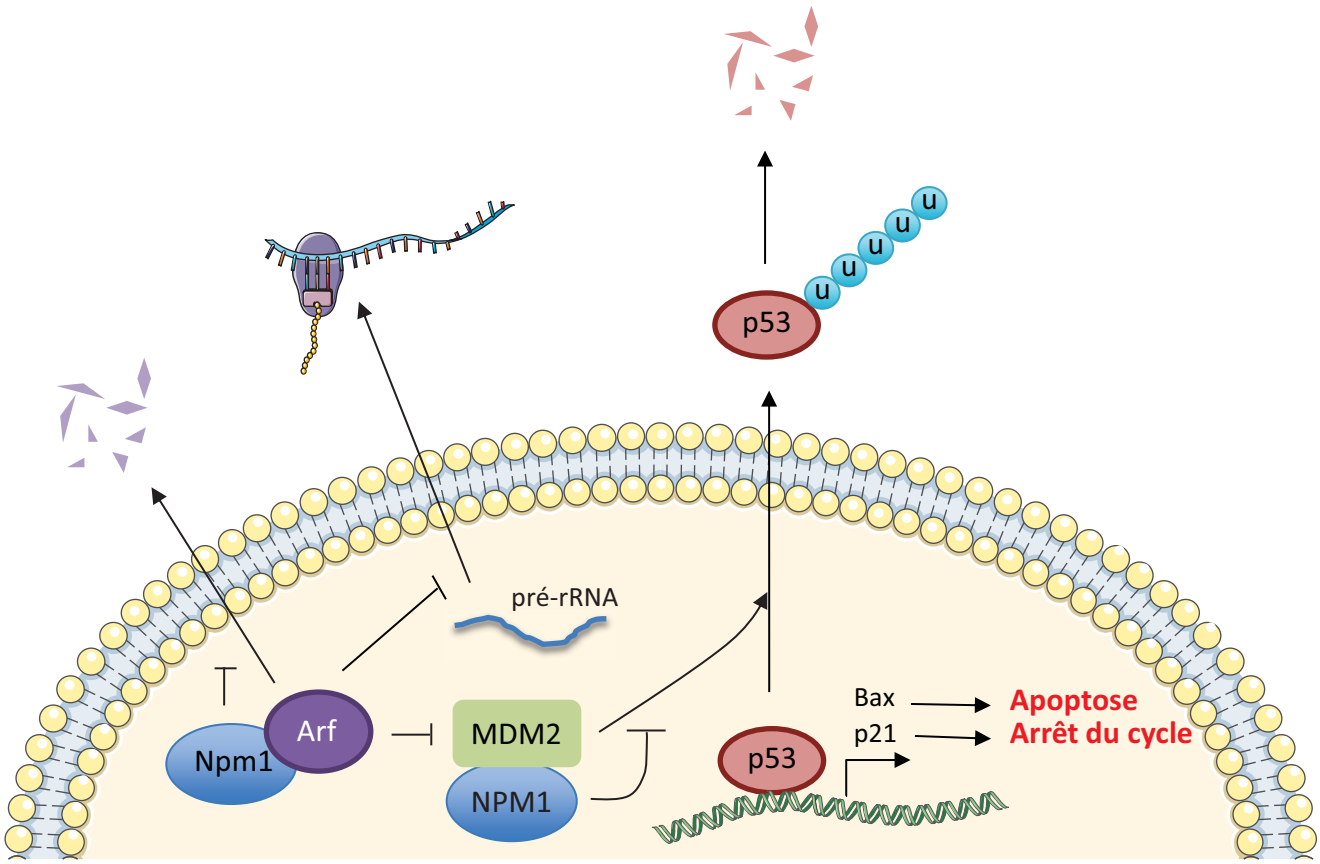



**Figure 32. Rôle antiprolifératif de NPM1.**
NPM1 interagit avec Arf pour la stabiliser. Celle-ci interagit et inhibe l'E3 ubiquitine ligase MDM2 et permet ainsi de stabiliser p53 en le protégeant d'une dégradation via le protéasome. p53 peut alors activer l'expression de ses gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Arf inhibe également la maturation des pré-rRNA prévenant ainsi la formation des ribosomes et la synthèse protéique. NPM1 interagit aussi avec MDM2 pour l'inhiber et ainsi stabiliser p53.

d'activité et une dégradation de NPM1 par la voie du protéasome. La SUMOylation et l'acétylation de NPM1 jouent respectivement sur la localisation de la protéine ainsi que sur sa capacité à réguler la transcription génique, et seront abordés par la suite.

Par ses multiples domaines, par la variété de ses intéracteurs, ainsi que par les multiples modifications post-traductionelles qu'elle subit, NPM1 régule diverses fonctions essentielles à l'homéostasie cellulaire. Ces processus peuvent être altérés lorsque l'expression ou la structure de la protéine est modifiée suite à des mutations génétiques ou épigénétiques, contribuant ainsi à l'apparition et/ou à la progression de nombreux cancers chez l'homme.

## 4. Rôles de NPM1 dans les cancers

Les altérations touchant au gène *NPM1* sont très fréquentes dans de nombreux types de cancers chez l'homme. D'abord considérée comme un marqueur de cellules tumorales et comme un potentiel proto-oncogène, NPM1 peut également avoir des fonctions onco-suppressives comme c'est le cas dans les cancers hématopoïétiques. L'étude de modèles cellulaires et murins présentant des altérations dans l'expression de NPM1 a permis de mieux définir ses multiples fonctions biologiques et leurs implications dans la tumorigenèse.

### 4.1. NPM1 inhibe la prolifération suite à un stress oncogénique et est necessaire à la stabilité génomique.

#### *4.1.1. NPM1 stabilise p14arf et stimule l'activité de p53*

L'inhibition de la prolifération induite par NPM1 est en partie associée avec sa capacité d'interaction avec la protéine $p14^{ARF}$ ($p19^{ARF}$ chez la souris) (**figure 32**). Cette dernière est une protéine nucléolaire impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose en réponse à un stress oncogénique en interagissant avec différents partenaires protéiques. D'abord, ARF peut interagir et séquestrer MDM2 dans le nucléole, inhibant ainsi

son activité. p53 est alors stabilisée et son activité transcriptionelle est accrue, permettant l'arrêt du cycle cellulaire via l'expression du CKI p21 ou l'apoptose via l'expression de Bax (Sullivan et al., 2012; Weber et al., 1999). ARF prévient également la prolifération en inhibant la maturation des ARN pré-ribosomaux 47S, 45S et 32S (Sugimoto et al., 2003). La stabilité de ARF dépend grandement de son interaction avec NPM1. En effet, la diminution de NPM1 par interférence ARN diminue la stabilité de ARF, alors que la surexpression de NPM1 l'augmente (Kuo et al., 2004). De plus, la forme mutante de ARF incapable d'interagir avec NPM1 est instable et non-fonctionnelle. Ces fonctions onco-suppresives de NPM1 ont été bien étudiées dans les cancers hématopoïétiques. En effet, un sous groupe de leucémies myéloïdes aigues est caractérisé par une mutation de NPM1 relocalisant la protéine dans le cytoplasme (NPMc+) (Falini et al., 2005). Dans les cellules malignes, NPMc+ interagit avec ARF et la relocalise dans le cytoplasme, inhibant l'action protectrice de Arf sur p53 ainsi que sur la biogenèse des ribosomes (Besten et al., 2005). De plus, NPMc+ s'hétérodimérise avec les formes sauvages de NPM1, qui ne peuvent alors plus interagir avec ARF pour prévenir sa dégradation.

NPM1 stimule également l'activité de p53 indépendamment de ARF (**Figure 32**). NPM1 se fixe directement à p53 pour la stabiliser et stimuler son activité transcriptionelle suite à un stress génotoxique (Colombo et al., 2002). De plus, l'expression de NPM1 est induite par une exposition aux rayonnements U.V., ce qui permet son interaction avec HDM2, l'orthologue humain de MDM2. Cette interaction stabilise p53 en l'empêchant de s'associer avec HDM2 (Kurki et al., 2004). Ces données sont renforcées par l'observation que la surexpression de NPM1 induit une sénescence dans des fibroblastes exprimant p53, alors qu'elle induit une hyperprolifération dans des fibroblastes invalidés pour p53 (Itahana et al., 2003b).

#### *4.1.2. NPM1 joue un rôle important dans la réparation de l'ADN et le maintien de la stabilité du génome.*

NPM1 joue un rôle important dans le contrôle de la réparation de l'ADN. Comme mentionné précédemment, l'expression de NPM1 est induite après irradiation par des rayonnements U.V. et est nécessaire à la réparation de l'ADN (Wu et al., 2002). De plus, la perte

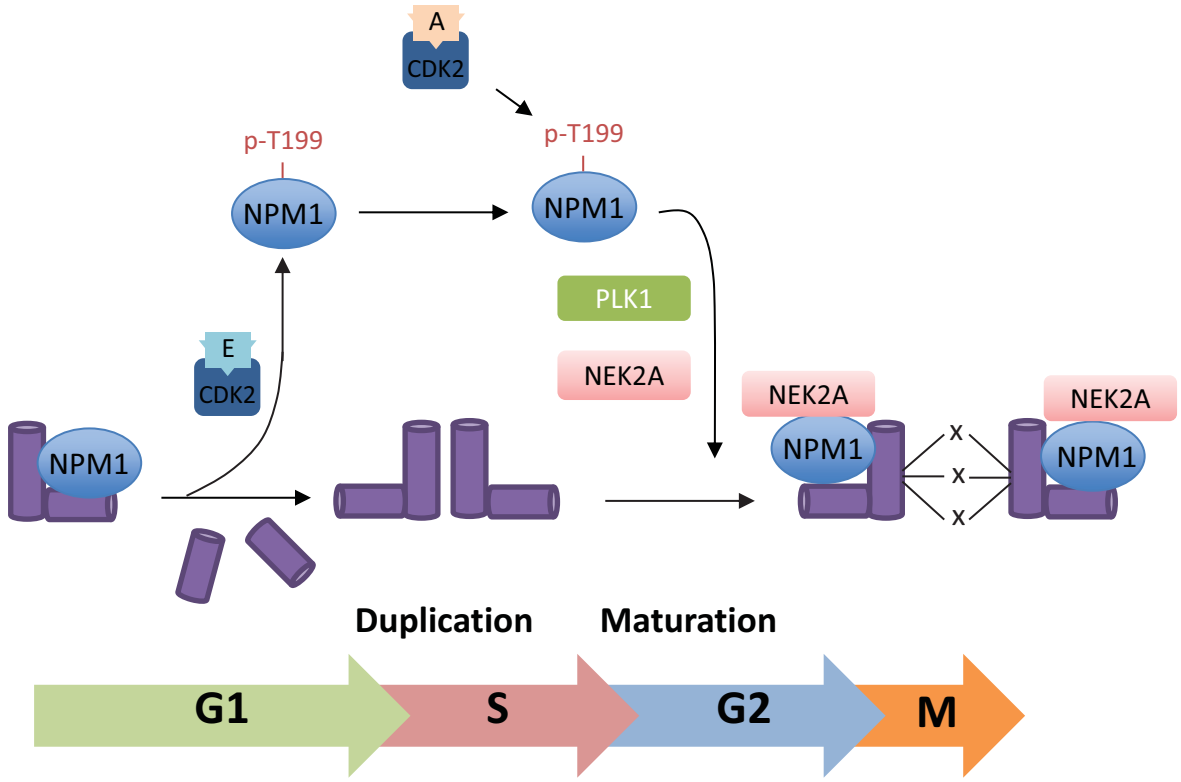



**Figure 33. Contrôle de la duplication des centrosomes par NPM1.**
En phase G1 du cycle cellulaire, la phosphorylation de NPM1 sur sa thréonine 199 par le complexe cycline E/CDK2 entraine sa dissociation des centrosomes puis duplication et la maturation des centrioles. Pendant ce processus, l'activité du complexe cycline A/CDK2 maintient la phosphorylation de la thréonine 199 de NPM1 pour prévenir sa réassociation prématurée avec les centrosomes. La réassociation de NPM1 avec les centrosomes durant la mitose dépend de sa phosphorylation par Plk1 et Nek2a.
D'après Grisendi *et al*, 2006.

d'expression de NPM1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris provoque une accumulation de la protéine phosphorylée γ-H2AX, marqueur des cassures doubles brins de l'ADN (Colombo et al., 2002). NPM1 est également nécessaire au maintien de la ploïdie. Dans des cellules quiescentes, NPM1 est retrouvée associée aux centrosomes, ce qui inhibe leur duplication. La phosphorylation de NPM1 sur la thréonine 199 par le complexe Cycline E/CDK2 entraine sa dissociation des centrosomes, ce qui induit la séparation des centrioles et l'initiation de la duplication des centrosomes (Okuda et al., 2000). La réassociation de NPM1 avec les centrosomes se fait durant la phase M du cycle cellulaire et est dépendante de l'activité de deux kinases mitotiques, PLK1 et NEK2A (Yao et al., 2004; Zhang et al., 2004). Il en résulte la formation de deux centrosomes qui vont former les deux pôles du fuseau mitotiques, permettant la bonne ségrégation des chromosomes (**figure 33**). En accord avec ces résultats, la perte d'un allèle de NPM1 chez la souris entraine une instabilité génomique due à une amplification du nombre de centrosomes (Grisendi et al., 2005). Ces souris développent un syndrome myélodysplasique, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle oncosuppresseur de NPM1 *in vivo*.

### 4.2. La surexpression de NPM1 est fréquente dans les tumeurs solides

Contrairement aux cancers hématopoïétiques, NPM1 est fréquemment surexprimée dans les tumeurs solides, et aucune mutation ou délétion du gène n'a pour l'heure été rapportée. L'expression de NPM1 est corrélée à la prolifération cellulaire en réponse à des stimuli mitogéniques (Feuerstein and Randazzo, 1991; Gubin et al., 1999). En effet, NPM1 est depuis longtemps considérée comme un marqueur de cellules en prolifération et/ou cancéreuses (Dergunova et al., 2002). Au delà de ces observations, plusieurs études ont depuis montré l'effet causal d'une surexpression de NPM1 sur l'homéostasie cellulaire. Les principaux effets biologiques qui ont été observés suite à une surexpression de NPM1 *in vitro* sont une augmentation de la prolifération et l'inhibition de la différenciation et de l'apoptose, traits caractéristiques d'une transformation néoplasique.

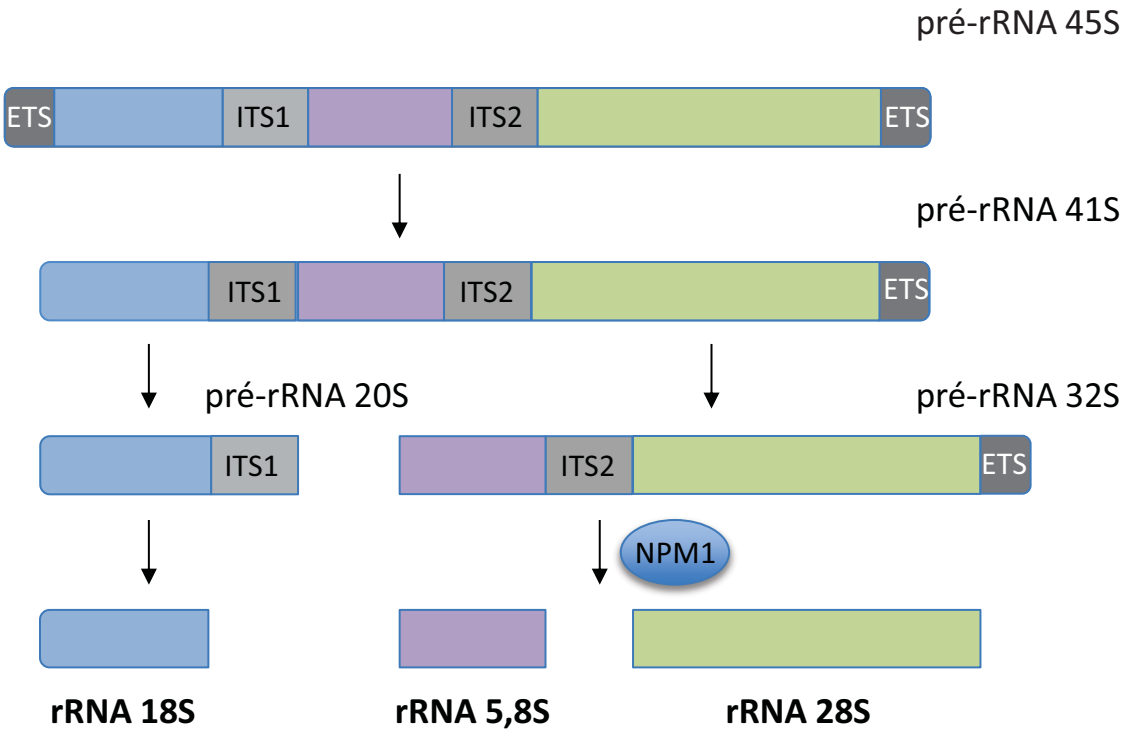



**Figure 34. Etapes de maturation des ARN ribosomiques (rRNA).**
Les ARN ribosomaux sont transcrits sous la forme d'un précurseur, le pré-rRNA 45S, qui sera maturé en plusieurs étapes par clivage des séquences ETS (*External Transcribed Spacer*) et ITS1/2 (*Internal Transcribed Spacer*). Par son activité ribonucléasique, NPM1 est capable de cliver l'ITS2 et ainsi de favoriser la maturation du pré-rRNA 32S en rRNA 5,8S et 28S.

### 4.2.1. La surexpression de NPM1 est associée à un état prolifératif

La surexpression de NPM1 mène à une accélération du cycle cellulaire alors que sa diminution par interférence ARN stoppe la prolifération, dans plusieurs modèles de lignées de cellules cancéreuses humaine (Li et al., 2008; Wang et al., 2011). Plusieurs mécanismes ont été identifiés pour expliquer ce rôle prolifératif de NPM1 comme son interaction avec l'ADN polymérase α qui stimule la réplication de l'ADN (Takemura et al., 1999a). Cependant, l'un des rôles principaux de NPM1 dans la prolifération cellulaire est du à son activité dans la biogenèse des ribosomes. En effet, NPM1 est capable d'interagir avec les acides nucléiques et notamment les ARN ribosomaux (ARNr), et cette interaction est nécessaire pour la maturation et l'export cytoplasmique des ARNr nouvellement synthétisés (Lindström, 2010). De plus, elle possède une activité ribonucléasique et elle est capable de couper les pré-ARNr au niveau de l'ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) pour permettre la maturation des ARNr 5.8 et 28S (Savkur and Olson, 1998) (**figure 34**). Conformément à ces observations, la diminution de NPM1 par interférence ARN réduit la maturation des ARNr dans un modèle cellulaire d'ostéosarcome (Itahana et al., 2003b). NPM1 stimule également la transcription des ARN ribosomaux ainsi que celle d'autres gènes impliqués dans la transformation maligne en contrôlant l'activité transcriptionnelle du facteur oncogène c-myc (Li and Hann, 2013; Li et al., 2008). De cette façon, NPM1 participerait à la prolifération continue des cellules cancéreuses en renforçant la biogenèse des ribosomes et donc la synthèse protéique. Au delà de son rôle sur c-myc, plusieurs études ont rapporté un rôle de NPM1 dans la régulation de la dynamique chromatinienne et la transcription génique pour participer à l'expression ou à la répression de gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeurs, respectivement. Dans les cancers oraux, NPM1 est acétylée par l'histone acétyl-transférase p300, ce qui stimule son activité de chaperonne d'histone pour remodeler la chromatine et contrôler l'expression de gènes impliqués dans la transformation maligne (Shandilya et al., 2009). NPM1 est également capable d'interagir et d'inhiber HEXIM1, un inhibiteur du complexe RNApol II, stimulant ainsi la transcription génique (Gurumurthy et al., 2008).

L'activité proliférative de NPM1 peut également être expliquée par son interaction avec des voies de signalisation cellulaire dépendantes des facteurs de croissance ou dépendantes des interleukines. Ainsi, suite à l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT par les

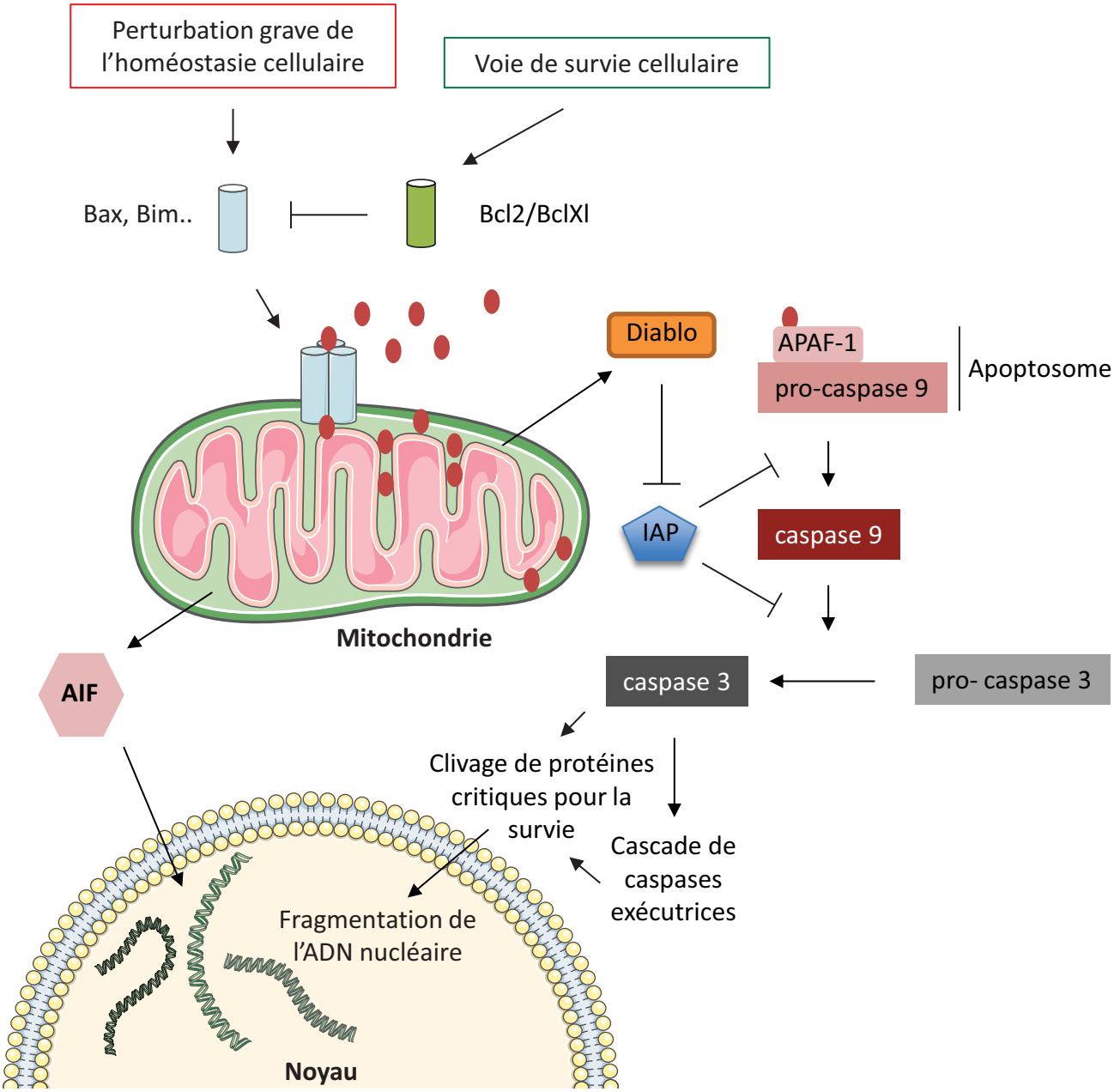



**Figure 35. Voie apoptotique intrinsèque.**
Des perturbations de l'homéostasie cellulaire, telles que des lésions de l'ADN, sont capables de déclencher l'apoptose par la voie mitochondriale. Elles stimulent l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bim qui s'oligomérisent et forment des pores à la surface de la mitochondrie. Le relargage de cytochrome c qui en découle permet la formation d'un complexe appelé apoptosome constitué des protéines Apaf-1 et pro-caspase 9. La maturation de la caspase 9 par clivage conduit ensuite à l'activation des caspases activatrices, dont la caspase 3, puis au clivage de protéines de survie. L'ensemble de ces événements aboutit à la fragmentation de l'ADN nucléaire et à la mort de la cellule. Certaines protéines relarguées par la mitochondrie peuvent transloquer directement dans le noyau pour initier la fragmentation de l'ADN. D'autres, comme Smac/Diablo, inhibent les protéines IAP, qui elles-même inhibent la maturation des caspases. La voie apoptotique intrinsèque peut être bloquée par l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl2/BclXl) sen réponse à l'activation de voies de survie. Ces protéines inhibent le relarguage du cytochrome c en titrant les protéines pro-apoptotiques au niveau de la membrane mitochondriale, les empêchant ainsi de s'oligomériser et d'être actives.

interleukines, la protéine STAT3 phosphorylée stimule l'expression de NPM1. Réciproquement, la présence de NPM1 est nécessaire à l'activation de STAT3. Enfin, l'interaction entre les deux protéines facilite la translocation nucléaire de STAT3 pour activer ses gènes cibles (Ren et al., 2014).

NPM1 est également impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses de colon en inhibant la sénescence induite par p53 en réponse à un stress oncogénique (Wong et al., 2013). Elle est de plus retrouvée surexprimée dans des échantillons de cancer du colon humains par rapport à des échantillons sains ou issus d'adénomes bénins.

### *4.2.2. NPM1 inhibe l'apoptose et confère une résistance aux traitements anticancéreux*

L'apoptose repose sur l'activation d'une cascade de clivages protéiques assurés par les enzymes de la famille des caspases. Elle peut être déclenchée par un signal externe (voie extrinsèque) qui nécessite l'activation de récepteurs membranaires ou par des altérations internes à la cellule (voie intrinsèque) qui mobilise les mitochondries (**figure 35**). Les *stimuli* conduisant à l'apoptose par voie intrinsèque peuvent être des lésions de l'ADN, la production excessive d'espèces oxygénées réactives (ROS, *Reactive Oxygen* Species), des dommages importants de la structure cellulaire ou encore un environnement pauvre en facteurs trophiques. Ils conduisent au relargage du cytochrome c par la mitochondrie, par le biais de la protéine pro-apoptotique BAX (*Bcl-2 Associated* X) qui forme un pore au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Martinou and Green, 2001). Le cytochrome c s'associe alors avec la procaspase 9 et la protéine Apaf-1 pour former l'apoptosome et déclencher la cascade d'activation des caspase, menant finalement à la fragmentation de l'ADN nucléaire et à la mort de la cellule (Zou et al., 1999).

La surexpression de NPM1 renforce la survie cellulaire en inhibant l'apoptose des cellules cancéreuses suite à différents stress, et donc confère une résistance aux traitements chimio- et radiothérapeutiques. En effet, plusieurs études montrent que la diminution de NPM1 par interférence ARN sensibilise plusieurs lignées de cellules cancéreuses contre différentes

drogues tels que le taxol, la mitomycine C ou encore le cisplatine, et contre l'irradiation avec des rayonnements U.V. (Bergstralh et al., 2007; Lo et al., 2013; Sekhar et al., 2014). Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent expliquer la résistance induite par NPM1. D'abord, NPM1 interagit et séquestre dans le cytoplasme la protéine pro-apoptotique BAX, inhibant ainsi la libération du cytochrome c et l'apoptose par voie mitochondriale (Lo et al., 2013). NPM1 est aussi capable d'inhiber l'activité de p53, qui est un régulateur clé de l'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN. En réponse à un rayonnement U.V., NPM1 est phosphorylée par la protéine kinase ATR. Cette phosphorylation entraine sa fixation à p53 et empêche la phosphorylation de celui-ci sur sa sérine 15, essentielle à son activité transcriptionnelle (Maiguel et al., 2004). Dans des conditions physiologiques, cette inhibition de p53 par NPM1 permet de fixer un seuil de rayonnement à partir duquel l'activation de p53 est nécessaire pour stopper le cycle cellulaire et/ou déclencher l'apoptose. Dans une cellule cancéreuse, la surexpression de NPM1 va augmenter ce seuil et provoquer l'apparition d'une résistance aux rayons et une instabilité génomique pouvant favoriser la progression tumorale. p53 induit également une apoptose suite à un stress oncogénique, comme la surexpression de c-MYC. Dans ces conditions, la surexpression de NPM1 inhibe l'activité de p53 pour favoriser la prolifération induite par c-myc (Li et al., 2007). NPM1 a également été montré comme étant un médiateur en aval de la voie de survie cellulaire PI3K/AKT dans le noyau. Le traitement de cellules surrénaliennes de rat avec du NGF (*Nerve Growth Factor*, facteur de croissance pouvant stimuler la voie PI3K/AKT) entraine la phosphorylation de phosphoinositides pour former des PIP3 (*PhosphoInositides tri-Phosphate*). NPM1 se fixe sur ces PIP3 et le complexe NPM1-PIP3 inhibe la fragmentation de l'ADN par la CAD (*Caspase Activated Dnase*) et stoppe finalement le processus apoptotique (Ahn et al., 2005).

Comme il a été rapporté dans la partie précédente, NPM1 est un acteur important de la réparation de l'ADN. Dans un contexte physiologique, cette fonction est nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire. En revanche, dans un contexte malin, cette capacité, en conférant de meilleures capacités de réparation aux cellules tumorales, aura un rôle important dans la survie cellulaire et dans la résistance aux traitements génotoxiques.

Enfin, NPM1 protège les cellules cancéreuses contre les stress environnementaux générés par la croissance tumorale. *In vivo*, la croissance initiale d'une tumeur avant l'angiogenèse crée un environnement hypoxique et appauvri en nutriments et en facteurs de croissances,

deux signaux environnementaux connus pour déclencher l'apoptose. La surexpression de NPM1 pourrait permettre aux tumeurs de continuer de croître dans ces conditions puisque : 1) l'expression de NPM1 induite par le facteur de transcription HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor*) en condition hypoxique permet d'inhiber la phosphorylation de la sérine 15 de p53 et ainsi de bloquer l'apoptose (Li et al., 2004) ; 2) l'activation de Ras stabilise la protéine NPM1, et cela est nécessaire pour la survie de fibroblastes cultivés sans sérum (Chou and Yung, 2001).

**Au vu de ces données, il apparaît donc qu'un dosage précis de NPM1 soit nécessaire à l'homéostasie cellulaire, puisque l'absence ou l'excès de cette protéine favorise la tumorigenèse dans divers tissus.**

# Présentation du sujet de recherche

## Quel est l'impact d'une surexpression de NPM1 *in vivo* ?

Avant mon arrivée au laboratoire l'équipe d'accueil a identifié la protéine chaperonne NPM1 comme étant surexprimé dans des tumeurs prostatiques humaines, indépendamment du score de Gleason (Léotoing et al., 2008a). De plus, cette étude a permis d'établir NPM1 comme un nouveau co-activateur de l'activité transcriptionnelle de AR, un acteur majeur de la carcinogenèse prostatique. Comme décrit dans le chapitre précédent, la surexpression de NPM1 est observée dans de nombreuses tumeurs d'origines histologiques différentes. Bien que de nombreuses études se soient intéressées aux mécanismes moléculaires reliant NPM1 à la prolifération cellulaire et la transformation maligne *in vitro*, il n'existe pas à l'heure actuelle de démonstration de activité de transformation *in vivo*. Afin d'explorer le rôle de NPM1 dans la physiopathologie prostatique, nous avons développé une stratégie permettant de générer des souris transgéniques surexprimant la forme humaine de NPM1. Afin de diriger l'expression du transgène spécifiquement dans l'épithélium prostatique, nous avons placé sa séquence ADNc en aval du promoteur minimal de la probasine de rat (-426/+28). Ce promoteur, dénommé ARR2PB, a déjà permis un ciblage de l'expression du gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) au niveau des lobes prostatiques (Zhang et al., 2000). **En utilisant ce modèle de souris transgénique et des lignées cellulaires de cancer de la prostate humaine, le premier objectif de mon travail de thèse a été d'analyser l'impact d'une surexpression de NPM1 sur la physiopathologie prostatique *in vivo*. Plus précisément, nous souhaitions déterminer si NPM1 possède un rôle oncogénique dans la prostate en favorisant l'initiation et/ou la progression du cancer de la prostate.**

## Quels facteurs sont à l'origine de la surexpression de NPM1 dans le cancer de la prostate *in vivo* ?

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données concernant l'origine d'une surexpression de NPM1 dans le cancer de la prostate. L'accumulation des transcrits codant pour NPM1 dans les cancers de la prostate nous a permis de poser deux hypothèses, non exclusives. D'une part, elle pourrait être due à une stabilisation de l'ARNm de NPM1 dans un contexte tumoral. D'autre part, cette surexpression pourrait être le reflet d'une augmentation de l'activité de facteurs de transcription ayant NPM1 pour gène cible. Plusieurs de ces facteurs sont connus pour réguler l'expression de NPM1, parmi lesquels c-myc, HIF-1α, ou encore YY1 (Chan et al., 1997; Dang et al., 2006; Li et al., 2004). Plus récemment, des analyses d'immuno-précipitation de chromatine couplés à un séquençage haut débit des fragments d'ADN récupérés (ChIP-seq) ont permis de montrer la présence de mTOR sur le promoteur de NPM1 dans les cellules hépatiques murines *in vivo* (Chaveroux et al., 2013a). Ces données révèlent un nouveau rôle nucléaire de mTOR dans la régulation de l'expression génique. De plus, l'altération fréquente de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la tumorigenèse prostatique pose mTOR comme un candidat pertinent dans la régulation de l'expression de NPM1. Pour explorer cette piste, nous avons tiré profit d'un modèle de souris invalidées pour le gène Pten dans l'épithélium prostatique (Wang et al., 2003b). Ces animaux développent des adénocarcinomes présentant une signature moléculaire similaire à celle observée chez l'homme et constituent à l'heure actuelle l'un des meilleur modèle de tumorigenèse prostatique. De plus, l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt dans ce modèle suite à la perte de Pten permet une hyperactivation de mTOR. **En utilisant ce modèle ainsi que des fibroblastes embryonnaires dérivés de ces souris, le deuxième objectif de ma thèse a été 1) de déterminer si mTOR contrôle l'expression de NPM1, 2) si oui, par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) et 3) de déterminer l'impact de ce contrôle de NPM1 par mTOR dans un contexte tumoral.**

# *Résultats*

# ARTICLE 1

**NPM1 overexpression induces hyperproliferation in the prostate gland of transgenic mice**

Rafik Boudra, Sabrina Maquaire, Corinne Lours-Calet, Gaelle Loubeau, Cyrille de Joussineau, Martina Anna Polakova, Colin Niarfeix, Laurent Morel, Claude Beaudoin.

*En préparation.*

La nucléophosmine (NPM1/B23) est une protéine chaperonne d'histones qui participe à l'assemblage des nucléosomes et au remodelage de la chromatine. De nombreuses altérations fonctionnelles de NPM1 ont été répertoriées dans différents types de cancer et les travaux de l'équipe d'accueil ont montré que cette dernière s'exprime fortement dans les tumeurs prostatiques chez l'homme. A l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve expérimentale de la capacité de NPM1 à promouvoir la transformation maligne des cellules épithéliales de prostate et l'objectif du travail vise à explorer son pouvoir oncogénique chez des souris génétiquement modifiées. Nos résultats montrent que la surexpression ciblée de NPM1 dans l'épithélium prostatique grâce au promoteur androgéno-dépendant ARR2PB s'accompagne d'une augmentation du poids des lobes de la prostate chez les souris transgéniques en comparaison avec les souris sauvages. Bien qu'il n'y ait pas de tumeurs chez les animaux transgéniques à l'âge adulte, une analyse histologique révèle un épaississement de l'épithélium prostatique associé à une augmentation de l'index prolifératif par marquage avec l'antigène Ki-67. Ces modifications s'accompagnent d'une augmentation de l'expression de gènes cibles du facteur de transcription E2F1. Parmi ceux-ci, la hausse de l'accumulation de la cycline E est corrélée à une forte diminution des taux de $p27^{kip1}$, un inhibiteur de la progression du cycle cellulaire. Nous proposons un mécanisme selon lequel NPM1 pourrait lever la répression exercée par Rb sur E2F1. Par conséquent, l'expression des gènes codant pour la Cycline E ou encore SKP2 favoriserait la dégradation de $p27^{kip1}$ ce qui abolirait la quiescence de l'épithélium prostatique. Bien que ces altérations

ne soient pas suffisante pour initier la tumorigenèse *in vivo*, il est possible que l'association d'une surexpression de NPM1 avec d'autres lésions oncogéniques puisse stimuler la prolifération des cellules malignes en levant le frein qu'exerce la protéine p27kip1 sur la progression du cycle cellulaire et la prolifération. Enfin, la pertinence de ces observations est à mettre en perspective avec les observations cliniques chez l'homme qui révèlent que la perte de $p27^{kip1}$ dans les cancers de prostate possède une valeur prédictive du risque évolutif des tumeurs et de la récidive après traitement chez les patients atteints d'un cancer de la prostate.

**Nucleophosmin overexpression induces hyperproliferation in the prostate gland of transgenic mice.**

**Short title**: NPM1 induced hyperproliferation in mice prostate gland.

Rafik Boudra[1,2,3], Sabrina Maquaire[1,2,3,#], Corinne Lours-Calet[1,2,3], Cyrille de Joussineau[1,2,3], Martina Anna Polakova[4], Colin Niarfeix[1,2,3], Laurent Morel[1,2,3] and Claude Beaudoin[1,2,3*n]

[1]Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, GReD, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

[2]CNRS, UMR6293, GReD, F-63001 Clermont-Ferrand, France;

[3]Inserm, UMR1103, GReD, F-63001 Clermont-Ferrand, France;

#Current address:

[*]Correspondance to: Claude Beaudoin; CNRS UMR6293-GReD, Campus Universitaire des Cézeaux, 10 Avenue Blaise Pascal, Aubière 63178, France. Tel.: (+33)473405340; Fax.: (+33)473407042; Email: Claude.Beaudoin@univ-bpclermont.fr

**Keywords:** NPM1, transgenic mice, hyperplasia, p27$^{kip1}$, ubiquitination.

**Abbreviations:** NPM1/B23, nucleophosmin; PB, probasin; cdk, cyclin dependent kinase; Rb, retinoblastoma protein; SKP2, S-phase kinase associated protein 2; Ub, ubiquitin.

**ABSTRACT**

Nucleophosmin (NPM1/B23) is an abundant ubiquitously expressed phosphoprotein which is overexpressed in various solid tumors including prostate. Our previous work have shown that NPM1 binds to the androgen receptor to control its transcriptional activity in prostate cancer cells, however there is no reported *in vivo* model to assess its oncogenic potential in the prostate gland. Here, we characterized transgenic mice expressing flag-tagged NPM1 driven by the modified probasin promoter (ARR2Pb) to direct prostate epithelial cell-specific transgenic expression. Here, we show that both ventral and lateral prostate lobes weight were significantly higher in ARR2Pb-NPM1 transgenic (PB-NPM1) mice than in wild type (WT) mice at 3- and 12- months of age. This increase is accompanied by a greater epithelial proliferation index as determined by Ki67 immunostaining with focal areas of hyperplasia that are found in conjunction with a 3- to 4-fold increase of mRNA encoding cyclin E1 ($P$<0,02) in the ventral prostate of PB-NPM1 mice. In contrast, cyclin D1 was decreased 2-fold compared to WT mice ($P$<0,002) suggesting thus that NPM1 overexpression might facilitate entry into S phase by promoting a "cyclin switch" from cyclin D to cyclin E in the phase of the cell cycle as evidenced during prostate cancer progression. Moreover, our data provide evidence that NPM1 regultes cyclin E and SKP2 expression through a E2F1-dependent transcriptional mecanism that may leads to reduce p27kip1 abundance and increased cell growth capacities. Collectively, our data suggest that NPM1 acts as a permissive oncoprotein by regulating p27kip1 levels in order to promote cell proliferation. Current investigations using our genetically engineered mouse model should thus provide further insights into the molecular events of prostate cancer progression and may help to counteract the mechanisms of prostate cancer progression and resistance to therapy.

## INTRODUCTION

Prostate cancer is the second most diagnosed cancer and the 6th leading cause of cancer related death in men (Ferlay et al., 2010). Androgen receptor plays a critical role during the onset and the progression of this cancer and androgen deprivation therapy (ADT) is the standard treatment for locally advanced and metastatic disease today (Mottet et al., 2011). Beyond ADT-induced psychologic, sexual and metabolic disorders, virtually all the patient will relapse within 14 to 20 months to develop a castration-resistant prostate cancer, which is incurable (Sharifi N et al., 2005). It is therefore necessary to deepen our knowledge about the molecular mechanism governing prostate cancer progression to find new therapeutic targets.

One of the most important characteristic of cancer cell is their ability to sustain chronic proliferation. Cell division is governed by the sequential activation of cyclin-CDK (Cyclin Dependent Kinase) complexes, wherein cyclin binding induce the catalytic activity of the kinase. Coordinated activation of these holoenzymes guarantees the smooth progression of the cell cycle through the G1, S, G2 and M phases (Vermeulen et al., 2003). After mitogenic stimuli, D-type cyclins (D1, D2 and D3), expression rises and allows the formation of the active Cyclin D-CDK4/6, which in turn phosphorylates and partially inactivates the Retinoblastoma protein Rb (Assoian and Zhu, 1997). This release the transcriptional activity of the E2F (1-8)/DP complexes, leading to the expression of several target gene involved in DNA replication and late G1-S phase transition. Among these genes is Ccne, which encodes the cyclin E. Cyclin E associates with CDK2 and engage in a positive feedback loop by phosphorylating Rb, leading to its total inactivation. Another important step is the inhibition of the CDK-inhibitor (CKI) $p27^{kip1}$ by cyclin E/CDK2-mediated phosphorylation leading to its proteasomal degradation (Montagnoli et al., 1999; Sheaff et al., 1997). This allows the full activation of Cyclin

E/CDK2 as well as Cyclin A/CDK2 necessary to activate the transcription of genes that are required for the G1–S transition and to participate to the initiation of DNA replication (Nigg, 1993). Therefore, it is not surprising that dysregulation of these early steps of the cell cycle are frequent in human cancer, including prostate cancer (Lopergolo and Zaffaroni, 2009).

Nucleophosmin (NPM1, also known as B23, numatrin or NO38) is a histone chaperone that belongs to the nucleophosmin/nucleoplasmin family. This abundant 37 kDa protein is mainly localized in the nucleoli, although it can shuttle rapidly between the nucleus and the cytoplasm (Borer et al., 1989). NPM1 possesses several distinct functional domains allowing it to be involved in diverse cellular processes (Okuwaki, 2008). Indeed, NPM1 has been shown to be involved in ribosome biogenesis, stress response to UV irradiation or hypoxia, DNA repair and genome stability, DNA transcription, apoptosis and cell cycle regulation (Grisendi et al., 2006). NPM1 gene is frequently mutated in haematologic malignancies, leading to abnormal cytoplasmic localization in a large subset of acute myelogenous leukemias (Falini et al., 2005). Although no such mutation was found in solid tumors, NPM1 is frequently overexpressed in gastric, colon, ovarian and prostate cancer (Nozawa et al., 1996; Shields et al., 1997; Subong et al., 1999; Tanaka et al., 1992).

We have previously shown that NPM1 is essential for proliferation and migration of prostate cancer cells (Léotoing et al., 2008; Loubeau et al., 2014) but a clear demonstration of the oncogenic function of NPM1 is still lacking. Here, we report the phenotypic analysis of our transgenic mouse model overexpressing NPM1 in the prostate gland and provide evidence that NPM1 may stimulate prostate cell growth capacities by promoting p27kip1 proteolytic degradation.

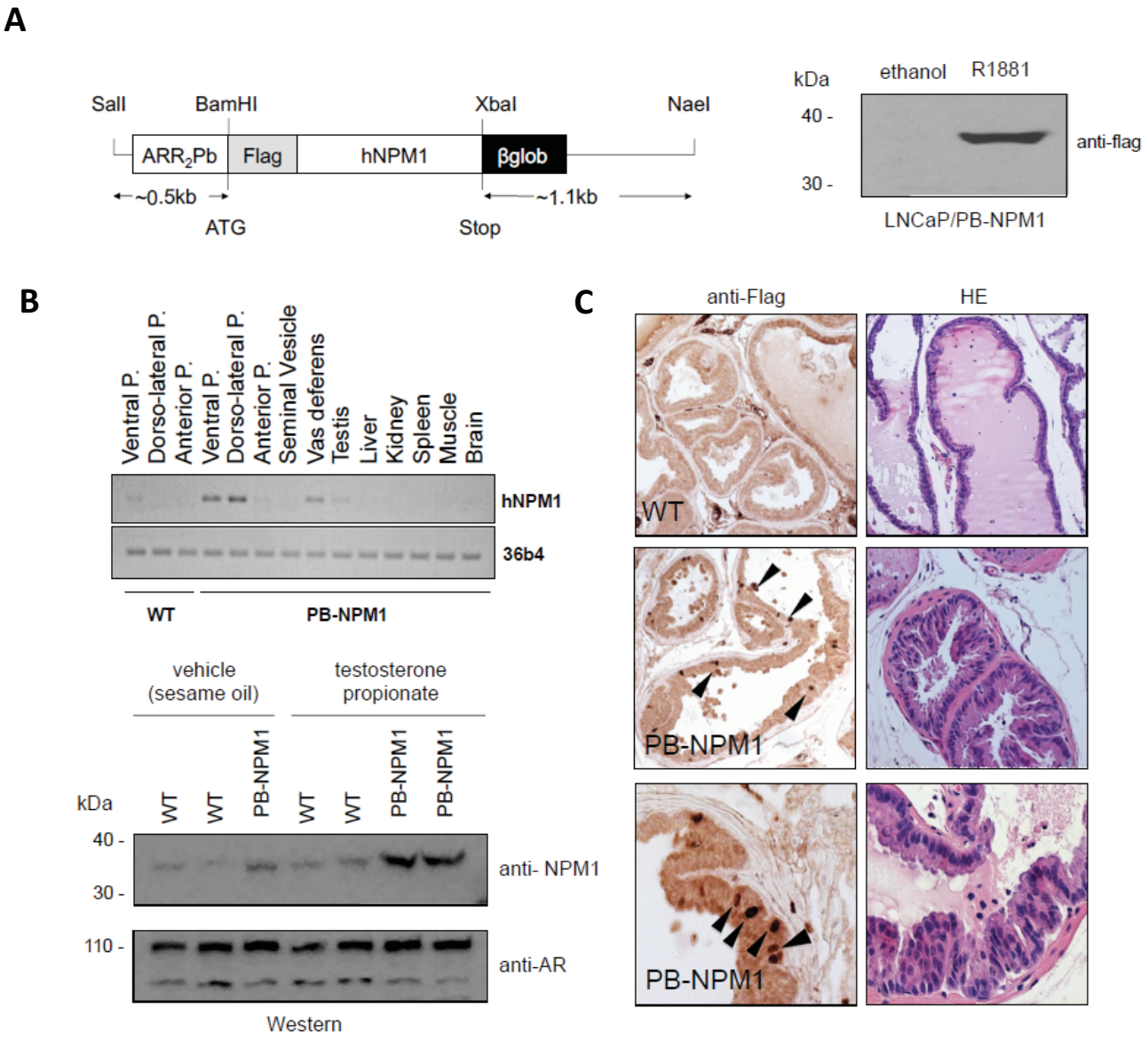
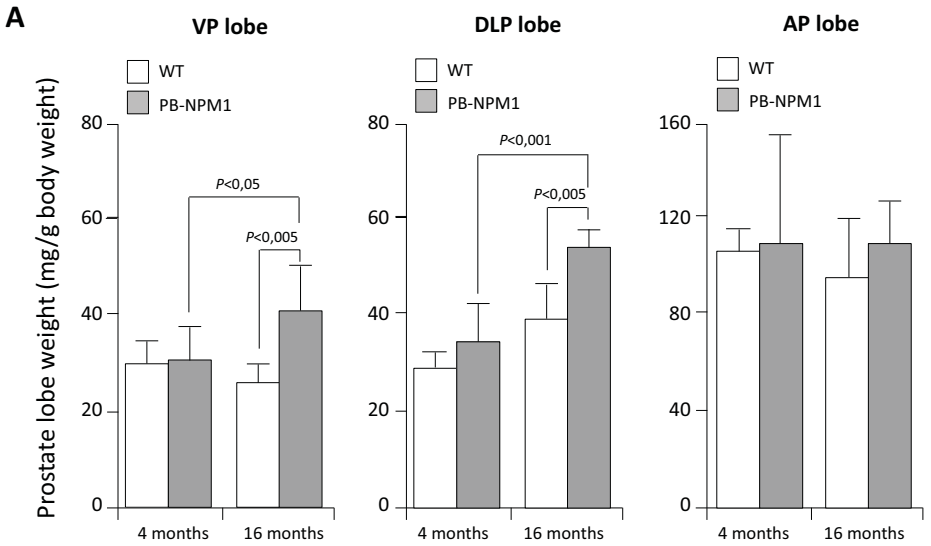


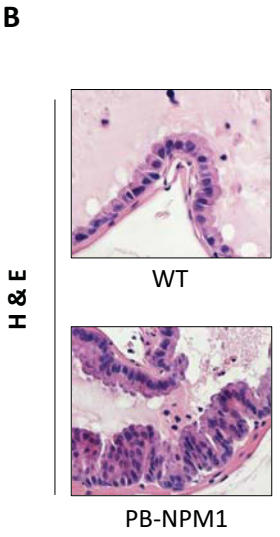

**Figure 1. Generation of PB-NPM1 transgenic mice.** A. Schematic representation of probasin-Flag-NPM1 transgene (left panel) and Flag-NPM1 protein accumulation levels in transfected LNCaP cells in the absence or in the presence of the synthetic androgen R1881 (10 nM, right panel). B. RT-PCR analysis of the transgene expression profile in 4 months old wild-type (WT) or transgenic (PB-NPM1) mice. As expected, the transgene is expressed mainly in the ventral and the dorso-lateral prostatic lobes and in the *vas deferens* (top panel). Twelve months-old wild type (WT) and transgenic (PB-NPM1) mice were treated with 75 µg testosterone propionate or with vehicle twice a day during two weeks. Total protein from ventral prostate was analysed by western-blot using anti-NPM1 and anti-AR antibodies (bottom panel). C. *In situ* detection of transgene expression by immunohistochemistry using an anti-Flag antibody on ventral prostate slices of 4 months old mice.

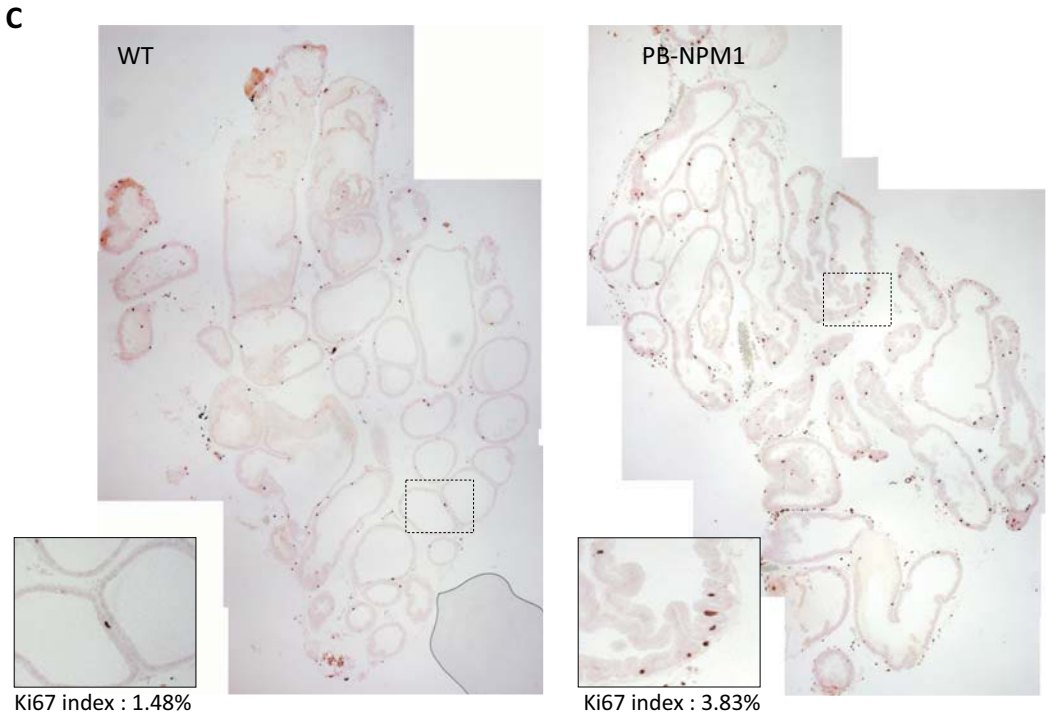
## RESULTS

**Generation of PB-NPM1 transgenic mice.** To investigate the role of NPM1 in prostate physiopathology, we targeted the expression of a human flag-tagged NPM1 specifically to the prostate epithelium by taking advantage of the androgen responsive ARR2-Probasin (PB) promoter (Zhang et al., 2000) (**fig 1a., left panel**). To test the transgene construction, we transfected it in LNCaP prostate cancer cells treated or not with the synthetic AR agonist R1881. As expected, AR activation induces a strong expression of recombinant Flag-NPM1 (**fig 1a., right panel**) in these cells. RNA extracts from various tissues obtained from 4-months old transgenic and wild type mice were analyzed by PCR using a human specific NPM1 primer set. Expression of the transgene is specific to the prostate of PB-NPM1 mice, with an ectopic expression in the testes and the *vas deferens* as previously reported (Seethammagari et al., 2006) (**fig 1c, top panel**). Consequently, NPM1 protein level is higher in the ventral prostate of PB-NPM1 mice compared to WT ones (**fig 1c, bottom panel**). Furthermore, daily injections of testosterone propionate induce a strong increase of NPM1 protein level only in the prostate from PB-NPM1 mice, confirming the androgen sensitivity of the transgene *in vivo*. Finally, we confirmed that the transgene expression is confined within the epithelial compartment of the prostate, as shown by the IHC analysis on 4 month old ventral prostate from WT and PB-NPM1 mice using an antibody directed against the flag epitope (**fig 1D**).

**NPM1 overexpression induces epithelial cell proliferation and leads to prostatic hyperplasia.** Mice were sacrificed at 4, 12 and 16-months old for phenotypic analysis. As shown in fig. 2, the weights of ventral and dorso-lateral prostate lobes were significantly increased in 16-month old PB-NPM1 mice, compared to their wild-type



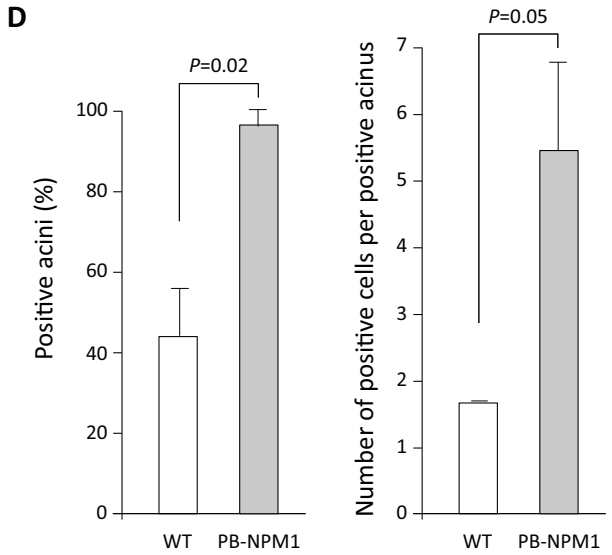




**Figure 2. NPM1 overexpression induces epithelial cell proliferation and leads to prostatic hyperplasia.** A. Ventral (VP), Dorso-lateral (DLP) and Anterior (AP) prostatic lobe weight of wild type and transgenic mice aged 4 or 16 months. Bars represents ± SEM and a Student's T test was performed to assess statistical significance (n = 4<x<7). B. HE staining of ventral prostatic lobe from 16 month old WT and PB-NPM1 mice. C. Immunohistochemical staining of the proliferative marker ki67 in the ventral lobe of 16 month old transgenic and WT mice. The ki67 index represents the ratio between the number of ki67 positive cells and the number of total cells. At least 4000 cells were counted for each condition. C. Proportion of acini displaying at least one ki-67 postive cell (% of positive acini) and average number of ki-67 positive cells per positive acinus in the ventral lobe of 16 months-old WT and PB-NPM1 mice.

littermates (**fig 2a**). Interestingly, no difference was seen about the weight of anterior lobes, where the transgene expression was weaker (**fig 1b, top panel**). We then choose to continue our investigations with ventral prostate (VP) of 16-months old mice since they have the more pronounced phenotype. VP were sectioned and stained with hematoxilin and eosin (H&E) for morphologic assessment. The normal architecture of the mouse VP consists of duct lined by a monolayer of epithelial cells surrounded by a thin layer of smooth muscle cells. Histologic analysis of the ventral lobes reveals some focal area of epithelial hyperplasia in the prostates of transgenic mice characterized by an additional layer of disorganized epithelial cells (**fig 2b**). However, no pre-neoplastic or cancerous lesions were seen in any animal, even at 16-months old. Ki67 immunostaining revealed that NPM1 overexpression leads to an increased number of proliferative acini (acinus with at least one ki67 positive cell) and of proliferative cell per proliferative acinus (**fig 2c**), along with a slight increase in the overall ki67 proliferative index. Altogether, these results show that NPM1 overexpression in the prostatic epithelium *in vivo* stimulates proliferation but is insufficient to trigger carcinogenesis.

**NPM1 overexpression activates E2F1-target genes.** Several studies have shown that NPM1 overexpression could dysregulate the cell cycle by acting on key oncosuppressor proteins such as Rb or p53 (Grisendi et al., 2006 ; Liu et al., 2007). Given the observed hyperproliferation in the VP of our PB-NPM1 mice, we checked out the expression of cyclin D1 and cyclin E1, which are both important regulators of the G1/S transition. Western blot analysis revealed a strong increase of Cyclin E1 protein abundance in ventral prostate from PB-NPM1 mice, as compared to WT (**fig. 3a**). Accordingly Cyclin E1 mRNA levels were also higher in these mice (**fig. 3b**). In contrast, cyclin D1

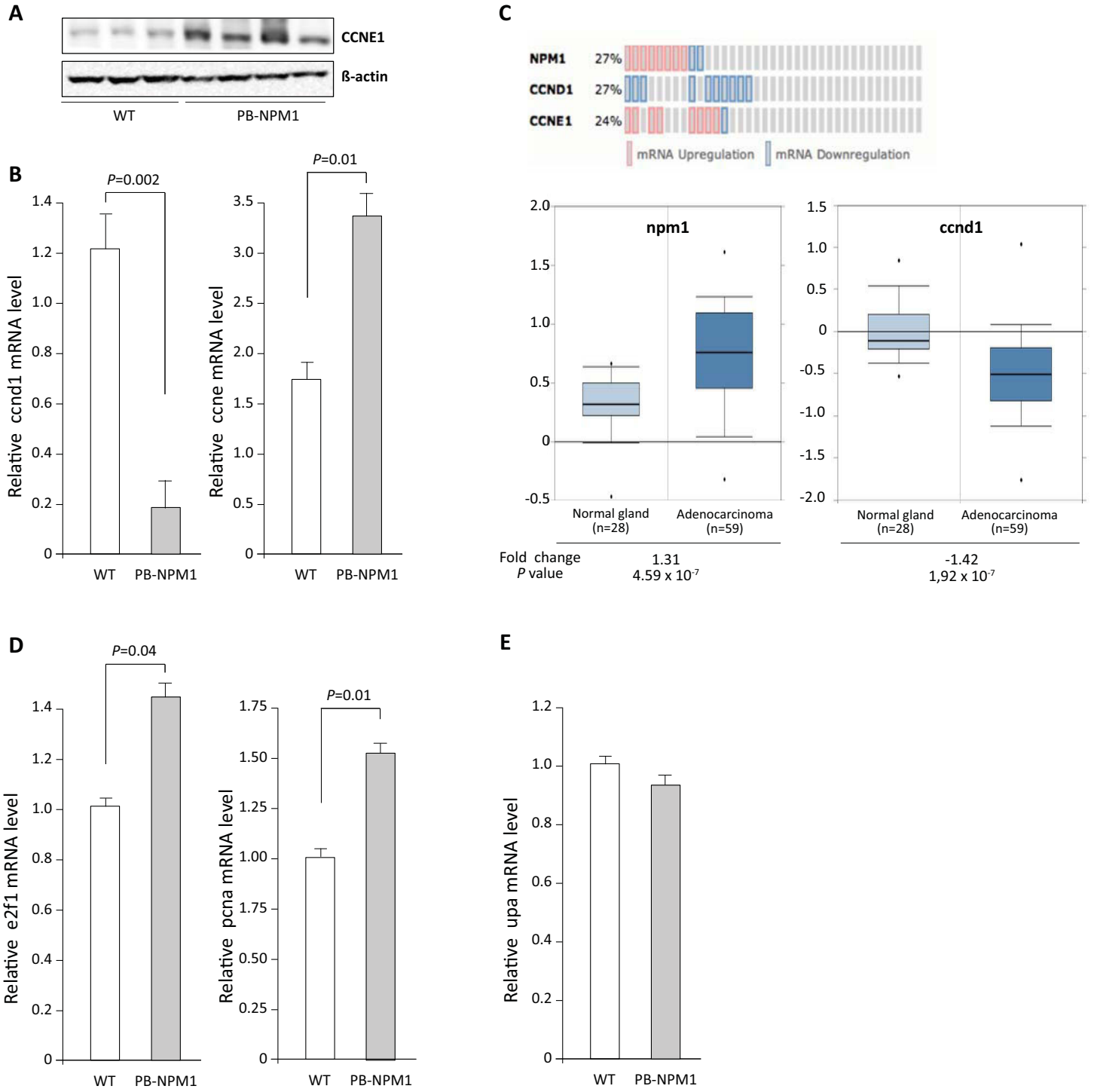



**Figure 3. NPM1 stimulates E2F1 target genes expression.** A. Western blot analysis of cyclin E1 protein accumulation in ventral prostate of 16 months old wild type and PB-NPM1 transgenic mice. B. Total RNA was extracted from the ventral prostate of 16 months old WT and Tg mice and expression of *ccnd1*, *ccne, pcna and egf* was mesured by RT-qPCR and normalized to the expression of 36b4. *:p<0,05; n=3. B. Heat map of relative expression level of NPM1, CCND1 and CCNE1 in metastatic prostate cancer samples (n=37) using MSKCC Prostate Oncogenome Project data set from cBio genomic portal (Taylor *et al*, 2010, referenced as GSE 21032)(top panel). Relative expression level of NPM1 and CCND1 in healthy prostate (n=28) vs. prostate adenocarcinoma (n=59) according to the Grasso dataset (Grasso et al, 2012) (bottom panel). D and E. RT-qPCR analysis of mRNA accumulation of Rb-dependant (D) and –independent (E) E2F1 target genes in the ventral prostate from 16 months-old WT and PB-NPM1 transgenic mice. Results are normalised to the expression of 36b4. Bars represents ± SEM and a Student's T test was performed to assess statistical significance (n=3).

expression is dramatically decreased in PB-NPM1 mice. This cyclin switch was already described in the TRAMP model of prostate cancer where it is imputed to E2F1 activation following Rb inactivation by large T antigen (Maddison et al., 2004a). We thus confirmed this result in clinical samples of prostate cancer using the transcriptome analysis published by Grasso *et al*. in 2012 (Grasso et al., 2012). Gene expression analysis on 28 benign prosatic tissues vs. 59 localized prostate cancer revealed on these latter an overexpression of NPM1 together with a downregulation of cyclin D1 expression (**fig 3b**). Furthermore, data from another study reveal that NPM1 overexpression is associated with Cyclin E1 overexpression and Cyclin D1 downregulation (Taylor et al., 2010). Since NPM1 is able to bind and to inhibit Rb in HeLa and NIH3T3 cell lines, leading to E2F1 transcriptional activity and cell cycle progression, we asked if it is the case in the prostate *in vivo* (Liu et al., 2007; Takemura et al., 1999). To test this hypothesis, we measured the expression of some E2F1 target genes by qRT-PCR. Three of these genes are sensitive to Rb inhibtion (Cyclin E1, Pcna, E2F1) whereas one is Rb-independant (uPa, which encode for the urokinase-type plasminogen activator). Interestingly, only the three Rb-dependant genes are overexpressed in the VP from our PB-NPM1 mice (**Fig 3c**). These results suggest that NPM1 overexpression leads to E2F1 activition probably through Rb inhibition.

**NPM1 overexpression is associated with loss of p27$^{kip1}$**. A crucial step for the G1/S phase transition is the degradation of the CKI p27$^{kip1}$ by the proteasome, which allows full CDK2 activation. One way for the cell to do this is by upregulating Cyclin E1, which associates and activates CDK2. This complexe phosphorylates p27$^{kip1}$ on the Th-187, leading to its ubiquitynation by the E3-ubiquitin complex ligase SCF$^{Skp2}$ and its subsequent proteasomal degradation (Chu et al., 2008). We analysed p27$^{kip1}$ protein

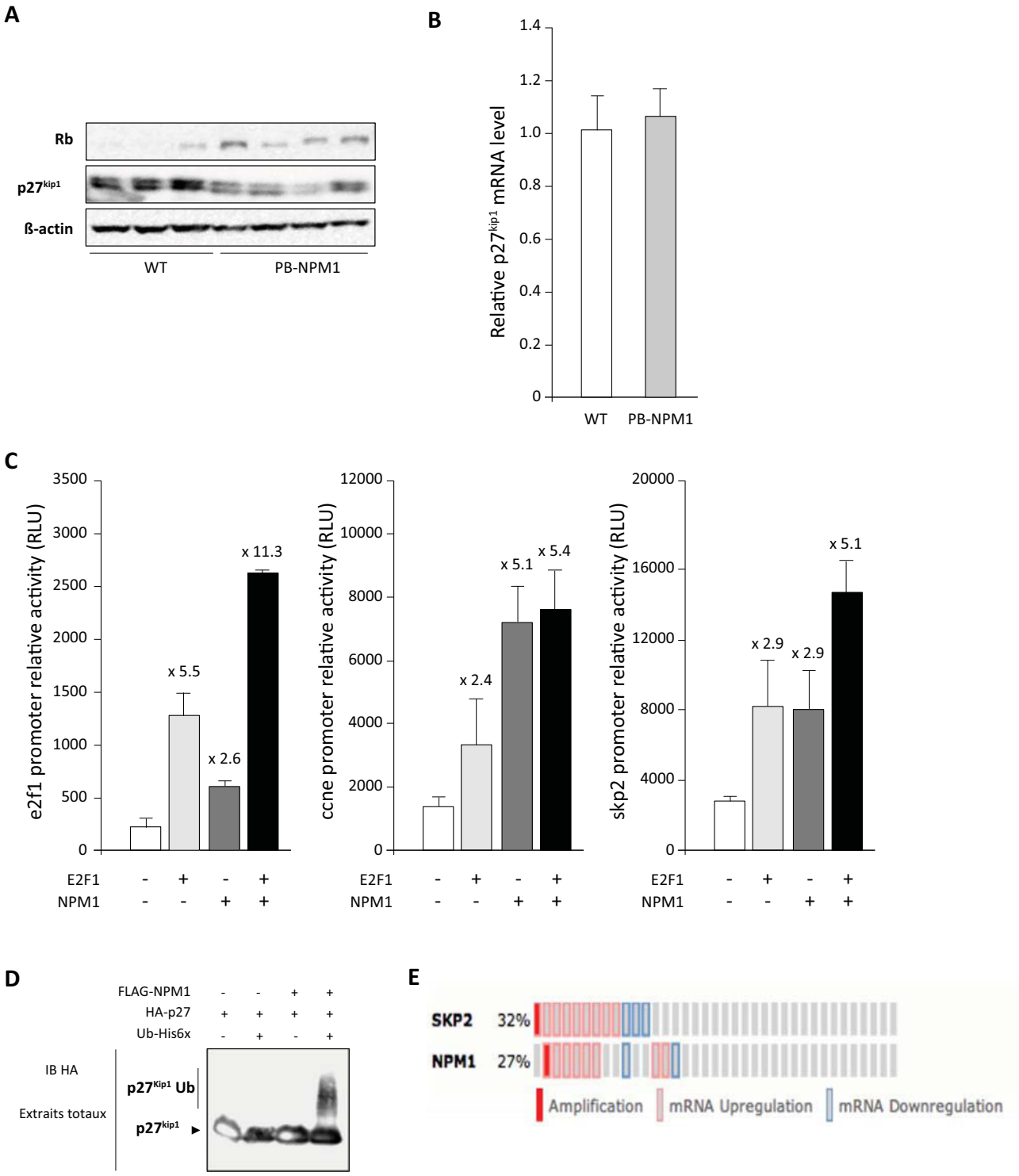



**Figure 4. NPM1 overexpression downregulates p27$^{kip1}$ protein level.** A. Western-blot analysis of Rb and p27$^{kip1}$ protein accumulation in ventral prostate of 11 month old wild type and transgenic mice. B. RT-qPCR analysis of mRNA accumulation of p27$^{kip1}$ in the ventral prostate from 16 months-old WT and PB-NPM1 mice. Results are normalized to the expression of 36b4 mRNA. Bars represents ± SEM and a Student's T test was performed to assess statistical significance (n=3). C. HeLa cells were co-transfected with human E2F1-luc, CCNE-luc or SKP2-luc reporter genes together with NPM1 or E2F1 expression vectors as indicated. Luciferase activity was assessed using the Genofax A reporter assay systems (Yelen Corp., France). D. NPM1 overexpression increase p27$^{kip1}$ ubiquitination. HeLa cells were co-transfected with Flag-NPM1, HA-p27$^{kip1}$ and Ubiquitin-His6x expression vectors as indicated. After 2 days, the MG-132 proteasome inhibitor was added for 3 hours and then, harvested cells were lysed for SDS-PAGE analysis and immunoblot visualization of ubiquitin p27$^{kip1}$ conjugated protein with an anti-HA antibody. E. Heat map of relative expression level of NPM1 and SKP2 gene expression in metastatic prostate cancer samples (n=37) using MSKCC Prostate Oncogenome Project data set from cBio genomic portal (Taylor et al, 2010, referenced as GSE 21032).

accumulation in VP from 16-months old mice by western blot. $p27^{kip1}$ protein level was strongly decreased in VP from transgenic mice (**fig 4a**). In contrast, $p27^{kip1}$ mRNA level was not changed between wild-type and PB-NPM1 mice (**fig 4b**). This was not surprising since $p27^{kip1}$ regulation occurs mainly at the post-transcriptional level, and we would expect than NPM1-induced E2F1 activation may account for this. We then checked this assumption and showed that NPM1 overexpression in cotransfected HeLa cells leads to the full activation of the transcriptional capabilities of E2F1, leading to SKP2 and Cyclin E overexpression. As shown in fig 4c., co-transfection of HeLa cells with luciferase reporter genes under the control of E2F1 targeted promoters (i.e. E2F1, SKP2 and Cyclin E) indicated that all three promoters were efficiently activated by NPM1. These data thus strenghten our hypothesis that NPM1 overexpression may enhance transcriptionnal activation of the Cyclin E and SKP2 promoters by E2F1 and the results obtained so far prompt us to examine whether NPM1 overexpression enhances $p27^{kip1}$ ubiquitination *in vivo*. To do so, we have co-transfected a HA-tagged $p27^{kip1}$ expression vector into the HeLa cell line in combination with flag-NPM1 and $HIS_{6X}$-ubiquitin expression vectors as indicate in figure 4D. 2 days after transfection, cells were lysed in guanidium-HCl buffer and $HIS_{6X}$ubiquitin-conjugated proteins were purified from the clear lysate supernatant by NTA chromatography. SDS-PAGE separation of eluted proteins and immunoblotting analysis using an antibody against the HA epitope confirm the conjugation of ubiquitin to $p27^{kip1}$ only when NPM1 is overexpressed (Fig 4D). Thus, this result confirms our hypothesis relative to the enhance ubiquitination of p27kip1 in cells overexpressing NPM1.

## DISCUSSION

NPM1 is a well known marker of cellular proliferation. Through its important roles in ribosome biogenesis, chromatin remodelling and cell cycle regulation, it has been proposed that NPM1 overexpression is not a consequence but can rather be a cause of carcinogenesis (Lindström, 2011). Several studies have analysed the impact of NPM1 overexpression and/or post-traductional modifications in various immortalized and cancerous cell lines and concluded to a role in cellular proliferation, migration and invasiveness, three key features of tumorigenesis (Liu et al., 2012; Loubeau et al., 2014; Qing et al., 2008; Shandilya et al., 2009). Despite these observations, no studies have assessed the oncogenic role of NPM1 *in vivo*. Here we demonstrate that NPM1 overexpression leads to prostatic hyperplasia but is not sufficient to trigger carcinogenesis. Since NPM1 is essential to maintain proliferative habilities of prostate cancer cell lines, it is likely that NPM1 overexpression promotes cancer progression once the disease is established. Ongoing studies in our laboratory are currently tackling this question by crossing PB-NPM1 mice with mice harbouring a prostate specific deletion of Pten ($Pten^{pc-/-}$), a classic mouse model of prostate cancer (Wang et al., 2003). Preliminary results show that prostates from PB-NPM1/$Pten^{pc-/-}$ has a stronger ki67 proliferative index when compared to the $Pten^{pc-/-}$ littermates (data not shown). Since $Pten^{pc-/-}$ mice develop metastasis with low penetrance and given the fact that NPM1 is essential for the migration and invasion capacities of human prostate cancer cells (Loubeau et al., 2014), we expect that the combination of the two alterations will result in highly aggressive, metastatic prostate cancer. Altogether, this study and previous papers from our laboratory strongly suggest a role of NPM1 in prostate cancer progression.

The present results also uncovered the role of NPM1 in the G1/S transition of the cell cycle *in vivo*, likely through the regulation of E2F1 transcriptional activity. It is tempting to propose that the control of E2F1 by NPM1 may occur through the inhibition of pRb, since only the Rb-dependant E2F1 target genes are affected by NPM1 overexpression. This observation is consistent with previous report showing that NPM1 interacts with and sequesters Rb in the nucleoli, thereby relieving its inhibitory effect toward E2F1 (Liu et al., 2007; Takemura et al., 1999). Furthermore, mice carrying a prostate specific deletion of Rb display the same histologic trait as our PB-NPM1 mice, consistent with an inhibitory role of NPM1 toward Rb (Maddison et al., 2004b). In the future, it would be interesting to combine NPM1 overexpression to prostate specific p53 deletion to see if it will trigger aggressive neuroendocrine prostate cancer development and metastasis, as previously described for the Rb/p53 compound mutant or the TRAMP model (Gingrich et al., 1997; Zhou et al., 2006).

NPM1 overexpression results in a cyclin switch characterized by cyclin E overexpression and cyclin D1 downregulation as previously reported in TRAMP model of prostate cancer (Maddison et al., 2004a). This observation may reflect a quick G1/S transition in cells overexpressing NPM1, subsequent to E2F1 activation. Indeed, cyclin D1 down-regulation occurs at early S phase and is necessary for DNA replication (Fukami-Kobayashi and Mitsui, 1999; Pagano et al., 1994). Ultimately, E2F1-dependant cyclin E and Skp2 overexpression promote p27kip1 phosphorylation, ubiquitination and proteasomal degradation. We have observed a strong decrease of p27kip1 protein abundance in conjunction with a strong increase of both cyclin E protein and mRNA levels. This observation is very interesting from a clinical point of view since it has long been shown that p27kip1 loss is associated with prostate cancer aggressiveness, metastasis and treatment failure (Tsihlias et al., 1998; Yang et al., 1998). Therefore,

NPM1 overexpression could set up a fertile ground for prostate cancer progression. It is now important to check the correlation between NPM1, p27kip1 and cyclin E expression in clinical samples of ptostate tumors and to correlate them to the tumor grade, the TNM status and the therapeutic response. These investigations are currently underway to verify whether NPM1 would be ste up as new prognosis factor for prostate cancer progression and resistance to therapy.

## References


Assoian, R.K., and Zhu, X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. Curr. Opin. Cell Biol. *9*, 93–98.

Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell *56*, 379–390.

Chu, I.M., Hengst, L., and Slingerland, J.M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. Nat. Rev. Cancer *8*, 253–267.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., et al. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N. Engl. J. Med. *352*, 254–266.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int. J. Cancer *127*, 2893–2917.

Fukami-Kobayashi, J., and Mitsui, Y. (1999). Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. Exp. Cell Res. *246*, 338–347.

Gingrich, J.R., Barrios, R.J., Kattan, M.W., Nahm, H.S., Finegold, M.J., and Greenberg, N.M. (1997). Androgen-independent Prostate Cancer Progression in the TRAMP Model. Cancer Res. *57*, 4687–4691.

Grasso, C.S., Wu, Y.-M., Robinson, D.R., Cao, X., Dhanasekaran, S.M., Khan, A.P., Quist, M.J., Jing, X., Lonigro, R.J., Brenner, J.C., et al. (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature *487*, 239–243.

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

Johnson, A., and Skotheim, J.M. (2013). Start and the restriction point. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 717–723.

Léotoing, L., Meunier, L., Manin, M., Mauduit, C., Decaussin, M., Verrijdt, G., Claessens, F., Benahmed, M., Veyssière, G., Morel, L., et al. (2008). Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. Oncogene *27*, 2858–2867.

Lindström, M.S. (2011). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochem. Res. Int. *2011*, 195209.

Liu, X., Liu, Z., Jang, S.-W., Ma, Z., Shinmura, K., Kang, S., Dong, S., Chen, J., Fukasawa, K., and Ye, K. (2007). Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 9679–9684.

Liu, Y., Zhang, F., Zhang, X.-F., Qi, L.-S., Yang, L., Guo, H., and Zhang, N. (2012). Expression of nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. J. Biomed. Sci. *19*, 53.

Lopergolo, A., and Zaffaroni, N. (2009). Biomolecular markers of outcome prediction in prostate cancer. Cancer *115*, 3058–3067.

Loubeau, G., Boudra, R., Maquaire, S., Lours-Calet, C., Beaudoin, C., Verrelle, P., and Morel, L. (2014). NPM1 silencing reduces tumour growth and MAPK signalling in prostate cancer cells. PloS One *9*, e96293.

Maddison, L.A., Huss, W.J., Barrios, R.M., and Greenberg, N.M. (2004a). Differential expression of cell cycle regulatory molecules and evidence for a “cyclin switch” during progression of prostate cancer. The Prostate *58*, 335–344.

Maddison, L.A., Sutherland, B.W., Barrios, R.J., and Greenberg, N.M. (2004b). Conditional Deletion of Rb Causes Early Stage Prostate Cancer. Cancer Res. *64*, 6018–6025.

Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A.C., Draetta, G.F., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. Genes Dev. *13*, 1181–1189.

Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., Schmid, H.-P., Van der Kwast, T., Wiegel, T., Zattoni, F., et al. (2011). EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. Eur. Urol. *59*, 572–583.

Nigg, E.A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. Curr. Opin. Cell Biol. *5*, 187–193.

Nozawa, Y., Van Belzen, N., Van der Made, A.C., Dinjens, W.N., and Bosman, F.T. (1996). Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. J. Pathol. *178*, 48–52.

Okuwaki, M. (2008). The Structure and Functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein. J. Biochem. (Tokyo) *143*, 441–448.

Pagano, M., Theodoras, A.M., Tam, S.W., and Draetta, G.F. (1994). Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. Genes Dev. *8*, 1627–1639.

Qing, Y., Yingmao, G., Lujun, B., and shaoling, L. (2008). Role of Npm1 in proliferation, apoptosis and differentiation of neural stem cells. J. Neurol. Sci. *266*, 131–137.

Seethammagari, M.R., Xie, X., Greenberg, N.M., and Spencer, D.M. (2006). EZC-Prostate Models Offer High Sensitivity and Specificity for Noninvasive Imaging of Prostate Cancer Progression and Androgen Receptor Action. Cancer Res. *66*, 6199–6209.

Shandilya, J., Swaminathan, V., Gadad, S.S., Choudhari, R., Kodaganur, G.S., and Kundu, T.K. (2009). Acetylated NPM1 Localizes in the Nucleoplasm and Regulates Transcriptional

Activation of Genes Implicated in Oral Cancer Manifestation. Mol. Cell. Biol. *29*, 5115–5127.

Sharifi N, Gulley JL, and Dahut WL (2005). ANdrogen deprivation therapy for prostate cancer. JAMA *294*, 238–244.

Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M., and Clurman, B.E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. Genes Dev. *11*, 1464–1478.

Shields, L.B., Gerçel-Taylor, C., Yashar, C.M., Wan, T.C., Katsanis, W.A., Spinnato, J.A., and Taylor, D.D. (1997). Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. J. Soc. Gynecol. Investig. *4*, 298–304.

Subong, E.N., Shue, M.J., Epstein, J.I., Briggman, J.V., Chan, P.K., and Partin, A.W. (1999). Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. The Prostate *39*, 298–304.

Takemura, M., Sato, K., Nishio, M., Akiyama, T., Umekawa, H., and Yoshida, S. (1999). Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. J. Biochem. (Tokyo) *125*, 904–909.

Tanaka, M., Sasaki, H., Kino, I., Sugimura, T., and Terada, M. (1992). Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. Cancer Res. *52*, 3372–3377.

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. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell *18*, 11–22.

Tsihlias, J., Kapusta, L.R., DeBoer, G., Morava-Protzner, I., Zbieranowski, I., Bhattacharya, N., Catzavelos, G.C., Klotz, L.H., and Slingerland, J.M. (1998). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. Cancer Res. *58*, 542–548.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. *36*, 131–149.

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

Yang, R.M., Naitoh, J., Murphy, M., Wang, H.J., Phillipson, J., deKernion, J.B., Loda, M., and Reiter, R.E. (1998). Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. J. Urol. *159*, 941–945.

Zhang, J., Thomas, T.Z., Kasper, S., and Matusik, R.J. (2000). A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. Endocrinology *141*, 4698–4710.

Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Corney, D.C., Wang, W., Goodrich, D.W., Roy-Burman, P., and Nikitin, A.Y. (2006). Synergy of p53 and Rb Deficiency in a Conditional Mouse Model for Metastatic Prostate Cancer. Cancer Res. *66*, 7889–7898.

# ARTICLE 2

**Transcriptional and posttranscriptional regulation of NPM1 gene expression by mTOR.**

Rafik Boudra, Rosyne Lagrafeuille, Corinne Lours-Calet, Cyrille de Joussineau, Gaëlle Loubeau, Cédric Chaveroux, Jean-Paul Saru, Silvère Baron, Laurent Morel and Claude Beaudoin.

*Soumis à Cell Cycle.*

La protéine kinase mTOR est impliquée dans la croissance cellulaire en régulant l'activité de cibles cytoplasmiques importantes dans le contrôle de la synthèse protéique ou encore du métabolisme glucidique et lipidique. Plus récemment, des études ont rapporté un rôle nucléaire de mTOR dans le contrôle de l'expression génique. De par ses multiples fonctions trophiques, l'hyperactivation de mTOR confère un avantage sélectif aux cellules en prolifération, et elle est fréquemment observée dans les tumeurs humaines, parmi lesquelles on retrouve le cancer de la prostate. Dans cette étude, nous montrons grâce à l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris invalidés pour PTEN que mTOR stimule l'expression de NPM1. La perte de PTEN induit une hyperactivation de mTOR et l'accumulation de l'ARNm ainsi que de la protéine NPM1. Cette effet est spécifique de mTOR puisque un traitement à la rapamycine ou la transfection d'ARN interférents dirigés contre mTOR dans des cellules sauvages ou invalidées pour PTEN réduit fortement l'accumulation des ARNm ainsi que des protéines NPM1. Le contrôle de l'expression de NPM1 par mTOR s'exerce à deux niveaux. D'une part, nos expériences d'immunoprécipitation de chromatine et de transfection transitoire avec des gènes rapporteurs de type luciférase indiquent que mTOR se fixe sur le promoteur de NPM1 et contrôle l'activité de ce dernier. D'autre part, la déstabilisation rapide de l'ARNm de NPM1 après inhibition de la signalisation mTOR par un traitement à la rapamycine suggère un mécanisme de dégradation active. En effet, nous avons observé grâce un traitement de nos cellules avec un inhibiteur de la transcription (actinomycine D) que l'ARNm de NPM1 possède une demi-vie longue. De plus, l'effet de la rapamycine est renversé par un traitement conjoint à l'actinomycine D ce qui suggère que mTOR inhibe l'expression d'un gène dont le produit est impliqué dans la dégradation de l'ARNm de NPM1. En utilisant des souris invalidées pour le suppresseur de tumeur PTEN

spécifiquement dans l'épithélium prostatique, nous avons confirmé le contrôle de l'expression de NPM1 par mTOR *in vivo* dans un contexte néoplasique. Enfin, nous avons montré par transfection d'ARN interférents que l'expression de NPM1 est nécessaire à la prolifération des cellules PTEN-/-. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que mTOR régule l'expression de NPM1 par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels, et placent cette dernière comme un effecteur en aval de la signalisation PI3K/AKT/mTOR pour contrôler la prolifération cellulaire.

# Transcriptional and posttranscriptional regulation of NPM1 gene expression by mTOR.

**Short title**: mTOR regulates NPM1 gene expression.

Rafik Boudra[1,2,3], Rosyne Lagrafeuille[1,2,3,†], Corinne Lours-Calet[1,2,3], Cyrille de Joussineau[1,2,3], Gaëlle Loubeau[1,2,3], Cédric Chaveroux[4], Jean-Paul Saru[1,2,3], Silvère Baron[1,2,3], Laurent Morel[1,2,3] and Claude Beaudoin[1,2,3*]

[1]Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, GReD, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France;

[2]CNRS, UMR6293, GReD, F-63001 Clermont-Ferrand, France;

[3]Inserm, UMR1103, GReD, F-63001 Clermont-Ferrand, France;

[4]Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France;

[†]Current affiliation: CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

[*]Correspondance to: Claude Beaudoin; CNRS UMR6293-GReD, Campus Universitaire des Cézeaux, 10 Avenue Blaise Pascal, Aubière 63178, France. Tel.: (+33)473405340; Fax.: (+33)473407042; Email: Claude.Beaudoin@univ-bpclermont.fr

**Keywords:** mTOR, NPM1, gene expression, cell proliferation, cancer.

**Abbreviations:** mTOR, mammalian target of rapamycin; NPM1/B23, nucleophosmin; MEF, murine embryo fibroblast; siRNA, small interfering RNA.

**Abstract**

The mammalian target of rapamycin (mTOR) plays essential roles in the regulation of a wide array of growth-related processes such as protein synthesis, cell sizing and metabolism in both normal and pathological growing conditions. These functions of mTOR are thought to be largely a consequence of its cytoplasmic activity in regulating translation rate, but accumulating data now highlight supplementary role(s) for this serine/threonine kinase within the nucleus. Indeed, the nuclear activities of mTOR are currently associated with the control of protein biosynthetic capacity through its ability to regulate the expression of gene products involved in the control of ribosomal biogenesis and proliferation. Using primary murine embryo fibroblasts (MEFs), we observed that cells with overactive mTOR signaling displayed higher abundance for the growth-associated NPM1 protein, in what represents a novel mechanism of NPM1 gene regulation. We show that NPM1 gene expression is dependent on mTOR as demonstrated by treatment of wild-type and Pten inactivated MEFs cultured with rapamycin or by transient transfections of small interfering RNA directed against mTOR. In accordance, the mTOR kinase localizes to the *NPM1* promoter gene *in vivo* and it enhances the activity of a *NPM1*-luciferase reporter gene providing an opportunity for direct control. Interestingly, rapamycin did not dislodge mTOR from the *NPM1* promoter but rather strongly destabilized the NPM1 transcript through a posttranscriptional mechanism of mRNA decay. Finally, we also show that NPM1 expression is required to promote mTOR-dependent cell proliferation. Moreover, NPM1 mRNA was found up-regulated and sensitive to rapamycin in a prostate-specific *Pten*-deleted mouse model of cancer. We therefore proposed a model whereby mTOR is closely involved in the transcriptional and posttranscriptional regulation of NPM1 gene expression with important implications for our understanding of how this pathway operates to regulate proliferation in development and diseases including cancer.

## Introduction

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a highly conserved serine/threonine protein kinase that regulates cell growth and metabolism in response to nutrient availability, growth factor and cellular stresses.[1, 2] It belongs to the family of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-related kinases (PIKKs) and operates in two functionally distinct cellular complexes termed mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) which associate respectively the regulatory-associated protein of mTOR (raptor) and the rapamycin-insensitive companion of mTOR (rictor).[3, 4] Once activated, mTORC1 promotes cell growth through enhanced translation resulting from activation of the ribosomal S6 subunit kinase (S6K) and inactivation of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein (4E-BP1).[5] This growth-promoting activity which is further strengthened by mTORC2-dependent functions is now described too for its ability to activate a transcriptional program that is critical for protein synthesis and cell growth. Therefore, by binding to the promoter of RNA polymerase I and III transcribed genes, mTOR increases the abundance of ribosomal RNAs (rRNA) and transfer RNAs (tRNA) leading to enhanced protein biosynthetic capacity and increased cell growth.[6]

More recent studies have identified additional gene regulatory networks downstream of mTORC1 complex that might activate specific cellular processes that are likely to contribute to human physiology and disease. Using a genome-wide scale analysis, Chaveroux et al.[7] have demonstrated that mTOR occupies many regulatory region on chromatin obtained from mouse livers with a strong enrichment at the proximal promoter of the *NPM1* gene. This latter encodes the abundant and ubiquitously expressed nucleophosmin protein (NPM1 also known as B23, numatrin and NO38) which has been originally identified as a non-ribosomal nucleolar phosphoprotein found at high levels in the granular regions of the nucleus.[8] Its expression is found to be more abundantly expressed in proliferating cells than in resting cells

and is increased markedly and promptly in association with mitogens[9, 10] or certain cellular stresses.[11-13] Like mTOR, NPM1 expression is altered in several different types of cancer and is demonstrated to be a positive regulator of ribosome biogenesis, cell proliferation and resistance to cell death. [14] To date, the regulatory mechanisms involved in the regulation of the *NPM1* gene expression are not understood in detail but experimental evidence have demonstrated that transcription factors such as YY1 and Myc can both bind directly to the 5' region of the *NPM1* gene. [15, 16] In addition to the activity of the mTOR kinase to control mitochondrial oxidative activities and metabolism, [17, 18] its recruitment to the *NPM1* promoter region prompted us to address whether mTOR targets the *NPM1* gene to modulate its expression at a transcriptional level. Besides, it is currently unknown to which extent these two key regulators of cell proliferation might interact to regulate common biological functions with implications in diseases and cancers.

In this study, we demonstrate that the mRNA and the protein levels of NPM1 are elevated in fibroblasts with hyperactive mTOR signaling in comparison with wild-type fibroblasts. Furthermore, we show that rapamycin inhibition and RNA silencing of mTOR reduce NPM1 expression indicating that a mTOR-dependent transcriptional complex might be involved in this control. By using a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay in conjunction with a reporter luciferase assay, our data indicate that mTOR binds the *NPM1* target gene at the promoter to regulate its expression. Finally, the finding that NPM1 levels were increased in prostate tumors of mutant mice with genetic inactivation of Pten raised the possibility that hyperactive mTOR directly leads to elevated levels of NPM1 perhaps due to an increased requirement of ribosomal synthesis in cancer cells. Therefore, our data may help to clarify the mechanisms underlying the transcriptional regulation of the *NPM1* gene and may shed light on the ability of mTOR to control NPM1 functions in particular regarding the effect of mTOR in increasing ribosomal biosynthesis during proliferation and neoplastic transformation.

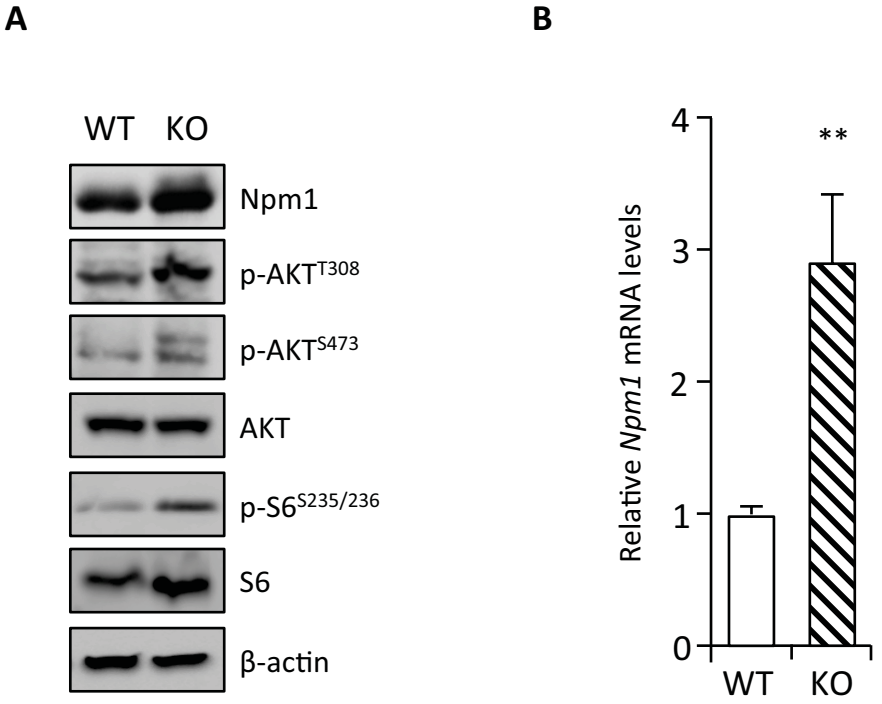



**Figure 1. NPM1 mRNA and protein levels are enhanced in MEF cells inactivated for Pten.** (A) Thirty µg of total protein extracts from wild-type (WT) and Pten knockout (KO) mouse embryonic fibroblasts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with specific antibodies as indicated (n=3). (B) RT-qPCR analysis of NPM1 mRNA accumulation in WT and Pten KO MEFs (normalized to 1.0 relative to 36b4 mRNA gene for control WT MEFs). Bar graphs show the mean level of three independent experiments (±SEM) and a student's test was performed to assess statistical significance. **$p<0.001$

## Results

***Pten-null fibroblasts display higher expression levels of NPM1.***

Despite the multitude of NPM1 functions in a plethora of biological processes, the molecular mechanisms of NPM1 gene activation are still poorly understood. Recent data emerging from genome-wide chromatin immunoprecipitation analyses indicate that the highly conserved mTOR protein kinase localized at many regions surrounding the transcriptional starting site of genes with a significant enrichment at the NPM1 promoter gene.[7] This suggests that mTOR may regulate NPM1 expression and prompted us to address the relationship between these two proteins. For this purpose, we have taken advantage of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking Pten since these cells display increased Akt Thr-308 phosphorylation levels due to overactive phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. In turn, this led to full activation of mTOR complexes as evidence by the feedback up-regulation of phospho-Akt at serine 473 and elevated phosphorylation levels of the downstream S6 ribosomal (Ser235/236) target protein. Immunoblot analyses of cell lysates show that *Pten*-null mouse embryo fibroblasts had increased levels of NPM1 protein compared with their wild-type counterparts (Fig 1A). This change in protein abundance is correlated with a 2.5- to 3.0-fold increase in NPM1 mRNA levels after normalization to the house keeping gene 36b4 ($P < 0.01$) by qRT-PCR assays (Fig 1B). Therefore, these data indicate that enhanced activation of mTOR due to sustained Akt signaling in MEFs lacking Pten may contribute to regulate positively NPM1 at a transcriptional and/or posttranscriptional level.

***NPM1 expression is affected by mTOR inhibition.***

In an attempt to define if mTOR was responsible for nucleophosmin accumulation, we treated wild-type and Pten negative MEF cultures with 20 nM of the allosteric mTOR inhibitor rapamycin for 24 hours and compared the amounts of NPM1 by western blotting. This long-

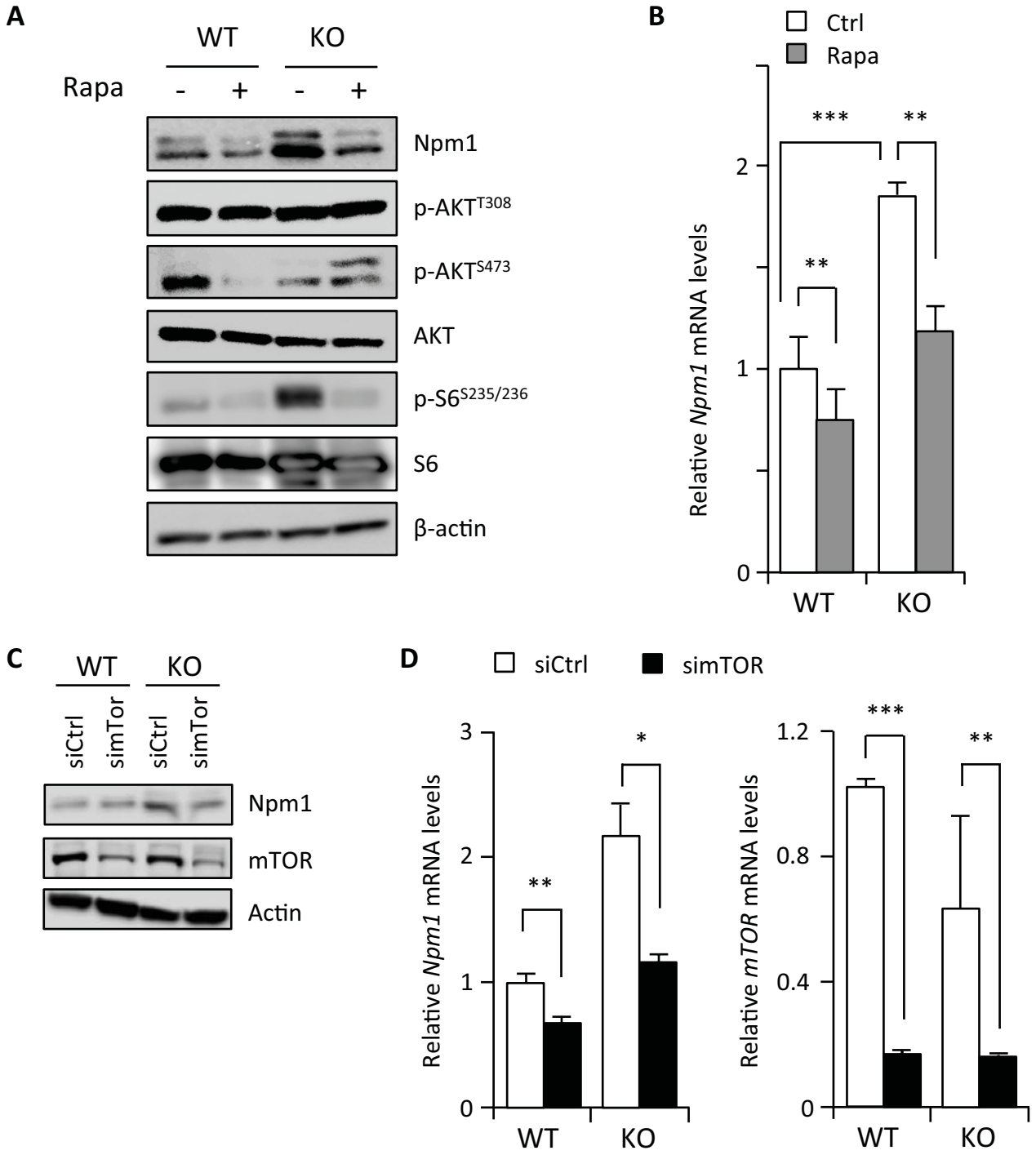



**Figure 2. Inhibition of mTOR signaling reduces NPM1 expression in MEFs.** (A) Cultured wild-type (WT) and Pten knockout (KO) cells were treated for 24 hours in the absence or the presence of 20 nM rapamycin. Cell extracts were prepared and aliquots containing 30 µg of total proteins were resolved by SDS-PAGE for proteins visualization by Western blotting. (B) Cells were incubated as above except that rapamycin was added to the medium for 4 hours. NPM1 and mTOR expression levels were then assayed by RT-qPCR from mRNA isolated from WT and KO MEFs for Pten and levels were normalized by comparison to the 36b4 mRNA. Bar graphs show the mean levels of at least three independent experiments (±SEM) of qPCR-amplified NPM1 (normalized to 1.0 for control untreated WT MEF cells). (C) Western blot analysis of total NPM1 and mTOR in MEF cells treated with a pool of siRNA (50 nM) for 48 hours against mTOR. β-actin levels are shown as a loading control. (D) RT-qPCR analysis of NPM1 expression after depletion of mTOR. Errors bars represent mean ± SEM normalized to WT untreated cells (n=3). *p <0.01.

term treatment should likely inhibit both mTOR complexes since previous studies have shown that rapamycin binds to the intracellular protein FKBP12 to generate a drug-receptor complex that then tethers a large fraction of the free mTOR molecules to inhibit the kinase activity of mTORC1 and suppress the assembly and function of mTORC2.[19] Unphosphorylated S6 was used as a loading control and phosphos-S6 (Ser235/236) showed that mTORC1 signaling, which stimulates phosphorylation of the ribosomal S6 protein at this site, was inhibited by rapamycin. The experiment in Figure 2A clearly showed that addition of rapamycin compared to vehicle slightly reduced NPM1 protein levels in wild-type MEFs as well as in Pten-deleted MEFs although at a greater extent (50% inhibition, $P = 0.09$) that might be related to the higher sensitivity to mTOR inhibition. Unlike a recent report,[20] this fall in NPM1 abundance is likely to occur in part at the transcriptional level since NPM1 mRNA levels are reduced by 25% ($p < 0.01$) and 40% ($p < 0.001$) respectively in wild-type and Pten-null MEFs after 4 h of treatment with 20 nM rapamycin (Fig 2B). As shown in Figure 2A, prolonged treatment with rapamycin did not lead to the loss of phospho-Akt (S473) in MEF with PTEN loss (compare lanes 3 and 4) and indicates that the assembly of mTORC2 might not be completely blocked in these conditions. Thus, we asked if it is possible to reduce further the amount of NPM1 mRNA by lowering total mTOR to decrease both mTORC1 and mTORC2 complexes. Indeed, a knockdown of mTOR in Pten-deficient MEFs did no trigger a stronger decrease in NPM1 mRNA levels and protein abundance although mTOR mRNA abundance is decreased by more than 80% (Fig. 2C and D). Therefore, our data are consistent with a transcriptional and/or posttranscriptionnal regulation of the NPM1 gene by mTOR complexes.

**mTOR binds to the Npm1 promoter and modulates its transcriptional activity.**

To confirm the above observations, we examined the DNA binding activity of mTOR in MEF cultures using standard chromatin immunoprecipitation (ChIP). As shown in Figure 3, mTOR

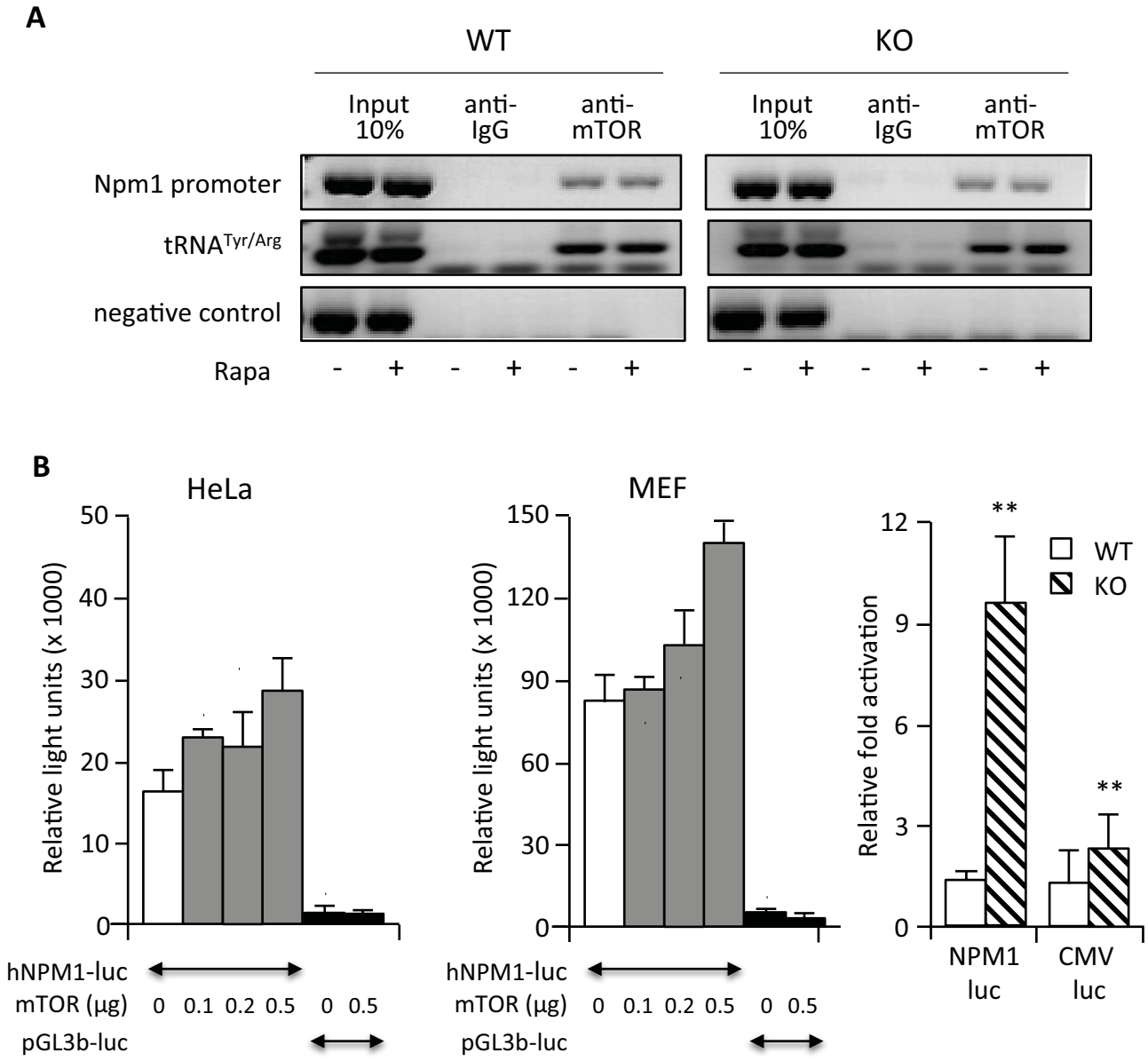



**Figure 3. mTOR binding and activation of Npm1 promoter.** (A) Endogenous mTOR is associated with Npm1 promoter region in a rapamycin-independent manner. ChIP assays were conducted using a mTOR antibody in WT and Pten KO MEFs in the absence or the presence of 20 nM rapamycin for 4 hours. Binding of mTOR to Npm1 promoter and Pol-III transcribed $tRNA^{Arg/Tyr}$ were determined with PCR primer sets described in Material and Methods. Rabbit IgG were used as negative control. (B) Npm1 is a transcriptional target of mTOR. HeLa (left) and MEF (middle) cell lines were cotransfected for 48 hours with 200 ng of hNPM1-luc plasmid encoding the luciferase under the control of the human NPM1 promoter and increasing amounts of a pCMV-Flag mTOR vector (100, 200 and 500 ng). The luciferase activity measured in WT MEF cells transfected with NPM1-luc or CMV-luc was normalized to 1 and a relative fold-induced luciferase activity was then calculated for *Pten* KO MEFs in the same experimental conditions (right). Error bars represent ± SEM (n=3; asterisk, $p<0.05$; two asterisks, $p<0.01$; three asterisks, $p<0.001$).

immunoprecipitated DNA was analyzed with PCR primer pairs spanning the NPM1 promoter region and the pol III-transcribed $tRNA^{Arg/Tyr}$ positive control gene (see Materials and Methods). In lines with previous reports, mTOR specifically targets the pol-III transcribed $tRNA^{Arg/Tyr}$ gene, but not a non-mTOR-bound genomic region (negative control) thus confirming the specificity of the reaction. Examination of multiple experiments confirmed the association of endogenous mTOR to the upstream region of the NPM1 gene in wild-type MEFs cultured in normal growth conditions (Fig. 3A, left). This region encompasses the peak found by Chaveroux *et al*. at -425 from the transcription starting site and seems to be specific of the ChIP assay since no signal was detected with control IgG. Interestingly, Pten loss did not substantially increased mTOR occupancy since we detected equivalent amount of mTOR associated at this promoter (Fig 3A, right). Moreover, treatment with rapamycin did not reduce the level of mTOR occupancy at the NPM1 promoter region suggesting that mTOR binding is insensitive to inhibition with rapamycin.

The presence of mTOR at NPM1 template may allow it to regulate transcription of this gene directly. This possibility was explored using the human NPM1 promoter 5'flanking region from -1200 to +87 fused to the luciferase reporter gene. The resulting hNPM1-luciferase construct was transiently transfected into HeLa and MEF cells either alone or in combination with increasing amounts of mTOR expression vector. Following transfection, cells were maintained in serum-free media and 24 h later, cells were harvested and luciferase expression was measured. Ectopic expression of mTOR in HeLa and MEF cells nearly double the NPM1 promoter activity in a dose dependent manner in our experiment conditions (Fig. 3B, left and middle). In addition, we found that the luciferase activity was strongly enhanced in *Pten*-null MEFs (9.5-fold, $p < 0.01$) in comparison with wild-type MEFs (Fig 3B, right). In comparison, cells were transfected with a CMV-driven luciferase expression vector (pcDNA4/T0-luc provided by H Kleinert). As shown in Fig. 3B (left panel) the activity from the hNPM1-

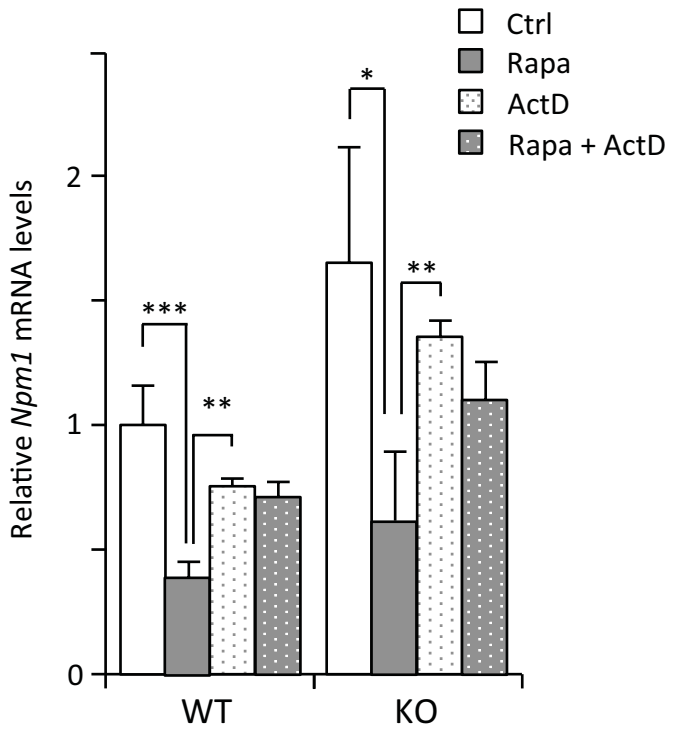



**Figure 4. mTOR signaling inhibition by rapamycin increase Npm1 mRNA turnover.** Total mRNA from early log phase growing MEFs were used for qPCR analysis of Npm1 expression. Cells were treated with actinomycin D (5 µg/ml), rapamycin (20 nM), or rapamycin plus actinomycin D as indicated. Cells were harvested after 10h and total mRNA was extracted for NPM1 expression evaluation. The mRNA level in WT MEFs alternatively treated with vehicle was considered as 100%. Data are representative of 3 independent experiments and expressed as fold change relative to WT vehicle-treated MEFs, taken as calibrator for comparative quantitation analysis of mRNA levels. Each sample was measured in triplicate and bar graphs represent mean ± SEM (*$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$)

luciferase reporter gene in *Pten* deleted MEFs was 4.6-fold more stimulated when compared to that of the CMV-luciferase control gene ($p = 0.01$). This latter result is contrasting with the data from our ChIP assays since we did not observed any substantial increase in the association of mTOR with the endogenous Npm1 promoter in MEF cells inactivated for *Pten* (Fig. 3A). Nevertheless, these results clearly indicate that mTOR increases the transcriptional activity of the NPM1 promoter although we cannot conclude whether this association requires other transcriptional co-regulators or component of the mTORC1/2 complexes.

**Rapamycin regulates NPM1 steady-state mRNA levels.**

The work described above shows that rapamycin caused a rapid significant decreased in NPM1 mRNA levels in both wild-type and $Pten^{-/-}$ MEF cells at 4 h (Fig. 2A) suggesting that inhibition of mTOR signaling might affect gene transcription and/or mRNA turnover to regulate NPM1 gene expression. This latter assumption is supported by several lines of evidence showing that signaling through mTOR promotes mRNA decay.[21] To test this possibility, the levels of NPM1 mRNA were thus quantified by RT-qPCR in MEF cells in the presence of the RNA polymerase II inhibitor actinomycin D (ActD) or with rapamycin. As shown in Figure 4, mTOR inactivation by rapamycin down-regulates NPM1 mRNA by around 60% in both wild-type ($0.41 \pm 0.04$ of the control vehicle value, $p < 0.001$) and Pten deleted MEFs ($0.64 \pm 0.29$ of the control vehicle value, $p < 0.05$). In contrast, ActD alone only decreased mRNA levels from 25% in both cell lines suggesting that inhibition with rapamycin strongly upregulates NPM1 mRNA turnover. Of note, addition of ActD to cells treated with rapamycin prevents the effect observed with rapamycin alone. Thus the enhanced turnover of NPM1 mRNA in mTOR-inhibited cells can be suppressed by inhibition of RNA polymerase II transcription. This may reflect the need of a transcriptional event to recruit the general cellular mRNA degradation machinery to regulate NPM1 mRNA turnover.

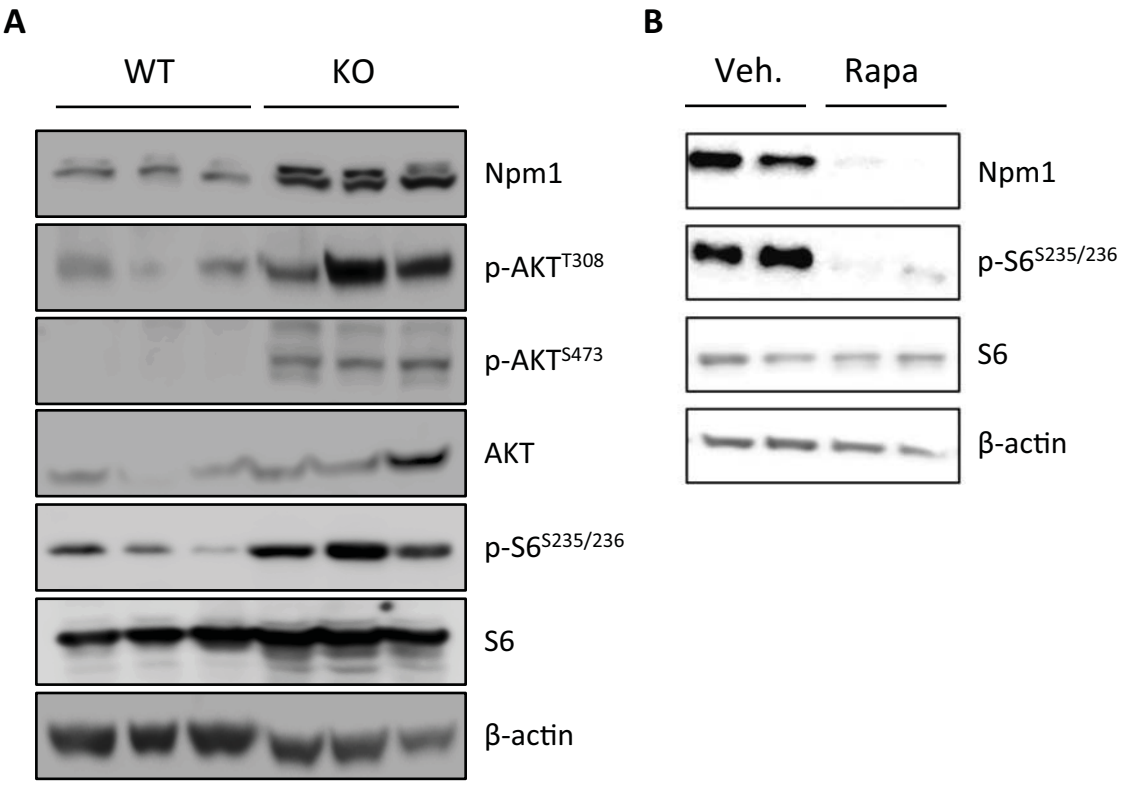



**Figure 5. Npm1 overexpression in mouse prostate tumors induced by *Pten* loss is sensitive to chronic mTOR inhibition by rapamycin.** (A) Homozygous *Pten* deletion increases Npm1 abundance in the mouse dorsolateral prostate gland lobe. Protein lysates were prepared from three month-old animals and were probed with the indicated antibodies by western immunoblotting. (B) Chronic mTOR inhibition decreases the abundance of Npm1 in *Pten*-null prostate cancer. Three-month old *Pten* conditional knockout mice were chronically administrated with either vehicle or rapamyscin (10mg/kg/day). After 4 days, protein levels in the anterior compartment of the *Pten*-null prostate lobe were separated by SDS-PAGE and assayed by western blotting using the indicated antibodies. Representative blots are derived from 2 different animals per group. Compared *Pten* knockout mice treated with vehicle (lanes 1 and 2) with rapamycin-treated animals lanes 3 and 4).

**NPM1 is a downstream effector of mTOR signaling with implication in prostate cancer.**

Our previous report that NPM1 is overexpressed in prostate cancer[22], together with the fact that mTOR serves a pivotal role in cancer suggest that these two proteins may be functionally link to regulate events involved in prostate cancer cell growth control. To answer this, we used the conditional murine *Pten* prostate cancer model with a constitutive activation of the Akt/mTOR signaling pathway in the prostate epithelium.[23] This model is greatly appropriate since it recapitulates the disease progression seen in humans with the formation of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Consistent with our findings in MEF cells with deletion of *Pten*, the abundance of the NPM1 protein is increased in prostate tumors of Pten$^{-/-}$ animals in conjunction with Akt activation and phosphorylation of the downstream mTOR effector S6 ribosomal protein (Fig. 5A). Of note, chronical administration for 4 days with rapamycin (10 mg/kg/day) almost completely inhibits the expression of NPM1 in the dorsolateral compartment of prostate gland of *Pten* knockout mice (Fig 5B, lanes 3-4 compared with lanes 1-2). The lack of phosphorylation of S6 protein in rapamycin-treated animals confirms that the mTOR pathway was efficiently blocked by our treatment and let us conclude that mTOR also regulates NPM1 expression *in vivo*.

One important remaining question is to know whether NPM1 acts as a downstream mediator of mTOR to promote cellular adaptation for growth. This questioning cannot be solved by deleting *Npm1* gene expression in the *Pten* knockout mice because it complete inactivation leads to embryonic lethality at mid-gestation[24], and no mouse model for conditional inactivation of *Npm1* is currently available. To circumvent this limitation, we have assessed the proliferation rate of wild-type and *Pten*$^{-/-}$ MEFs, non-silenced or silenced for Npm1, using the bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation cell-based assay. As shown in Figure 6, NPM1 silencing efficiency was near 90% compared to control cultures transfected with a non-specific control unrelated GFP siRNA sequence (Fig. 6A). Interestingly, the growth

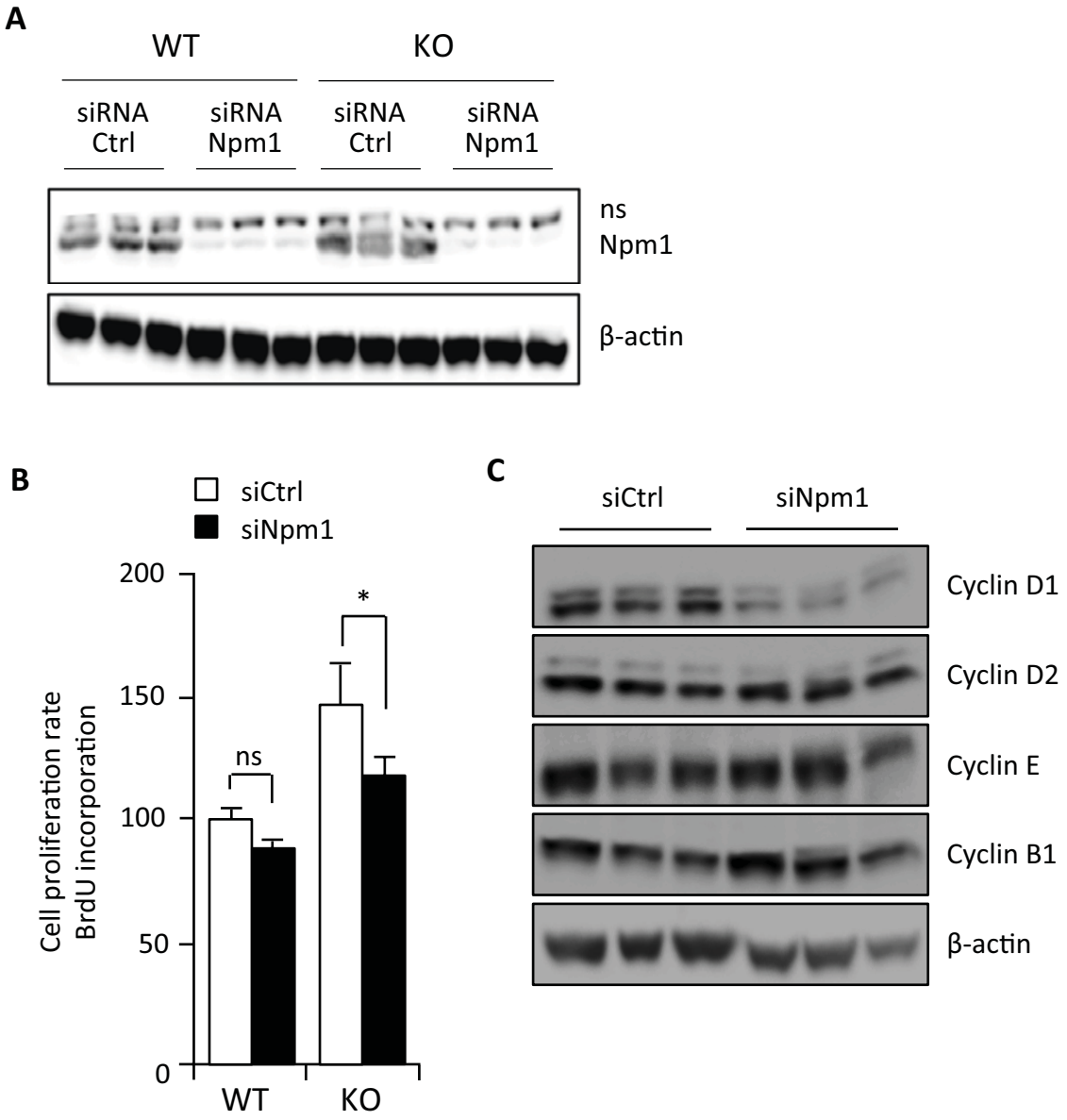



**Figure 6. Pten deletion-induced proliferation in MEFs with hyperactive mTOR requires NPM1.** (A) Exponentially growing MEFs were transfected with the NPM1 or control GFP (Ctrl) siRNAs. 24 hours after transfection with 50 nM NPM1 and Ctrl GFP siRNAs, whole-cell extracts were prepared and western blot was performed using antibodies against NPM1 and β-actin for loading control. (B) NPM1 depletion reverses Pten-loss induced hyper-proliferation of MEFs with hyperactive mTOR signalling. Wild-type and inactivated MEFs for PTEN were plated at a respective density of 17,5 x $10^3$ and 7,5 x $10^3$ cell per well into a 96-wells plate and were transfected 1 day later with either NPM1 and Ctrl GFP siRNAs. After 24 hours, medium was changed and the cell proliferation was assayed by using the BrdU reagent according to the *Material and Method*s. (C) NPM1 silencing decreased the upregulated Cyclin D1 protein level induced by Pten inactivation. MEFs deleted for *Pten* were transfected as above and total protein lysate of equal numbers of cells were subjected to Western blot analysis with antibodies to cyclin D1, cyclin D2, cyclin E, and cyclin B.

advantage of Pten$^{-/-}$ MEFs is significantly reduced after depletion of Npm1 (20% inhibition, $p < 0.05$) while NPM1 down-regulation had a moderate effect on the proliferation of control wild-type MEFs (Fig. 6B). When compared to control wild-type MEFs, NPM1 silencing prevents the growth enhancement induced by *Pten* loss. One possible explanation for this may reside in the decreased expression of cyclin D1 in *Pten* inactivated MEFs silenced for NPM1 (Fig. 6C). This is an interesting finding since Pten act as general negative regulator of cyclin D expression.[25] Indeed, inhibiting NPM1 in MEF cells with hyperactive AKT/mTOR signaling may thus contribute to counteract the increased expression of cyclin D1 in *Pten* inactivated MEFs and to restore cell cycle regulation in these cells. Collectively, these results suggest that NPM1 may function downstream of mTOR to coordinate mitogenic signals to control cell growth and cell-cycle progression.

## Discussion

Signaling through the mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates many diverse cellular processes, especially those contributing to cell growth and proliferation. In the past couple of years, many important advances have been made in identifying new components of the mTOR network and in further elucidating connections between known components. In the present study, we provide evidence that Npm1 is a downstream signaling target of mTOR that may participate in the mTOR-dependent coordination of cell growth and cell-cycle progression in response to mitogenic signals. By actively shuttling between the nucleolus and cytoplasm, Npm1 was reported too to take on various distinct cellular functions. Indeed, the biological significance of Npm1 in ribosome biogenesis and transport, anti-apoptotic activity, the regulation of centrosome duplication and the regulation of tumors suppressors have been largely documented although its upstream regulatory mechanisms still represent a major gap to fulfill.[14, 26-28]

Using cell lines and animal models bearing a targeted deletion of the *Pten* gene that leads to hyperactivation of the mTOR signaling, we find that *Pten*-null MEFs display more Npm1 protein and mRNA than their wild-type counterpart. This increase is also observed in the prostate gland of the conditional murine *Pten* cancer model indicating thus that active mTOR signaling pathway in prostate cancer cells might also impinge on Npm1 expression *in vivo*. In both situations, Npm1 enhanced expression is sensitive to rapamicyn inhibition of mTOR although our *in vitro* data show that mTOR association with the *Npm1* promoter is insensitive to rapamycin. Actually, it is not clear how this kinase acts to increase the transcriptional activity we observed toward the *Npm1* promoter and we cannot exclude that this later may serve to assemble competent transcriptional mTORC complexes onto chromatin. Of interest, the mTOR enriched 5' enhancer promoter region of *Npm1* includes a functional YY1-binding motif that has been already characterized.[15] It is thus tempting to suggest that mTOR might

control *Npm1* gene transcription through a YY1 transcriptional complex as reported for other genes that adapts the mitochondrial oxidative function in response to nutrients and hormonal signals.[17] This should be easily assess by testing the mTOR-YY1 interaction into chromatin to determine whether this interface constitute a key regulatory step to enhance *Npm1* gene expression when mTOR is hyperactive. Moreover, silencing YY1 as well as components of the TORC complexes namely the Raptor and Rictor proteins may provide additional valuable insights to unravel the mechanism of *Npm1* gene transcriptional activation by mTOR dependent complexes.

Interestingly, mTOR binds to promoters of RNA polymerase I- and III- transcribed genes and these associations with ribosomal DNA (rDNA) and transfer RNA (tRNA) enhancer regions are believed to be crucial to the protein synthetic capacity of the cell and its growth ability. By directly controlling *Npm1* gene expression, mTOR would allow the cell to connect nutrient and/or hormonal signals to activate ribosome biogenesis. This is of particularly interest because Npm1 was initially described as a ribosome chaperone or assembly factor that was found associate with pre-ribosomal RNA processing. In support of this notion, a fraction of soluble Npm1 interacts with pre-ribosomal 60S particles.[29] It facilitates cleavage of ribosomal RNA *in vitro* and acts as an endoribonuclease for the maturing rRNA transcript. [30, 31] Not surprisingly, inhibition of Npm1 thus results in a decrease in cell growth as a consequence of impaired processing of pre-rRNA to mature 28S rRNA and inhibition of ribosome subunit export from the nucleolus to the cytoplasm.[32, 33] Altogether, these observations support the notion of a functional coupling between mTOR and Npm1 to coordinate the manufacturing of ribosomes and our finding that rapamycin down-regulates Npm1 abundance may provide an explanation to understand why mTOR signaling inhibition interferes with the processing of rRNA as recently noted by Iadevaia et al.[34]

The regulation of *Npm1* mRNA turnover we have reported in this study constitutes an unexpected finding that raises important questions in regards to the specific elements within the *Npm1* mRNA that controls its stability and the cytoplasmic mRNA degradation machinery that might be activated when mTOR pathway is inhibited. In fact, multiples mRNA were demonstrated to be destabilized after treatment with rapamycin in yeast[21] and our findings now define Npm1 as a new potential target of the mTOR regulated mRNA decay. From our complementary experiments, *Npm1* mRNA destabilization is unlikely to occur through the AU-rich-mediated decay machinery which has been recently described by Cammas et al.[35] While in muscle cells the AU-rich elements (AREs) located at the 3' untranslated region (3'-UTR) sequence of the *Npm1* mRNA were shown to participate to the posttranscriptional downregulation of the *Npm1* gene expression, inhibition of mTOR by rapamycin did not destabilizes a Renilla luciferase reporter gene fused to the *Npm1*-3'-UTR sequence (Rluc-NPM-3' provided by A Cammas) in transiently transfected MEF cells (not shown). This allow us to conclude that the destabilization of *Npm1* mRNA may be regulated through another mechanism of mRNA decay and the actinomycin D-mediated stabilization of *Npm1* mRNA in presence of rapamycin suggests the need of a pol II-dependent transcription event to control *Npm1* mRNA stability. One attracting possibility is the transcriptional repression of antisense non-coding RNA (ncRNA) by mTOR dependent complexes. This hypothesis fits well with our data, since inhibition of mTOR by rapamycin could relief the transcriptional repression of ncRNAs and allow their complementary association with *Npm1* mRNA for targeted degradation. In this sense, mRNA degradation by microRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA) and large intergenic non-coding RNA (lncRNA) all appears as plausible possibilities and inhibition of pol-II transcription by actinomycin D should stabilize *Npm1* mRNA in presence of rapamycin. This is a very interesting issue to address and further works

is required to completely understand how mTOR pathway is post-transcriptionally regulating *Npm1* gene expression.

Nevertheless, these informations combined with the results we provided here may have important implications for cancer biology since mTOR is a critical effector of cell-signaling pathways which is commonly deregulated in human cancers. This is particularly the case in prostate cancer where several molecules within the AKT/mTOR signaling pathway are altered during prostate cancer progression with potential diagnostic markers including PTEN, p-AKT, and mTOR.[36, 37] In addition, mTOR signaling molecules have been specially proposed as a central player in prostate cancer because of their influence on cell growth capacities.[38] The general belief is that activated mTOR may provide certain tumors cells with a growth advantage by promoting protein synthesis, which is the best-described function of mTOR. By regulating *Npm1* gene expression through transcriptional and posttranscriptional mechanisms, increased mTOR activity may lead to the enhance Npm1 expression that has been already reported by us and others in human prostate cancer.[22, 39] It is currently unknown whether deregulated mTOR and Npm1 are associated in clinical samples of prostate cancer but it is tempting to speculate that mTOR might stabilize *Npm1* mRNA level to stimulate cell growth by regulating protein synthesis and cell cycle progression. The increased abundance of Npm1 in *Pten* knockout mouse prostate cancer model is in good agreement with this assumption and the possibility to restore cell cycle progression in *Pten* inactivated MEF cells silenced for Npm1 further strengthen its functional role as a downstream effector of mTOR signaling.

Collectively, our results suggest that mTOR is closely involved in the regulation of *Npm1* gene expression with potential implication for prostate cancer therapies that may benefit from a better understanding of the mTOR signaling pathway to identify new molecule targets to inhibit in prostate cancer progression and the evolving treatment landscape of resistant prostate cancer.

## Materials and Methods

**Chemicals and biochemicals.**

Life Technologies (Cergy Pontoise, France) supplies the Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, cat#41965), glutamine (cat#25030), antibiotics (Pen/Strep, cat#15140), DPBS 10X (cat#14200). Fetal bovine serum was obtained from Biowest (cat#51810). Rapamycin and the non-ionic emulsifier Cremephor EL were respectively purchased from LC Laboratories (#catR5000) and Sigma-Aldrich (#catC5135). Goat polyclonal anti-NPM1 (C-19, sc-6013), rabbit polyclonal anti-cyclin D1 (M20, sc-718), rabbit polyclonal anti-cyclin E (M-20, sc-481), rabbit polyclonal anti-cyclin A (C-19, sc-596) and rabbit polyclonal anti-cyclin B1 (H-433, sc-752) were purchased from Santa Cruz Biotechnology; rabbit polyclonal anti-phospho-AKT Ser473 (ab81283) from AbCam, rabbit monoclonal anti-phospho-AKT Thr308 (cat#2965), rabbit monoclonal anti-AKT (cat#9272), rabbit monoclonal anti-S6 (cat#2217), rabbit polyclonal anti-phospo-S6 Ser235/236 (cat#2211), rabbit polyclonal anti-mTOR (cat#2972) from cell signaling; and rabbit polyclonal anti-βactin from Sigma-Aldrich (cat#A2066). The Npm1-luciferase reporter gene was obtained by cloning the PCR amplified DNA fragment from the -1200 to +86 promoter region of the human NPM1 gene (Forward primer, 5'-GATCGGTACCGTGACACAGGAGCTCTCAGAAAGG-3'; Reverse primer 5'-GATCCTCGAGACTTAGGTAGGAGAGAAGGCGGAC-3') directly into the *Kpn*I/*Xho*I sites of the pGL3-basic luciferase reporter vector (Promega, Charbonnière Les Bains, France).

**Cell cultures and transfections.**

Mouse Embryonic Fibroblast cells were cultured in 10 cm plates in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% $CO_2$. HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, as above. For transient transfections, 3 x $10^5$ HeLa cells per well were plated in 6 well-plates and the next day,

transient transfections were performed using the Metafecten procedure (Biontex Laboratories GmbH, Germany). For wild-type and Pten knockout MEFs, 2 x $10^5$ and 1 x $10^5$ cells/well were plated respectively and cells were transfected the next day according to the same procedure. After 12 h, the medium was replaced with fresh complete medium and 2 days later, cells were lysed and the luciferase activity was measured with the assay system from Yelen. For depletion of Npm1 and mTOR, we used the siGenome mouse Npm1 (cat#18148) and mouse mTOR (cat#56717) siRNA- SMART pools from Dharmacon (sequences available upon request).

**Animals and treatments.**

Mice were housed individually (24°C; light on 07.00-19.00h) and allowed free access to water and diet (A03 standard diet cat#U8200G10R from SAFE, Augy, France). When stated, animals received daily i.p. injections of either vehicle for the control or Sirolimus at a dose of 10mg/kg per day for 4 days. Mice were killed and tissues were freeze-clamped and stored at -80°C for further analyses. All animal care and experimental procedures were in accordance with the French guidelines for animal experimentation and were ethically approved by the local committee on Animal Experiments.

**RNA extraction and RT-qPCR analysis.**

Total RNA was isolated from MEF cells using the RNAzol method according to the manufacturer's instructions (Quantum, Montreuil-sous-bois, France). For cDNA synthesis, five hundred nanograms mRNA were reverse transcribed for 1 h at 42°C with 5pmoles of random hexamer primers, 200 units reverse transcriptase (MuMLV RT, Promega), 2mM dNTPs and 20 units RNAsin (Promega) as described. [40] A half microliter of one-tenth dilution of the cDNA was used in each quantitative PCR reaction. These were conducted with the

mouse *Npm1* sequence specific primers (Forward: 5'-GCAGGGGCAAAAGATGAGT-3'; Reverse: 5'-CAAAGCCCCCTAGGGAAAC). Each reaction was performed in triplicate in a final volume of 15µl with 0.75µl of the appropriate 20X probe mix and 7.5µl of PCR Mastermix (Precision-iC., PrimerDesign.co.uk). Relative mRNA accumulation was determined by the ΔΔCt method and *36b4* (Forward: 5'-GTCACTGTGCCAGCTCAGAA-3', Reverse: 5'-TCAATGGTGCCTCTGGAGAT-3') was used for quantative normalization of cDNA in each cell-derived sample. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test.

**Preparation of cell extracts and Western Blot analysis.**

Mouse tissues were harvested from three-month old wild-type and $PTEN^{LoxP/LoxP}$ ; PB-Cre4+ mice and immediately homogenized in ice cold NaCl buffer [0.42M NaCl, 20mM Hepes (pH 8.0), 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM EDTA, 25% glycerol, 0.1% NP40, 1mM PMSF, 1µg/ml apoprotinin, 1µg/ml leupeptin]. To make the whole-cell lysates, MEF cells were washed with 1X PBS and resuspended in ice cold NaCl buffer. After brief sonication on ice and clarification for 30 min at 15,000 x *g*, 40µg of proteins were resolved through SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with milk buffer [5% milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20] for 1 h and incubated with the indicated primary antibody in milk buffer overnight at 4°C. The membranes were washed three times with TBS-Tween 20 and then incubated 90 min with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or goat anti-rabbit immunoglobulin G secondary antibody (P.A.R.I.S biotech, Compiègne, France), followed by enhanced chemiluminescence (Santa Cruz Biotechnology) according to manufacturer's instruction.

**Cell proliferation assay.**

Cell proliferation was determined using the cell-based BrdU (Bromode oxyuridine) proliferation assay. Briefly, MEF cells were seeded in 96-wells plate and transfected with 50 nM Npm1 or control GFP siRNAs. The next days, medium was changed and cells were cultured in 200 µl of complete medium. After 48 hours, the BrdU labelling solution was added at a final concentration of 10 mM for 2.5 hours and the absorbance was measured at 655 nm following fixation after an additional incubation of 1 hour with the anti BrdU-POD solution according to the Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric kit from Roche Applied Science.

**Chromatin immunoprecipitation.**

Chromatin immunoprecipitation assays were performed according to the Upstate protocol. Sheared DNA fragments were immunoprecipitated with an anti-mTOR (Abcam, ab32028) and a mock rabbit IgG (Diagenode) was used as a negative control. Sequences of primers used for mouse *Npm1* promoter PCR were: Forward 5'-GCAGGGGCAAAAGATGAGT-3' and Reverse 5'-CAAAGCCCCCTAGGGAAAC). Primer sets for mouse $tRNA^{Arg/Tyr}$ (chr3 segment 19528000 to 19528500: Forward 5'- CTTGCCGCTCCCTTCGATAG-3'; Reverse 5'-AGAGGAGGAGGAGCGCACCTG-3') and a negative control non-mTOR-bound genomic region (Forward 5'-TTGGCATTGATATTGGGGGTGGGAGCAACT-3'; Reverse 5' GACTTCTTACTTTGACGCTTTCCTCCA-3') were used as described.[7] PCR conditions for all primers were as follows: 94°C for 3 min, followed by 32-35 cycles at 94°C for 30s, 55-58°C for 45s and 72°C for 45s.

**Statistical analyses**

All experiments were repeated at least three times and results were expressed as mean ± SEM. Statistical differences between groups were determined by Student's t test and the criterion for statistical significance was $P<0,05$. For western blotting results, the band intensities were measured by using the ImageJ and normalized with β-actin.

**Acknowledgments**

This research was supported by grants awarded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Blaise Pascal (UBP), the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). RB is holder of a studentship from the French Foundation for Medical Research (FRM).

## References


1. Aramburu J, Ortells MC, Tejedor S, Buxade M, Lopez-Rodriguez C. Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. Sci Signal 2014; 7:re2.

2. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell 2012; 149:274-93.

3. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell 2002; 110:177-89.

4. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr Biol 2004; 14:1296-302.

5. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10:307-18.

6. Tsang CK, Liu H, Zheng XF. mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. Cell Cycle 2010; 9:953-7.

7. Chaveroux C, Eichner LJ, Dufour CR, Shatnawi A, Khoutorsky A, Bourque G, Sonenberg N, Giguere V. Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERRalpha are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. Cell Metab 2013; 17:586-98.

8. Feuerstein N, Mond JJ. "Numatrin," a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B lymphocytes. J Biol Chem 1987; 262:11389-97.

9. Chan WY, Liu QR, Borjigin J, Busch H, Rennert OM, Tease LA, Chan PK. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. Biochemistry 1989; 28:1033-9.

10. Feuerstein N, Chan PK, Mond JJ. Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. J Biol Chem 1988; 263:10608-12.

11. Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. J Biol Chem 2004; 279:41275-9.

12. Wu MH, Chang JH, Chou CC, Yung BY. Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation. Int J Cancer 2002; 97:297-305.

13. Wu MH, Yung BY. UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA. J Biol Chem 2002; 277:48234-40.

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

15. Chan PK, Chan FY, Morris SW, Xie Z. Isolation and characterization of the human nucleophosmin/B23 (NPM) gene: identification of the YY1 binding site at the 5' enhancer region. Nucleic Acids Res 1997; 25:1225-32.

16. Zeller KI, Haggerty TJ, Barrett JF, Guo Q, Wonsey DR, Dang CV. Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. J Biol Chem 2001; 276:48285-91.

17. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. Nature 2007; 450:736-40.

18. Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. Mol Cell 2010; 39:171-83.

19. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol Cell 2006; 22:159-68.

20. Pelletier CL, Maggi LB, Jr., Brady SN, Scheidenhelm DK, Gutmann DH, Weber JD. TSC1 sets the rate of ribosome export and protein synthesis through nucleophosmin translation. Cancer Res 2007; 67:1609-17.

21. Albig AR, Decker CJ. The target of rapamycin signaling pathway regulates mRNA turnover in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell 2001; 12:3428-38.

22. Leotoing L, Meunier L, Manin M, Mauduit C, Decaussin M, Verrijdt G, Claessens F, Benahmed M, Veyssiere G, Morel L, et al. Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. Oncogene 2008; 27:2858-67.

23. Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, Thomas GV, Li G, Roy-Burman P, Nelson PS, et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. Cancer Cell 2003; 4:209-21.

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

25. Diao L, Chen YG. PTEN, a general negative regulator of cyclin D expression. Cell Res 2007; 17:291-2.

26. Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. Cancer Detect Prev 2006; 30:481-90.

27. Lindstrom MS. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochem Res Int 2011; 2011:195209.

28. Yung BY. Oncogenic role of nucleophosmin/B23. Chang Gung Med J 2007; 30:285-93.

29. Yu Y, Maggi LB, Jr., Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, Weber JD. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. Mol Cell Biol 2006; 26:3798-809.

30. Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA byprotein B23 endoribonuclease. Nucleic Acids Res 1998; 26:4508-15.

31. Szebeni A, Herrera JE, Olson MO. Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. Biochemistry 1995; 34:8037-42.

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

33. Maggi LB, Jr., Kuchenruether M, Dadey DY, Schwope RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP, Weber JD. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. Mol Cell Biol 2008; 28:7050-65.

34. Iadevaia V, Zhang Z, Jan E, Proud CG. mTOR signaling regulates the processing of pre-rRNA in human cells. Nucleic Acids Res 2012; 40:2527-39.

35. Cammas A, Sanchez BJ, Lian XJ, Dormoy-Raclet V, van der Giessen K, Lopez de Silanes I, Ma J, Wilusz C, Richardson J, Gorospe M, et al. Destabilization of nucleophosmin mRNA by the HuR/KSRP complex is required for muscle fibre formation. Nat Commun 2014; 5:4190.

36. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. Cancer Res 1997; 57:4997-5000.

37. Majumder PK, Yeh JJ, George DJ, Febbo PG, Kum J, Xue Q, Bikoff R, Ma H, Kantoff PW, Golub TR, et al. Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:7841-6.

38. Kremer CL, Klein RR, Mendelson J, Browne W, Samadzedeh LK, Vanpatten K, Highstrom L, Pestano GA, Nagle RB. Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. Prostate 2006; 66:1203-12.

39. Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, Briggman JV, Chan PK, Partin AW. Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. Prostate 1999; 39:298-304.

40. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrancois-Martinez AM, et al. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. Hum Mol Genet; 19:1561-76.

41. Herrera JE, Savkur R, Olson MO. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. Nucleic Acids Res 1995; 23:3974-9.

# *Discussion et Perspectives*

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait montré que la nucléophosmine (NPM1) est surexprimée dans les cancers de prostate humain et qu'elle joue le rôle de co-activateur transcriptionnel du le récepteur des androgènes (Léotoing et al., 2008b). Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à i) comprendre et caractériser les mécanismes qui conduisent à la surexpression de NPM1 lors de la tumorigenèse prostatique, et ii) caractériser les effets phénotypiques et moléculaires d'une surexpression de NPM1 *in vivo*.. D'une part, nos données montrent que l'expression accrue de NPM1 dans contexte Pten$^{-/-}$ est dû à la stimulation de l'expression du gène ainsi qu'à la stabilisation de son ARNm par mTOR. D'autre part, nous avons montré qu'une surexpression de NPM1 dans l'épithélium prostatique *in vivo* mène à une augmentation de la prolifération et à l'apparition d'une hyperplasie, associés à des dérèglements de l'expression de protéines régulatrices du cycle cellulaire. Bien que ce travail apporte des données originales quant au rôle de NPM1 dans la physiologie prostatique *in vivo*, il soulève de nombreuses questions concernant les mécanismes moléculaires précis impliqués dans les phénomènes physiopathologiques que nous avons observés.

## 1. NPM1 est une cible en aval de la signalisation PI3K/Akt/mTOR

mTOR est une sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des PIKK (*PhosphoInositide-3-Kinase related* Kinase). Elle appartient à 2 complexes, mTORC1 et mTORC2, dont la composition, le mode de régulation ainsi que les cibles cellulaires diffèrent (Sengupta et al., 2010). Au delà de son rôle dans le cytoplasme concernant le contrôle de la synthèse protéique, et des métabolismes glucidiques et lipidiques, mTOR exerce aussi des actions nucléaires dont le contrôle de l'expression génique(pour revue voir Laplante and Sabatini, 2013). Ce contrôle peut s'exercer de manière indirecte, sans participation de mTOR à un complexe chromatinien. Ainsi, la phosphorylation de Stat3 sur la sérine 727 par mTORC1 permet sa translocation nucléaire et son activation comme facteur de transcription (Kim et

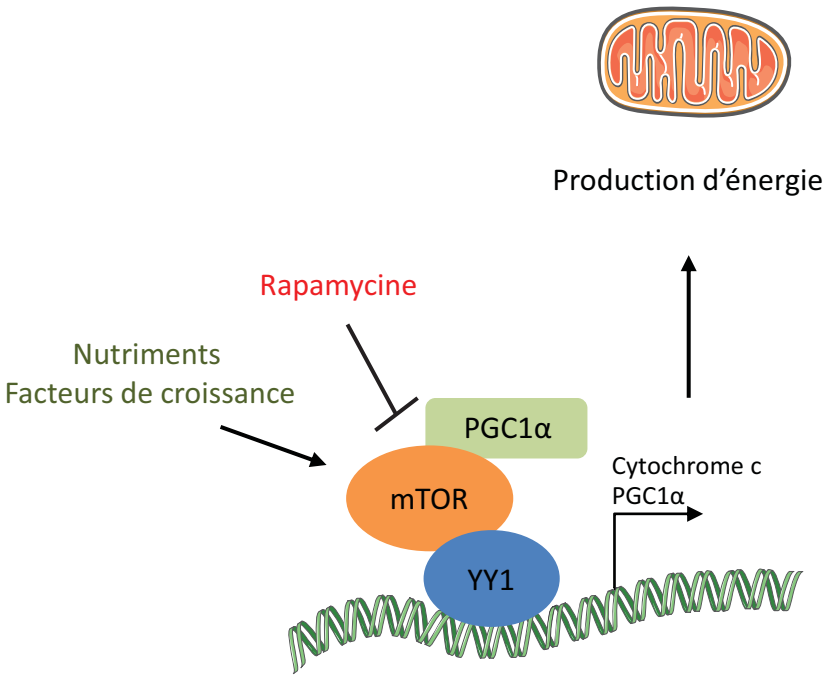



**Figure 37. Contrôle de l'activité transcriptionnelle de YY1 par mTOR.**
mTOR et YY1 sont constitutivement fixés au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la fonction oxydative de la mitochondrie, tels que PGC1α ou encore le cytochrome c. L'inhibition de mTOR par un traitement à la rapamycine abolit l'interaction entre mTOR-YY1 et le co-activateur PGC1α, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle du complexe. De cette manière, la cellule peut coupler l'apport de nutriments, activateurs de mTOR, à la fonction mitochondriale pour subvenir aux besoins énergétiques d'une cellule en croissance.
Adapté d'après Cunningham *et al*., 2007.

al., 2009; Yokogami et al., 2000). mTORC1 peut également contrôler l'expression de facteurs de transcription en jouant sur la traduction de leurs ARNm. C'est notamment le cas pour PPARγ et HIF1α (Le Bacquer et al., 2007; Düvel et al., 2010). Le contrôle de mTOR sur l'expression des gènes peut également s'exercer de façon directe. Il implique sa localisation à la chromatine sur des promoteurs de gènes dépendants de l'ARN polymérase I, II ou III (Cunningham et al., 2007; Tsang et al., 2010). Une étude récente a montré, par une approche d'immunoprécipitation de chromatine couplée à un séquençage haut débit (ChIP-seq), un enrichissement de mTOR au niveau de la séquence promotrice de NPM1, à 425 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (Chaveroux et al., 2013b). Nous avons confirmé ces données obtenues à partir de foies de souris dans notre modèle de fibroblastes embryonnaires murins et démontré que la signalisation PI3K/Akt, *via* mTOR, contrôle l'expression de NPM1. Ces données placent maintenant NPM1 comme un potentiel effecteur en aval de la voie et soulèvent plusieurs questions sur les mécanismes moléculaires impliqués.

### mTOR et YY1 interagissent-ils pour contrôler l'expression de NPM1 ?

Nos données démontrent clairement que l'expression de NPM1 est dépendante de l'activité de mTOR. Les expériences menées avec le promoteur de NPM1 cloné en amont du gène codant pour la luciférase ainsi que nos résultats de ChIP suggèrent fortement un rôle de mTOR au niveau chromatinien, lui permettant ainsi de contrôler l'expression de NPM1 de manière directe. Un traitement à la rapamycine réduit de façon importante l'expression de NPM1 mais il n'altère cependant pas la capacité de liaison de mTOR au promoteur. Il est donc possible que mTOR soit fixé de manière constitutive à la chromatine et que son activité kinase permette de moduler le recrutement et/ou l'activité de co-activateurs transcriptionnels. C'est le cas sur les promoteurs de gènes régulant les fonctions oxydatives mitochondriales, tels que le cytochrome C ou PGC1-α (Cunningham et al., 2007). Dans ce modèle, mTOR se fixe au facteur de transcription YY1 au niveau de la chromatine et un traitement à la rapamycine bloque le recrutement du co-activateur PGC1-α, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle du complexe (**figure 37**). L'étude du promoteur de NPM1 chez l'homme révèle la présence d'un site de fixation pour YY1 entre 371 et 344 paires de bases

en amont du site d'initiation de la transcription (Chan et al., 1997). De manière intéressante, le site de fixation de mTOR se trouve à proximité de cette zone (-425), et il est donc possible que le mécanisme gouvernant l'expression de NPM1 soit similaire à celui observé par Cunningham *et coll* pour le cytochrome c. De plus, le ChIP-seq réalisé par Chaveroux *et al*. en 2013 n'a pas permis d'isoler de séquences consensus pour la fixation de mTOR sur la chromatine. Il est donc probable que celui-ci ne se fixe pas à l'ADN mais plutôt à un facteur de transcription comme YY1. Pour vérifier cette hypothèse, nous nous proposons de réaliser une ChIP dirigé contre mTOR après avoir diminué la quantité de YY1 par interférence ARN, afin de voir si cela altère le recrutement de mTOR au promoteur de NPM1. Il serait également intéressant de diminuer l'expression de mTOR afin de déterminer si celui-ci influe sur le recrutement de YY1 sur son élément de réponse. Enfin, nous proposons de réaliser une double immuno-précipitation séquentielle de chromatine (ChIP-reChIP) afin de confirmer la présence d'un complexe mTOR-YY1 sur le promoteur de NPM1. Pour cela, nous précipiterons dans un premier temps les fragments d'ADN associés à YY1. Ceux-ci seront précipités une seconde fois à l'aide d'un anticorps dirigé contre mTOR. La présence de la séquence promotrice de NPM1 dans l'éluat final permettra de confirmer notre hypothèse. Nous pourrions par la suite réaliser, à partir d'extraits nucléaires, deux immunoprécipitations, l'une dirigée contre mTOR et l'autre contre YY1. L'identification de partenaires communs aux deux protéines, par une approche de spectrométrie de masse, pourra nous renseigner quant au cofacteur dont le recrutement à la chromatine est altéré par une inhibition de mTOR.

Il apparaît également indispensable de déterminer au sein de quel complexe, mTORC1 et/ou mTORC2, mTOR est présent au niveau chromatinien. Pour cela, nous mesurerons dans un premier temps l'activité du promoteur de NPM1 à l'aide d'un gène rapporteur luciférase après avoir diminué l'expression de Raptor (mTORC1) ou Rictor (mTORC2) par interférence ARN. Ces données pourront être complétées en analysant le recrutement de mTOR à la chromatine dans ces deux conditions. Il n'est cependant pas exclu que mTOR soit fixé à la chromatine au sein d'un complexe autre que mTORC1 ou mTORC2. Dans ce cas-là, les données que nous aurons récupérées au préalable à partir de l'analyse spectrométrique des interacteurs nucléaires de mTOR pourraient alors nous aider à isoler des candidats potentiels.

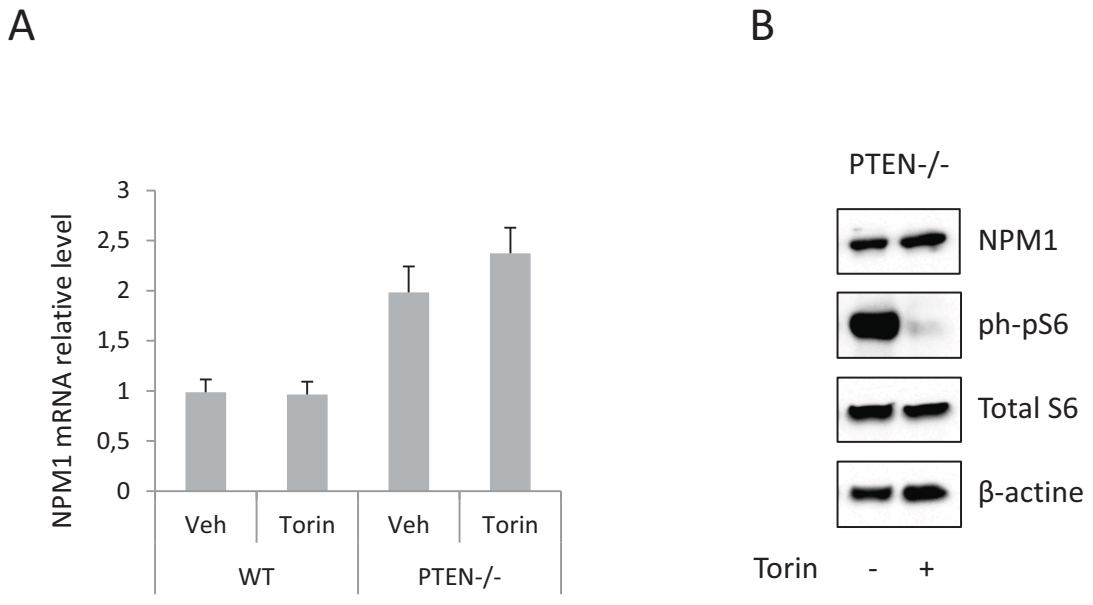



**Figure 38. Effet de la rapamycine et de la Torin 1 sur l'expression de NPM1.**
Des fibroblastes embryonnaires de souris sauvages (WT) ou invalidés pour PTEN (PTEN-/-) ont été traités pendant 4h avec de l'éthanol (véhicule) ou avec 100 nM de Torin . Les cellules ont ensuite été lysées puis les ARN et les protéines ont été extraits pour être analysés par qRT-PCR (A) et par western-blot (B). L'expression de NPM1 (A) est normalisée par rapport à l'expression de la β-actine.

### L'activité kinase de mTOR est-elle requise pour le contrôle de la transcription de NPM1 ?

La rapamycine agit en se fixant sur l'immunophiline intracellulaire FKBP12. Le complexe FKBP12-rapamycine interagit ensuite avec mTOR fragilisant son interaction avec les protéines du complexe mTORC1, dont Raptor. Cela conduit alors à la perte d'intégrité de mTORC1 et donc à l'inhibition de son activité kinase (Yip et al., 2010). Cependant, un traitement aigü à la rapamycine n'altère pas l'activité catalytique du complexe mTORC2. La rapamycine n'agit donc pas de façon directe sur le site catalytique de mTOR, et il est possible qu'au sein de son complexe chromatinien, l'activité kinase de mTOR soit maintenue. Afin de répondre à cette question, nous avons traité nos cellules avec de la Torin 1, une molécule qui se fixe dans le site catalytique de mTOR empêchant ainsi la fixation de l'ATP et inhibant donc son activité kinase (Thoreen et al., 2009). Nos premières expériences montrent peu ou pas d'effet de la Torin 1 sur l'expression de NPM1, suggérant donc que la régulation de l'expression de NPM1 ne requiert pas l'activité enzymatique de mTOR (**figure 38**). Ces données préliminaires sont cependant à prendre avec précaution étant donné la difficulté d'être assuré de la spécificité d'action de cet inhibiteur pharmacologique. Pour contourner cette difficulté, nous proposons de transfecter une forme dominante-négative de mTOR, qui aurait perdu seulement son activité kinase, dans notre modèle cellulaire. Cette forme enzymatiquement inactive de mTOR (mTOR KD, *Kinase Dead*) grâce à la mutation au sein du site catalytique de l'asparagine en position 2343 (HA-mTOR Asn2343Lys) a déjà été décrite et est donc disponible (Long et al., 2005), et l'analyse de son impact sur l'expression de NPM1 pourrait permettre alors de confirmer ou non cette hypothèse. Nous proposons également de co-transfecter le plasmide codant pour mTOR KD avec notre promoteur NPM1 cloné en amont du gène de la luciférase pour mesurer l'activité du promoteur dans ces conditions. Si l'activité catalytique de mTOR est non-essentielle à la régulation de l'expression de NPM1, il est alors probable que mTOR serve seulement de plate-forme de recrutement pour les différents co-activateurs transcriptionnels nécessaires à l'activation de la transcription. Dans ce cas, il serait important après avoir identifié les acteurs présents, de caractériser les domaines d'interactions de mTOR avec ces effecteurs. Cette dernière partie sera réalisée en utilisant comme appât une protéine recombinante GST (*Glutathione Sulfo-Transférase*) fusionnée aux différents domaines de mTOR que l'on incubera avec des extraits protéiques nucléaires. L'utilisation de billes de glutathion-agarose permettra de précipiter

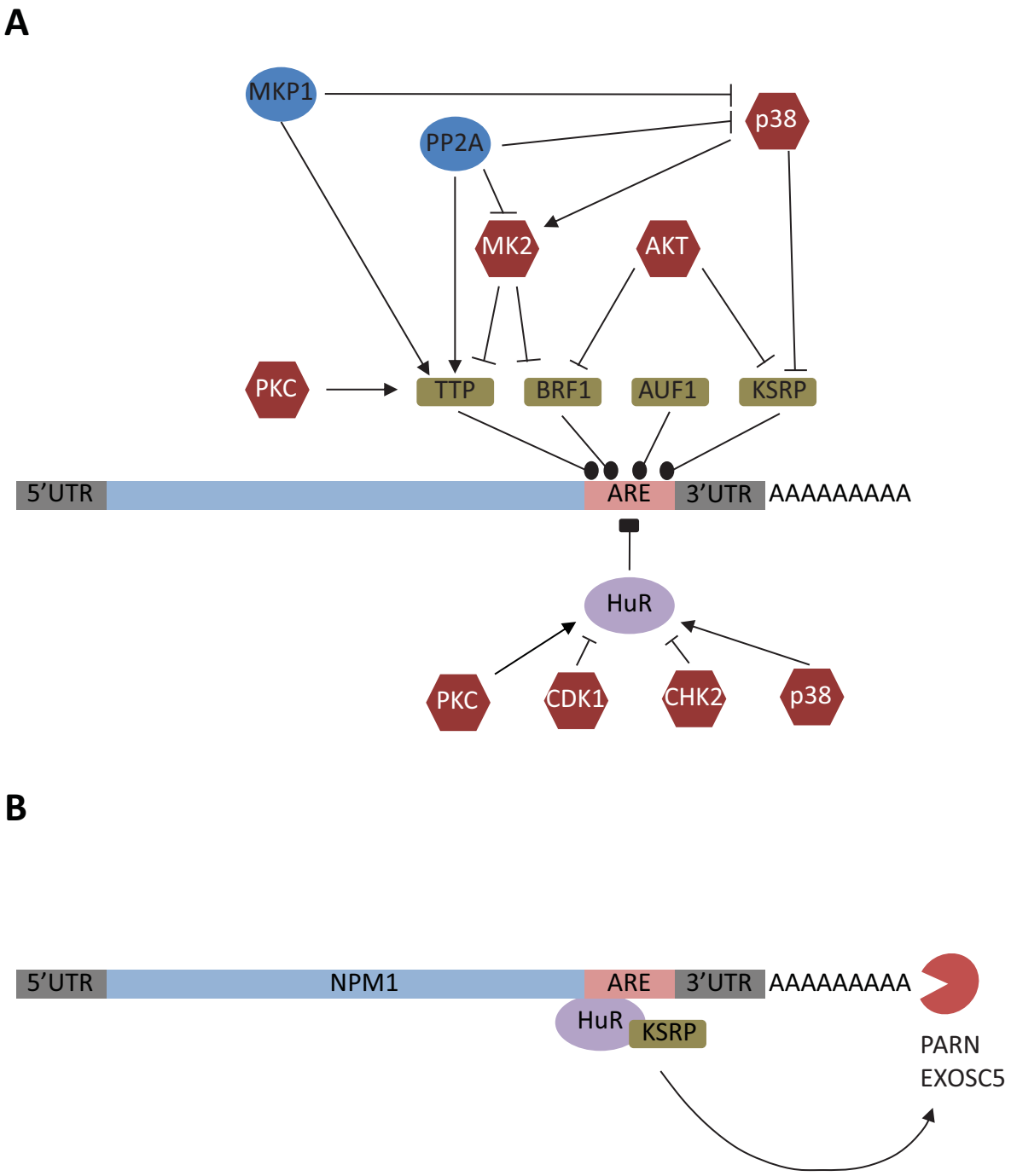



**Figure 39. Dégradation des ARN par les séquences AU-rich (ARE).**
**A**. Ce type de dégradation des ARNm dépend de la fixation de protéines déstabilisatrices (vert) ou stabilisatrices (violet) sur les séquences ARE (*AU-Rich Element*) dans la région 3'UTR des ARNm. Les protéines déstabilisatrices comme KSRP recrutent à leur tour des déadénylases et des exoribonucléases qui permettent la digestion de l'ARNm ciblé. La fixation de HuR est stabilisatrice puisqu'elle empêche la fixation et l'activité des protéines déstabilisatrices. Toutes ces protéines sont régulées par l'action de protéines kinases et/ou phosphatases dépendantes des voies de signalisation des facteurs de croissance ou du cycle cellulaires. **B.** Dans le cas de l'ARNm de NPM1, HuR et KSRP forment un complexe déstabilisateur qui recrute les ribonucléases PARN et EXOSC5. La dégradation de l'ARNm de NPM1 par ce mécanisme est essentielle au bon déroulement de la myogenèse.
Adapté d'après Schoenberg & Maquat, 2012.

les complexes formés puis de vérifier par western-blot la présence des effecteurs. Cela nous permettra de déterminer quel(s) domaine(s) d'interaction sont requis pour la formation du complexe chromatinien par mTOR. A long terme, ces données pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en permettant de dessiner des molécules inhibant le recrutement de partenaires de mTOR à la chromatine pour stopper l'expression de NPM1, évitant ainsi les nombreux effets secondaires indésirables déclenchés par un traitement à la rapamycine (Chan, 2004; Vignot et al., 2005).

### Comment mTOR contrôle la stabilité de l'ARNm codant pour NPM1 ?

La rapamycine entraîne une chute de 50% du stock d'ARNm codant pour NPM1 dès 4 heures de traitement. De plus, l'inhibition de la transcription pendant 12h à l'aide d'un traitement à l'actinomycine D n'affecte pas la quantité d'ARNm codant pour NPM1, montrant que celui-ci est très stable dans notre modèle. Ces données suggèrent donc que, au delà d'une régulation de l'expression, la rapamycine joue sur la stabilité des ARNm NPM1 en entrainant leur dégradation. Il existe deux types de dégradation des ARNm : la première consiste en un contrôle-qualité des ARNm pour éviter la production de protéines cytotoxiques tronquées et/ou dont la fonction serait perdue ou changée (NMD, *Non-sens Mediated mRNA Decay*); la seconde vise à diminuer la demi-vie des ARNm afin de réguler la quantité de protéines fonctionnelles produites (pour revue, voir Schoenberg and Maquat, 2012). Celle-ci est souvent dépendante de la présence de séquences riches en AU (ARE, *AU Rich Element*) dans les régions non-traduites de l'ARNm (UTR, *UnTranslated Region*) (**figure 39a**). Ces séquences permettent de recruter des protéines telles que TTP (*Tristetrapolin*), BRF1 (*Butyrate Responsive Factor 1*), KSRP (*KH Splicing type Regulatory Protein*) ou encore AUF1 (*AU rich element binding protein* 1) qui à leur tour recrutent des protéines à activité ribonucléases pour dégrader l'ARNm. La protéine HuR (*Human antigen R*) est également connue pour fixer ces séquences mais son effet sur l'ARNm est généralement stabilisateur. La fixation de l'ensemble de ces protéines est régulée par leur degré de phosphorylation, fruit de l'activité de protéines kinases et phosphatases dépendantes notamment des voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance. Ce mécanisme sophistiqué permet de contrôler plus finement la production de protéines en fonction de l'environnement cellulaire. Une

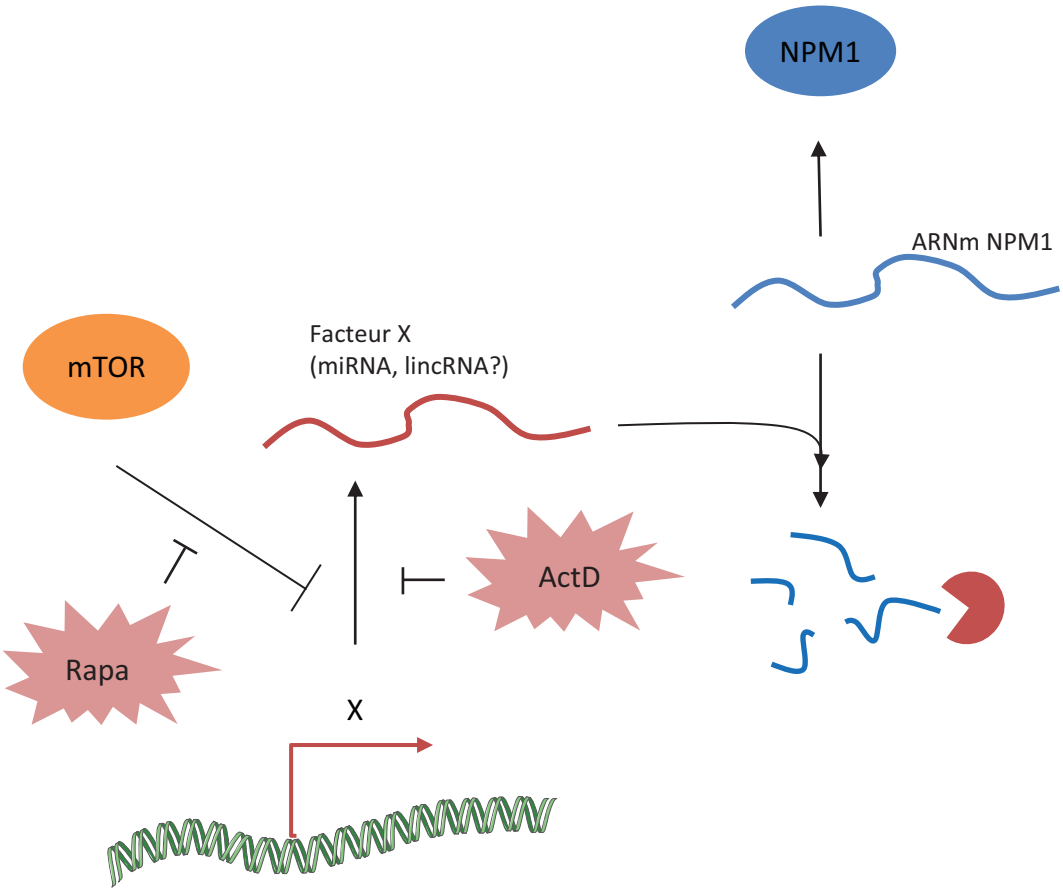



**Figure 40. Modèle de stabilisation de l'ARNm de NPM1 par mTOR.**
mTOR est impliqué de manière directe ou indirecte dans la répression de l'expression d'un facteur X responsable de la dégradation de l'ARNm de NPM1. Etant donné la rapidité avec laquelle l'ARNm de NPM1 est dégradé suite à un traitement à la rapamycine, nous posons l'hypothèse que ce facteur soit un ARN non codant (miRNA ou lincRNA). Son interaction avec l'ARNm de NPM1 mènerait à sa dégradation par un mécanisme encore inconnu. L'actinomycine D, en bloquant l'activité des ARN polymérases et en inhibant ainsi toute expression génique, masque l'effet de la rapamycine.

étude récente a permis d'identifier un mécanisme par lequel l'ARNm de NPM1 est déstabilisé par l'action du complexe Hur/KRSP et de la ribonucléase PARN (Cammas et al., 2014) (**figure 39b**). Ce mécanisme requiert la présence d'une séquence riche en uracile (U-rich) dans la région 3' non traduite de NPM1 (3'UTR, *UnTranslated Region*), permettant la fixation du complexe Hur/KRSP. Pour tester l'importance de cette région dans notre modèle, nous avons transfecté un plasmide contenant l'ADNc de la *Renilla Luciferase* couplé avec la région 3'UTR de NPM1 mutée ou non pour cette séquence U-rich dans nos MEF. Nous n'avons pas observé de modification de l'activité luciférase et de la quantité d'ARNm codant pour la *Renilla Luciferase* suite à un traitement à la rapamycine. Ce résultat suggère donc que la régulation de l'expression de NPM1 par mTOR ne dépend pas du mécanisme rapporté par Camas *et al.*.

De manière intéressante, l'effet de la rapamycine est renversé par un traitement conjoint à l'actinomycine D. Ce résultat suggère donc que la dégradation active de l'ARNm de NPM1 induite par un traitement à la rapamycine est tributaire de la transcription génique. Nous proposons donc un modèle dans lequel mTOR est impliqué, de manière directe ou indirecte, dans la répression d'un gène dont le produit (facteur X) est nécessaire à la dégradation de l'ARNm de NPM1 (**figure 40**). Un traitement à la rapamycine, via l'inhibition de mTOR, lèverai cette répression et permettrait ainsi l'accumulation de ce facteur X et la dégradation de l'ARNm. Un traitement conjoint avec l'actinomycine D masquerait alors l'effet de la rapamycine en interdisant tout transcription. Un mécanisme de transcription-traduction pour la production de ce facteur X paraît peu probable compte tenu de la rapidité de dégradation de l'ARNm NPM1 par la rapamycine. Nous pensons donc que ce facteur est de nature ribonucléique. Il est connu depuis longtemps que des petits ARN non-codants (si- ou miRNA, *Small Interfering-* et *Micro-RNA*) sont impliqués dans la dégradation des ARNm (Houseley and Tollervey, 2009). Plus récemment, il a été montré que les longs ARN non-codants (lincRNA, *Long Intergenic Non Coding* RNA) sont également impliqués dans la dégradation des ARNm en guidant des complexes ribonucléoprotéiques effecteurs sur leurs cibles (Gong and Maquat, 2011). Afin d'identifier des candidats nous proposons plusieurs approches. La plus simple consiste à rechercher *in silico* d'éventuels candidats en utilisant des outils de prédiction bioinformatique disponibles sur internet, tels que MiRanda (Betel et al., 2008). Afin de valider la pertinence biologique des candidats sélectionnés, nous

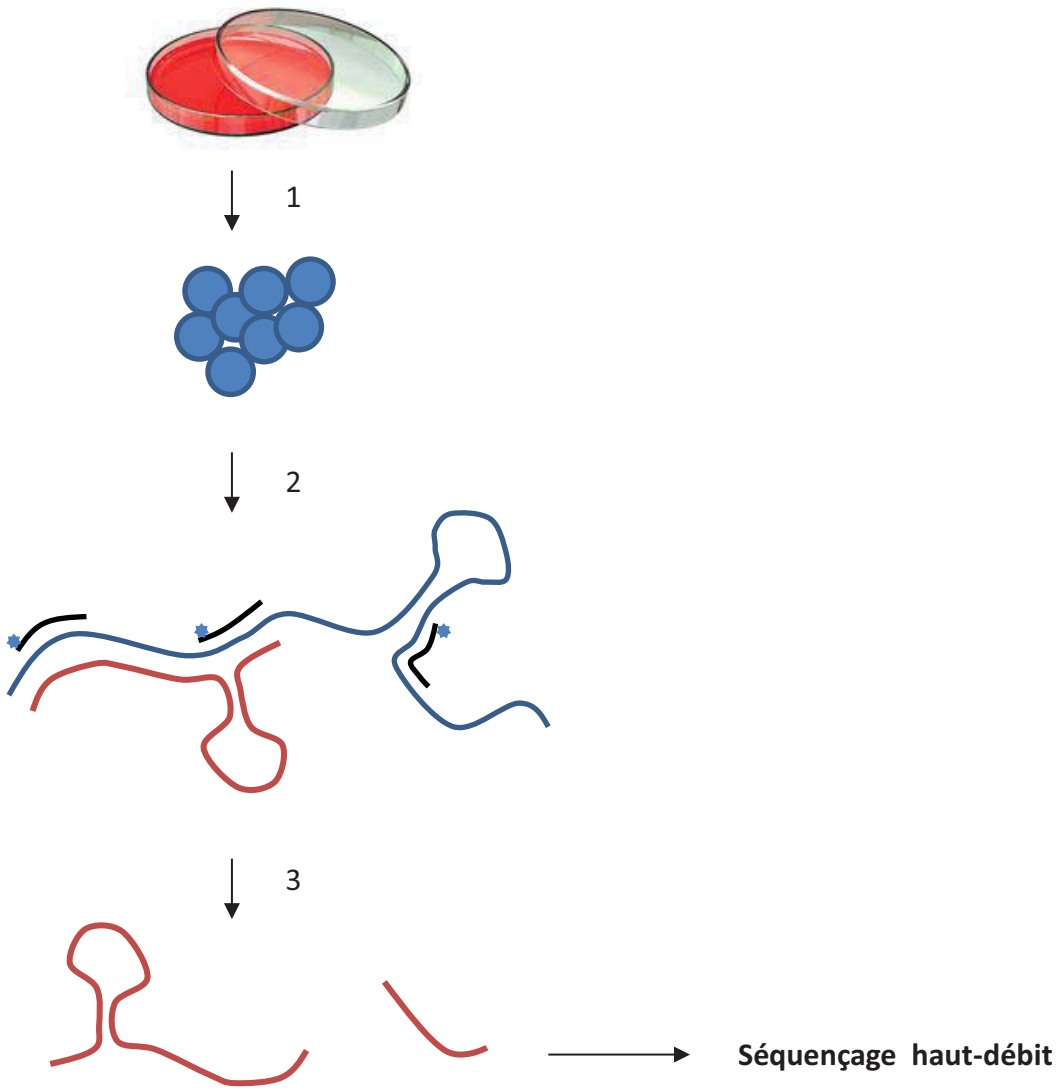



**Figure 41. Technique RNA-RAP.**
Les cellules sont fixées par du formaldéhyde puis récoltées (1). Elles sont ensuite lysées et subissent un traitement mixte DNAse/Protéases afin de digérer l'ADN et les protéines. Les extraits cellulaires ainsi obtenus sont incubés avec des petites sondes biotinylées (étoile bleue) complémentaires de l'ARN cible (ici, l'ARNm de NPM1 en bleu) (2). Les complexes sondes/ARN formés sont ensuite précipités grâce à des billes couplées à la streptavidine, qui possède une forte affinité pour la biotine. Enfin, les interacteurs de NPM1 présents dans l'éluat final sont séquencés et identifiés.
D'après Engreitz *et al.*, 2014.

inhiberons leur activité grâce à l'utilisation de petits ARN complémentaires dans des cellules traitées ou non à la rapamycine, et mesurerons l'expression de NPM1 par RTqPCR dans ces conditions. L'inhibition du miRNA dont l'expression est régulée par mTOR devrait alors renverser l'effet de la rapamycine sur la dégradation de l'ARNm NPM1. La seconde approche consiste à analyser de façon globale l'impact d'un traitement à la rapamycine sur l'expression des petits ARN non-codants grâce à une puce miRNA disponible dans le commerce. Nous sélectionnerons ensuite ceux dont l'expression augmente, et qui présente une complémentarité de séquence avec l'ARNm de NPM1. La validation des candidats pourra se faire de la même façon que pour ceux identifiés par l'approche bioinformatique. Une dernière approche consisterait en l'identification des lincRNA qui interagissent avec l'ARNm de NPM1 suite à un traitement à la rapamycine. Cela pourra être réalisé grâce à la technique de purification d'ARN par des sondes antisens (RNA-RAP, RNA/RNA Antisens Purification) récemment décrites (Engreitz et al., 2014) (**figure 41**). De manière succincte, cette approche consiste à fixer les cellules avec du formaldéhyde pour préserver les interactions ARN/ARN. Les cellules sont ensuite lysées puis les extraits sont traités dans le but de digérer l'ADN ainsi que les protéines. L'ARN est alors fragmenté et incubé avec des sondes biotinylées complémentaires de notre ARN cible. L'immunoprécipitation est réalisée grâce à des billes de streptavidine et l'éluât soumis à un séquençage haut débit. Les interactions qui seront les plus pertinentes seront vérifiées au cas par cas par RT-qPCR après précipitation de l'ARNm de NPM1 selon le même protocole. L'approche inverse consistant à précipiter le candidat et vérifier la présence de l'ARNm de NPM1 permettra de confirmer définitivement les interactions. Enfin, nous pourrons valider l'importance fonctionnelle de ces interactions en diminuant l'expression de chacun des candidats grâce à des ARN interférents, ou en l'augmentant grâce à des vecteurs d'expression.

### Quel est l'impact de la surexpression de NPM1 induite par mTOR ?

L'hyperactivation de la voie PI3K/Akt/mTOR est l'une des altérations les plus fréquentes observées dans la progression du cancer de la prostate puisqu'elle est présente dans la quasi-totalité des cancers métastatiques (Pourmand et al., 2009; Taylor et al., 2010b). Pour cette raison, l'utilisation de rapamycine et de ses analogues (rapalogues) a depuis longtemps

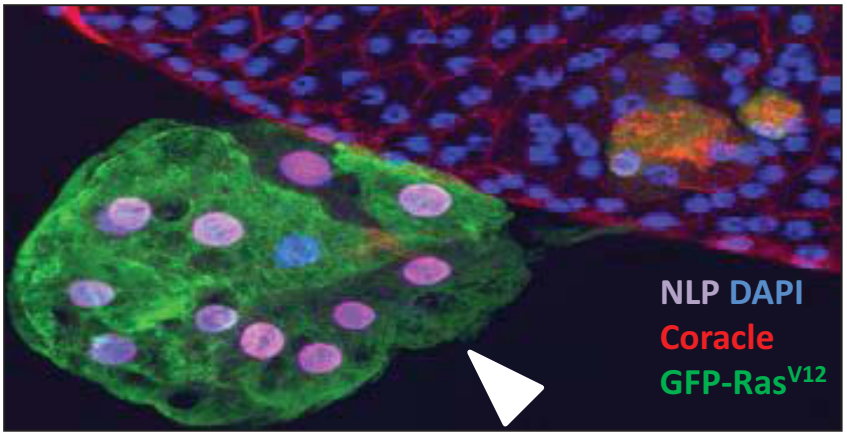



**Figure 42. Expression de dNLP dans des tumeurs générées dans les glandes accessoires de la drosophile.**
Notre modèle de drosophile exprimant une forme constitutivement active de Ras (Ras$^{V12}$) développe des tumeurs (tête de flèche blanche) au niveau de la glande accessoire, équivalent de la prostate chez la drosophile. Ces tumeurs sont marquées en vert grâce à l'expression de la GFP. Les cellules de ces tumeurs surexpriment dNLP, l'orthologue drosophilien de NPM1.
DAPI = intercalant de l'ADN. Il sert à marquer les noyaux.
Coracle = protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire au niveau des épithélium. Elle sert à marquer le pourtour des cellules épithéliales différenciées.

été testée en phase clinique pour le traitement des CRPC, sans bénéfice sur la survie globale des patients (Bitting and Armstrong, 2013). Cet échec peut s'expliquer i) par la grande variété d'effecteurs de la voie, et le manque de spécificité des rapalogues et ii) par l'abolition du rétrocontrôle négatif exercé par mTORC1 sur mTORC2 suite au traitement, résultant en une activation accrue de Akt (Dibble et al., 2009). Il est donc important d'isoler et de caractériser les effecteurs en aval de la voie PI3K/Akt/mTOR afin d'agir spécifiquement sur ces cibles potentielles. Nos résultats montrent que la surexpression de NPM1 induite par mTOR est essentielle pour maintenir les cellules dans un état prolifératif. De manière intéressante, la diminution de NPM1 par interférence ARN réduit le taux d'incorporation de BrdU et l'accumulation de la cycline D1 dans des cellules Pten-/- mais pas dans les cellules sauvages. Ces données montrent donc une dépendance des cellules vis-à-vis de NPM1 lorsque Pten est muté, et en fait donc une cible de choix pour un ciblage thérapeutique. Bien que nous ayons confirmé le lien entre l'hyperactivation de mTOR et la surexpression de NPM1 dans les prostates de souris KO pour Pten, l'absence de souris avec un allèle floxé de NPM1 rend difficile la démonstration d'une « NPM1-dépendance » *in vivo*. Afin de contourner ce problème, nous développons actuellement un modèle de drosophile exprimant un ARN interférent dirigé contre dNlp, l'homologue de NPM1 (RNAi-dNlp) (Lindström, 2011). Les résultats préliminaires montrent que la surexpression d'une forme mutante constitutivement active de Ras ($Ras^{V12}$) entraine la formation de tumeurs au niveau de la glande accessoire, équivalent de la prostate chez la drosophile. De manière intéressante, les cellules tumorales surexpriment dNLP (**figure 42**). Les travaux en cours visent maintenant à déclencher la tumorigenèse induite par l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR en surexprimant une forme myristoylée et donc constitutivement active d'Akt pour suivre l'expression de dNlp dans ce contexte. En utilisant ce modèle, nous pourrions réduire l'expression de dNLP grâce à des constructions RNAi déjà disponibles pour voir si cela influe sur la tumorigenèse induite par Akt.

Enfin, tout ce travail devra être complété par des analyses cliniques, qui nous permettront de déterminer s'il existe un lien entre mTOR, NPM1 et l'agressivité du cancer de la prostate dans des échantillons tumoraux humains. Nous utiliserons pour cela des échantillons tumoraux gradés et triés selon l'agressivité du cancer et sa résistance aux traitements, qui sont disponibles dans le commerce sous forme de TMA (*Tissue Macro-Array*). Nous

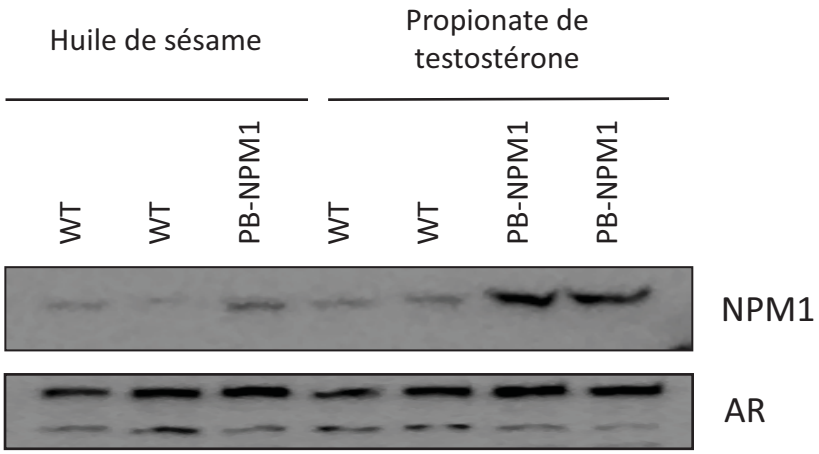



**Figure 43. Sensibilité du transgène ARR2PB-NPM1 aux androgènes *in vivo*.**
Des souris sauvages (WT) ou transgéniques (PB-NPM1) de 4 mois ont été injectées quotidiennement pendant 15 jours avec 150 mg/kg de propionate de testostérone ou avec le volume correspondant d'huile de sésame (véhicule). Cinquante µg de protéines extraites à partir des lobes prostatiques ventraux de chaque souris ont ensuite été analysés par western-blot avec des anticorps dirigés contre NPM1 et AR.

marquerons ces TMA grâce à des anticorps dirigés contre NPM1, phospho-4eBP1 (qui est le marqueur de l'activité de mTOR classiquement utilisé dans les études cliniques), et Pten. Des premières données obtenues grâce à une collaboration avec le centre de lutte contre le cancer Jean Perrin de Clermont-Ferrand sont encourageantes puisqu'elles montrent une corrélation inverse entre la présence de Pten et l'expression de NPM1.

## 2. NPM1 est-elle un oncogène prostatique?

Les résultats obtenus à partir de nos souris transgéniques surexprimant NPM1 dans l'épithélium prostatique ne nous permettent pas pour l'instant de répondre avec certitude à cette question. En effet, ces souris développent des hyperplasies prostatiques qui n'évoluent pas vers des lésions malignes. Le poids des lobes prostatiques ventraux et dorsaux-latéraux chez les souris transgéniques est cependant augmenté, et cela est associé à un index prolifératif plus élevé dans l'épithélium. D'un point de vue moléculaire, la surexpression de NPM1 mène à des altérations de l'expression de facteurs importants dans la régulation du cycle cellulaire et à une altération de marqueurs de cyto-différenciation. Ces données montrent donc qu'une surexpression de NPM1 seule ne suffit pas à déclencher le cancer, mais n'excluent pas le fait qu'elle puisse favoriser sa progression après son initiation par une autre altération oncogénique. Il est également possible que la surexpression de NPM1 dans l'épithélium prostatique de nos souris transgéniques ne soit pas assez forte pour initier un développement néoplasique. Puisque le transgène est dépendant de l'activité de AR, ce dernier point pourra être vérifié en greffant un implant délivrant quotidiennement une forte dose de testostérone dans la circulation sanguine de nos souris. Nous avons déjà pu vérifier l'efficacité d'une telle approche en injectant quotidiennement 150 mg/kg de propionate de testostérone aux souris pendant 15 jours. L'expression du transgène s'en trouvait alors sensiblement augmentée (**figure 43**) par rapport aux souris ayant reçu un traitement contrôle.

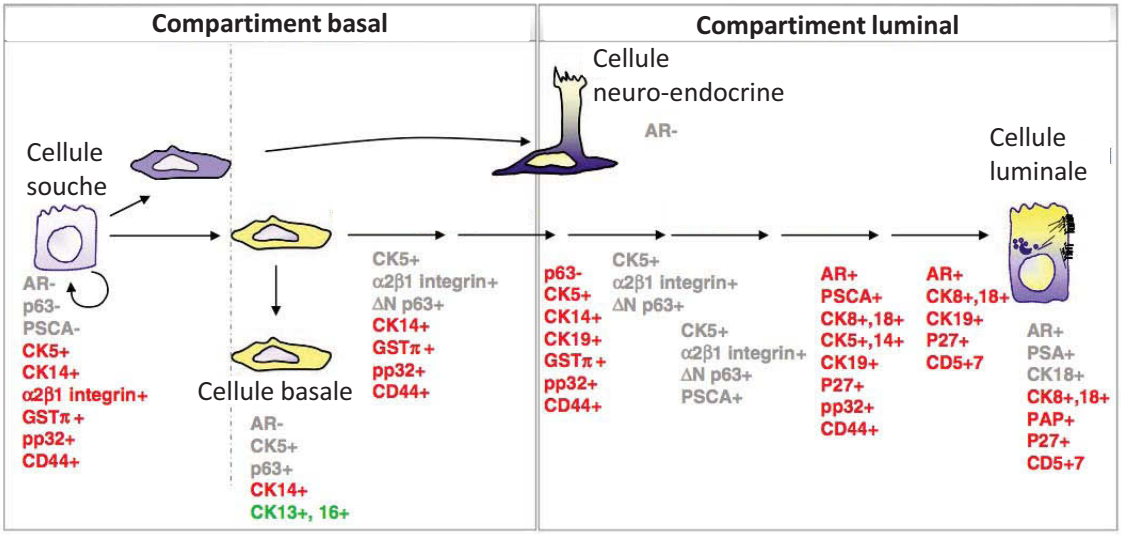



**Figure 44. Principaux marqueurs de différenciation dans l'épithélium prostatique.**
La différenciation des cellules souches prostatiques en cellules épithéliales basales, luminales et neuro-endocrines implique le passage par plusieurs stades intermédiaires. Pendant ce processus, l'acquisition ou la perte de l'expression de marqueurs tels que ceux décrits ci-dessus permet d'identifier le stade de différenciation d'une cellule.
Kasper, 2008.

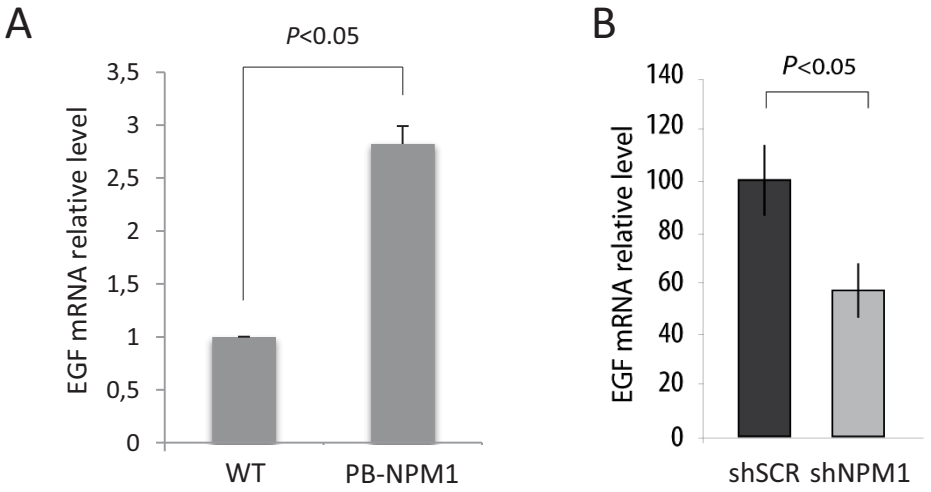



**Figure 45. NPM1 induit l'expression de l'EGF.**
Les ARN totaux extraits de lobes prostatiques ventraux de souris sauvages (WT) et transgéniques (PB-NPM1) de 4 mois ont été analysés par RT-qPCR. L'expression de l'EGF est normalisée par rapport à l'expression de 36b4. n= 6 pour chaque génotype **B**. Les ARN totaux extraits de cellules LNCaP exprimant un ARN interférent dirigé contre NPM1 (shNPM1) ou une séquence non spécifique (shSCR) ont été analysés par RT-qPCR. Les résultats de l'expression de l'EGF sont normalisés par rapport à l'expression de NPM1. N= 3 expériences indépendantes. La significativité a été calculée avec un test T.

### NPM1 influe-t-elle sur la différenciation de l'épithélium prostatique ?

La différenciation des cellules épithéliales prostatiques et la régulation du cycle cellulaire sont des processus intimement liés. Au-delà de l'expression de AR, qui atteste de la différenciation fonctionnelle, les cellules épithéliales matures accumulent le CKI $p27^{kip1}$. Ce marqueur de différenciation terminale se fixe et inhibe la CDK2, agissant ainsi comme un puissant frein à la progression du cycle cellulaire et comme un garant de la quiescence des cellules épithéliales (De Marzo et al., 1998; Mukai et al., 2005). De manière intéressante, la surexpression de NPM1 dans la prostate de nos animaux est corrélée à une perte de $p27^{kip1}$ et à une diminution de l'expression de gènes cibles de AR. De plus, des résultats en cours de publications montrent que des cellules épithéliales de canal déférent perdent l'expression de NPM1 au fur et à mesure de la différenciation (Léotoing *et al*, soumis). Cette diminution de NPM1 est associée à l'accumulation de $p27^{kip1}$, ce qui renforce le lien entre ces deux protéines. D'autres études ont corrélé le niveau d'expression de NPM1 et la différenciation cellulaire. La présence de NPM1 est en effet nécessaire pour le maintien du statut indifférencié des cellules souches musculaires, de cellules cancéreuses hématopoïétiques ou encore des cellules souches embryonnaires (ESC, Embryonnic Stem Cells) (Balusu et al., 2011; Cammas et al., 2014; Herger et al., 2007; Johansson and Simonsson, 2010). Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de la surexpression de NPM1 sur la différenciation des cellules épithéliales prostatiques. Pour cela, nous proposons d'analyser *in situ* le profil de différenciation des cellules exprimant le transgène par immunofluorescence (cellules Flag+). Nous réaliserons un co-marquage en utilisant une combinaison d'anticorps fluorescents dirigés contre l'épitope flag et contre des marqueurs des différentes étapes de la différenciation de l'épithélium prostatique (**figure 44**). En établissant un profil précis de ces marqueurs dans les cellules Flag+, nous pourrions déterminer quelle étape de la différenciation épithéliale est bloquée par une surexpression de NPM1. Il n'est cependant pas exclu que cette dernière induise une dédifférenciation des cellules qui la surexpriment. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions utiliser la méthode de lignage cellulaire grâce à des protéines fluorescentes. Pour cela il faudrait générer des souris possédant le gène de la recombinase CRE (*Cause REcombination*) sous le contrôle du promoteur d'un marqueur de différenciation terminale comme $p27^{kip1}$, ainsi que la construction mTmG au niveau du locus Rosa 26, connu pour son expression ubiquitaire (Soriano, 1999). Cette construction consiste

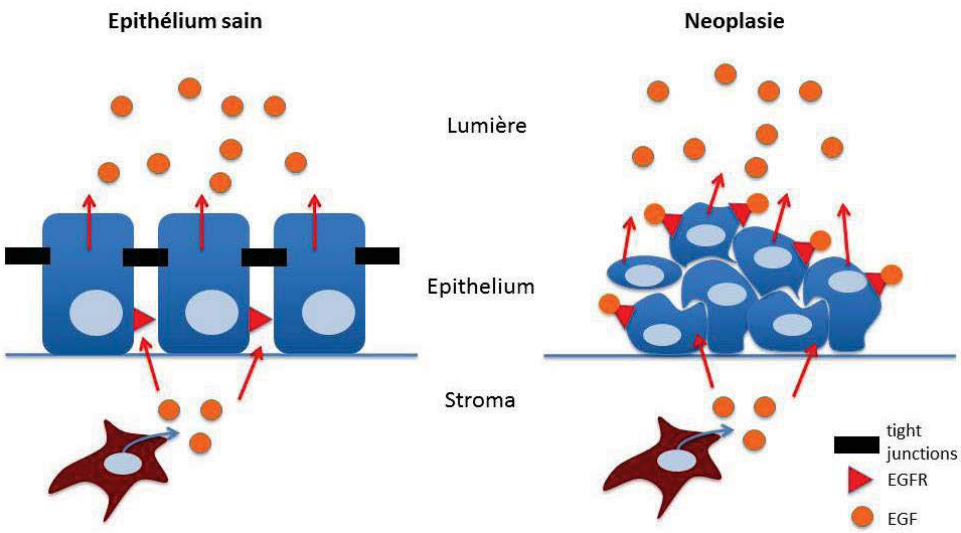



**Figure 46. Activation des récepteurs de l'EGF dans un contexte sain et néoplasique.**
Dans un épithélium sain, les récepteurs de l'EGF se situent sous les jonctions serrées qui lient les cellules entre elles. L'EGF sécrété au niveau apical ne peut donc pas les atteindre et les récepteurs de l'EGF ne répondent qu'aux facteurs de croissance provenant du stroma. Dans un tissu néoplasique, la perte de l'intégrité de l'épithélium, notamment dûe à la perte de ces jonctions intercellulaires, autorise l'EGF d'origine épithéliale à activer ses récepteurs de façon autocrine.

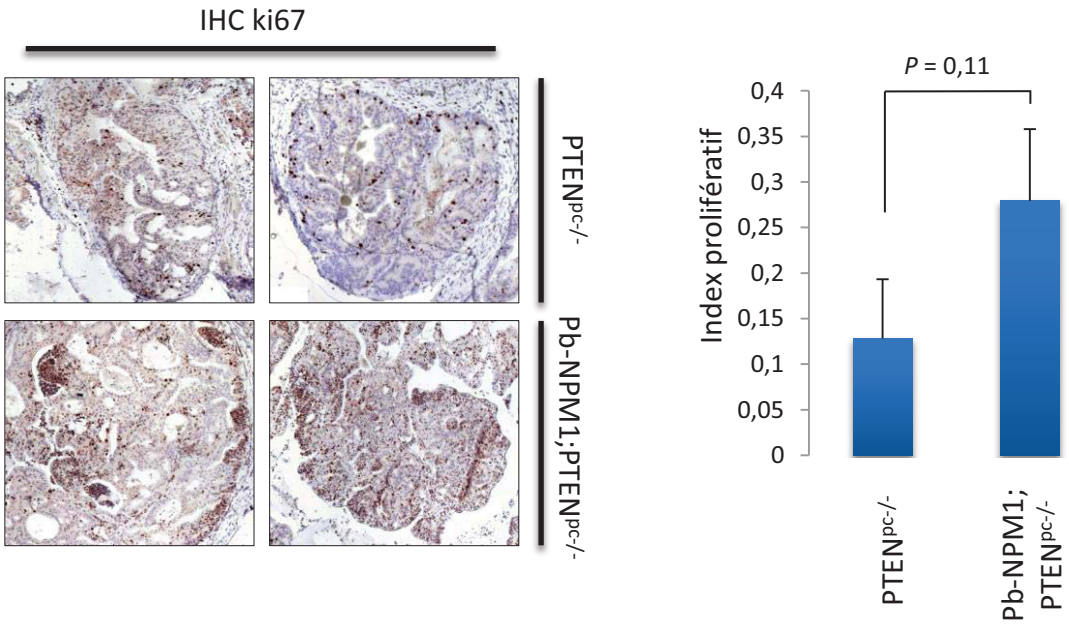



**Figure 47. Index proliferatif dans les prostates de souris Pten$^{pc-/-}$ et PB-NPM1;Pten$^{pc-/-}$.**
La présence du marqueur de prolifération ki67 a été analysée par immunohistochimie sur des coupes de lobes dorsaux-latéraux prostatiques de souris Pten$^{pc-/-}$ et PB-NPM1;Pten$^{pc-/-}$. L'index proliferatif est calculé en rapportant le nombre de cellules immunoréactives au nombre de cellules totales. Au moins 4000 cellules ont été comptées pour chaque individu (n=3 souris de chaque génotype).

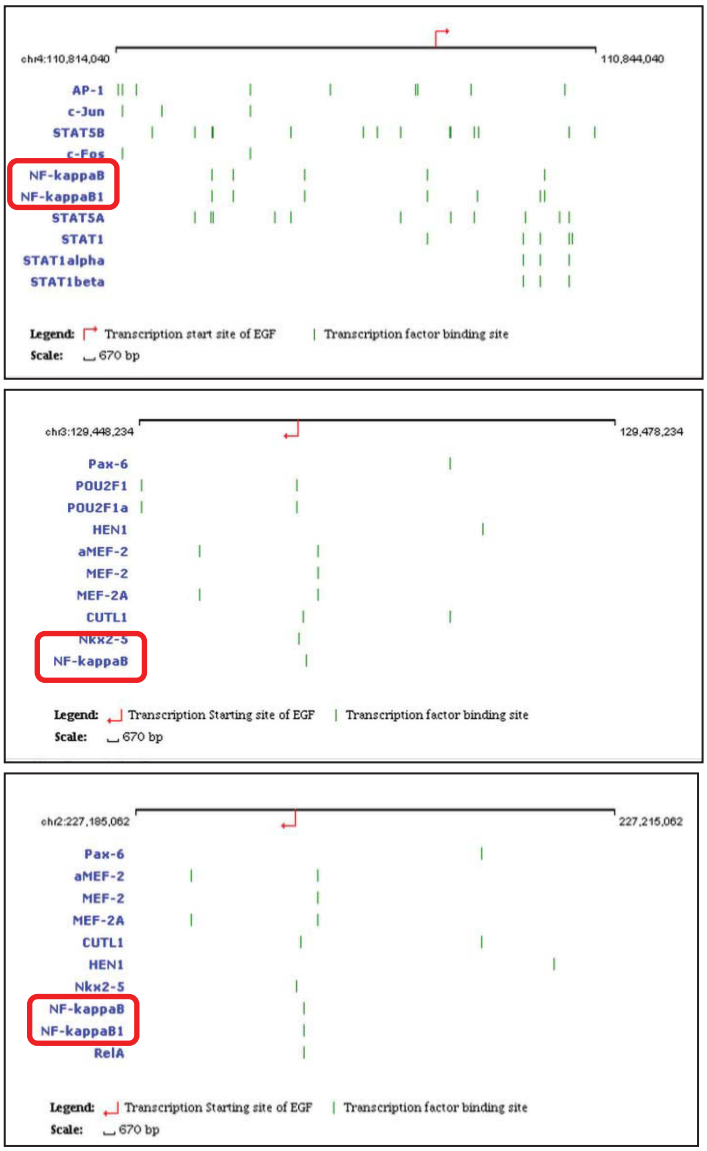
en un cDNA codant pour la protéine Tomato (protéine fluorescente rouge) suivi d'un codon Stop. L'ADNc de Tomato est encadré par des sites flox, et est suivi de l'ADNc codant pour la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Ainsi, dans les cellules où le promoteur de $p27^{kip1}$ est activé, la CRE est exprimée et elle induit l'excision de l'ADNc de Tomato ainsi que du codon stop au niveau du locus Rosa26. La cellule sera alors marquée de façon irréversible en vert grâce à l'expression de la GFP. Au contraire, les cellules n'ayant pas atteint les stades terminaux de la différenciation apparaitront en rouge. Après avoir croisé ces souris avec nos souris ARR2PB-NPM1, nous analyserons la couleur des cellules exprimant notre transgène. Si elles sont vertes, c'est que NPM1 induit la dédifférenciation des cellules épithéliales. Si elles sont rouges, c'est que NPM1 bloque une étape de la différenciation.

### Quelle est la pertinence d'une surexpression d'EGF induite par NPM1?

Nos données montrent que la surexpression de NPM1 dans la prostate induit l'expression du facteur de croissance EGF (**figure 45**). Ce résultat est à mettre en parallèle avec nos travaux antérieurs sur les cellules humaines de cancer prostatique LNCaP, dans lesquelles la diminution de NPM1 par interférence ARN réduit de façon significative l'expression de l'EGF (Loubeau et al., 2014). Dans les cellules LNCaP, cette diminution est associé à une perte d'activation de la voie des MAPK mesurée en analysant l'état de phosphorylation de l'EGFR et de ERK. De manière surprenante, l'activation des MAPK n'est pas reproduite dans les prostates de nos souris transgéniques. Une explication plausible est que, en conditions physiologiques, les sécrétions épithéliales, qui ont lieu au pôle apical des cellules, ne peuvent atteindre les récepteurs aux facteurs de croissance situés au niveau basal sous des jonctions serrées étanches (Montano and Djamgoz, 2004b) (**figure 46**). Dans un contexte épithélial non-malin, à l'image de notre modèle, cette disposition n'autorise l'activation de ce type de récepteurs que par les facteurs de croissance sécrétés par les cellules stromales. Il serait donc intéressant de croiser ces souris avec un modèle développant des lésions prostatiques néoplasiques comme les souris KO pour PTEN ($Pten^{pc-/-}$). En désorganisant l'épithélium, cela permettrait peut être de rendre les récepteurs EGFR disponibles pour l'EGF d'origine épithélial pour mettre en place une boucle autocrine d'activation de l'EGFR. Ainsi, les cellules épithéliales malignes deviendraient auto-suffisante en facteur de croissance, ce

qui constitue une caractéristique importante des cellules cancéreuses en général (Hanahan and Weinberg, 2011b). Il est également possible que cette source d'EGF supplémentaire vienne s'infiltrer dans le stroma pour jouer le rôle de chemo-attractant favorisant ainsi l'invasion locale et la formation de métastases comme décrit précédemment (Rajan et al., 1996). Ces hypothèses sont actuellement en cours de vérification puisque nous avons développé et commencé à analyser le phénotype de souris ARR2PB-Npm1/Pten$^{pc-/-}$. Ces souris ont des tumeurs prostatiques qui ont tendance à être plus grosses et à présenter un index prolifératif plus élevé que chez les souris Pten$^{pc-/-}$ (**figure 47**). Cependant, ces animaux ne présentent pas de métastases à 12 mois et nous n'avons pas observé d'induction de la voie des MAPK. Ces observations sont pour l'instant à pondérer avec le faible nombre d'animaux que nous avons pu analyser. Des souris sont actuellement en cours de vieillissement et viendront prochainement accroitre nos cohortes pour augmenter la puissance statistique de notre travail.

Une autre possibilité quant au rôle d'une surexpression de l'EGF dans les phénotypes que nous avons observés est qu'elle aurait un impact durant le développement post-natal de la prostate. En effet, comme mentionné dans le chapitre *2.2.1.* de l'introduction bibliographique, l'EGF exerce un rôle prolifératif sur l'épithélium prostatique lors de la phse developpementale de bourgeonnement. Bien que AR ne soit pas exprimé dans l'épithélium à ce stade-là, il est connu que le promoteur ARR2PB est actif dès la naissance dans les bourgeons épithéliaux ainsi que dans les cellules stromales (Parisotto and Metzger, 2013). Nous pourrions nous en assurer en prélevant des sinus uro-génitaux de souris âgées de 1 à 15 jours. L'expression de notre transgène et sa localisation pourraient alors être analysées par hybridation *in situ* en utilisant une sonde ARN complémentaire de la forme humaine de NPM1. Si le transgène est bien exprimé à ce stade de développement, nous pensons qu'il pourrait induire l'expression de l'EGF et ainsi favoriser l'apparition d'un plus grand nombre de bourgeons épithéliaux. A l'âge adulte, cela pourrait se traduire par une densification du réseau des acini qui expliquerait le poids supérieur des prostates provenant des souris ARR2PB-NPM1 par rapport aux souris sauvages.




Gène de l'EGF humain

Gène de l'EGF murin

Gène de l'EGF de rat

**Figure 48. Sites de fixation putatifs des facteurs de transcription dans les promoteurs du gène de l'EGF de l'homme, de la souris et du rat.**

Le seul site de fixation conservé dans les trois espèces correspond à un élément de réponse pour NFκB. Les données ont été extraites d'analyses de prédictions bioinformatiques (Qiagen©, http://www.sabiosciences.com/).

### Par quel mécanisme NPM1 induit-elle l'expression de l'EGF?

NPM1, avec la nucléoline, interagit avec un des membres de la famille Ras, K-Ras, pour solidifier son attachement à la membrane plasmique. Ce dernier est co-localisé avec avec le complexe Grb2/Sos ce qui permet son activation et , en cascade, celle de la voie des MAPK (Inder et al., 2009). Il est possible que cela mette en place une boucle d'amplification autocrine impliquant l'augmentation de l'expression de l'EGF. En effet, une analyse succincte du promoteur proximal de l'EGF nous a permis de mettre en évidence un site de fixation pour le facteur de transcription NF-κB chez l'homme, la souris ainsi que le rat, suggérant que celui-ci soit fonctionnel (**figure 48**). Or il a été montré que la voie des MAPK active NFκB dans les cellules épithéliales prostatiques (Kim et al., 2002). Il serait donc intéressant d'analyser l'impact d'une diminution de NFkB sur l'activité d'une construction contenant l'ADNc codant pour la luciférase cloné en aval du promoteur de l'EGF. Si la relation entre NFkB et l'expression de l'EGF est confirmée par cette approche, nous pourrions mesurer par ChIP l'enrichissement de NFκB sur le promoteur de l'EGF en fonction de la présence ou de l'absence de NPM1. Si ce facteur n'est pas impliqué, une analyse bioinformatique plus poussée du promoteur en utilisant un logiciel tel que Genomatix© nous révèlerait d'autres candidats potentiels.

### Par quel(s) mécanisme moléculaire NPM1 stimule-t-elle la prolifération *in vivo* ?

Au vu de nos résultats l'une des hypothèses que nous poursuivons est que NPM1, en interagissant et en inhibant Rb, lève la répression sur le facteur de transcription E2F1. Ce dernier pourrait alors stimuler l'expression de la cycline E pour permettre la progression du cycle cellulaire et ainsi conduire à une prolifération. Avant nos travaux, des équipes avaient déjà montré que la surexpression de NPM1 ou sa sumoylation sur le résidu lysine en position 263 étaient responsable de son interaction et de la séquestration de Rb dans le nucléole, libérant ainsi l'activité transcriptionelle de E2F1 (Liu et al., 2007; Takemura et al., 1999b). Nous avons essayé de confirmer l'interaction Rb/NPM1 par immunoprécipitation ainsi que la séquestration de Rb dans le nucléole par immunofluorescence à partir des prostates de nos animaux. Malheureusement, nos tentatives sont restées infructueuses, probablement à cause de la faible affinité de l'anticorps Rb utilisé. En attendant de se procurer un autre

anticorps et de mettre au point ses conditions d'utilisation expérimentales, nous avons tout de même montré que la surexpression de NPM1 induisait l'activation de gènes cibles de E2F1 « Rb-dépendants » (E2F1, Rb, cycline E et Pcna), alors que le gène codant pour l'Urokinase Plasminogen Activator, qui lui est « Rb-indépendant », était insensible. De manière intéressante, cette augmentation de l'expression des gènes cibles de E2F1 est associée à une forte diminution de l'expression de la Cycline D1. Ce « cyclin switch » a déjà été décrit dans le modèle de souris TRAMP (*TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*) (Maddison et al., 2004b). Chez ces souris, la surexpression de l'antigène T du virus SV40 interagit et inhibe les suppresseurs de tumeurs Rb et p53, menant ainsi à une prolifération anarchique des cellules épithéliales et à l'apparition de tumeurs prostatiques neuroendocrines extrêmement agressives (Gingrich et al., 1996). A cause de l'inactivation de Rb et donc de l'activation constitutive de E2F1, les cellules épithéliales ne restent que très peu de temps en phase G1 du cycle cellulaire pour passer rapidement en phase S. Or l'expression de la cycline D1 chute très rapidement au début de la phase S alors que celle de la cycline E reste élevée, ce qui explique le « cyclin switch » observé (Fukami-Kobayashi and Mitsui, 1999). Ce même phénomène a également été rapporté dans les cellules souches embryonnaires. Dans celles-ci, le niveau d'accumulation de la cycline E reste constamment élevé. La phase G1 du cycle cellulaire est alors éliminée et la réplication de l'ADN (phase S) débute dès la fin de la mitose, ce qui permet à ces cellules de proliférer très rapidement (Murray, 2004). Malgré ce défaut dans la régulation du cycle cellulaire, les souris PB-NPM1, à l'image des souris délétées pour Rb dans l'épithélium prostatiques, ne développent pas de tumeurs (Maddison et al., 2004c). L'explication provient probablement de la présence de P53 dans ces deux modèles de souris. En effet, dans des modèles de rétinoblastome et de cancer cutané, l'absence ou la perte d'hétérozygotie pour le locus p53 est nécessaire pour la tumorigenèse induite par la perte de Rb (Laurie et al., 2006; Pierce et al., 1998). De plus l'inactivation de p53 et de Rb dans l'épithélium prostatique par délétion ou par l'expression de l'antigène T du virus SV40 mène à l'apparition de cancers métastatiques très agressifs (Gingrich et al., 1996; Zhou et al., 2006). Cela s'explique par le fait que, suite à un stress oncogénique, p53 puisse déclencher une cascade de signalisation entrainant l'arrêt définitif du cycle cellulaire ou la mort de la cellule par apoptose. A la suite d'une analyse de TUNEL, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'index apoptotique au sein de l'épithélium des souris PB-NPM1 par rapport aux souris sauvages. L'hypothèse d'une sénéscence induite par

p53 pourrait être vérifiée en mesurant *in situ* l'activité de la ß-galactosidase, marqueur du processus de sénescence. Par la suite, nous envisageons de croiser nos souris PB-NPM1 avec des souris délétées pour p53 spécifiquement dans l'épithélium prostatique (PB-NPM1/p53$^{pc-/-}$). Si ces dernières présentent le même phénotype que des souris pour lesquelles Rb et p53 sont inactivées, nous aurons alors un argument supplémentaire en faveur de la théorie d'inhibition de Rb par NPM1. Les tumeurs induites par l'inactivation de Rb et de p53 présentent un phénotype neuroendocrine, la forme la plus rare et la plus agressive du cancer de la prostate (Beltran et al., 2011). Il serait donc important d'analyser la differenciation neuro-endocrine dans les prostates des souris PBNPM1/p53$^{pc-/-}$ grâce à des marqueurs tels que la chromogranine, la synaptophysine ou encore l'énolase neuronale (NSE, *Neuron Specific Enolase*). Si ces animaux développent bien des tumeurs neuro-endocrines, nous pourrions analyser la présence de ces deux altérations dans des échantillons d'hyperplasies bénignes, d'adénocarcinomes et de tumeurs neuroendocrines humaines, pour voir si la corrélation existe également chez l'homme. Ces dernières données permettront d'accroitre nos connaissances sur la caractérisation moléculaire très peu fournie de ce type de tumeur létales.

### NPM1, cycline E et p27kip1, des liaisons dangereuses ?

Le point de restriction correspond à une étape critique du cycle cellulaire. Il divise ainsi la phase G1 en 2 : la phase G1 précoce qui dépend pour sa progression de stimuli mitogéniques, et la phase G1 tardive qui en est indépendante. Ainsi, au delà de ce point, la cellule s'engage de façon irréversible vers la division cellulaire, ou la mort si des anomalies génétiques trop importantes sont détectées (Johnson and Skotheim, 2013). Il n'est donc pas étonnant que les gènes impliqués dans le contrôle du passage du point de restriction soient fréquemment altérés dans la plupart des cancers, dont celui de la prostate (Lopergolo and Zaffaroni, 2009). Le point de restriction coïncide avec la libération de l'activité transcriptionnelle de E2F1 suite à l'inhibition de Rb et à l'expression des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et au passage en phase S. La protéolyse du CKI p27$^{kip1}$ grâce à deux de ces gènes, Cycline E et Skp2, est une étape essentielle pour passer le point de restriction. En effet, sa phosphorylation par le complexe Cycline E/CDK2 permet son ubiquitinylation par le complexe E3 ligase SCFskp2

et sa destruction *via* le protéasome. Nos données révèlent que la surexpression de NPM1 *in vivo* est corrélée à une augmentation de l'expression de la cycline E et une diminution de l'accumulation protéique de $p27^{kip1}$. De plus, l'expression de NPM1, de la cycline E et de Skp2 est augmentée dans les carcinomes prostatiques humains (Grasso et al., 2012). Ces données suggèrent que la surexpression de NPM1 permet l'expression de la Cycline E ainsi que de Skp2, entrainant alors la dégradation de $p27^{kip1}$. Afin de vérifier cette hypothèse, nous proposons de mesurer le niveau d'ubiquitinylation de $p27^{kip1}$ en fonction des niveaux de NPM1 dans un modèle de cellules de cancer de la prostate. Le niveau d'expression de NPM1 sera augmenté ou diminué grâce à l'utilisation de vecteurs d'expression ou d'ARN interférents, respectivement. Dans ces conditions, la co-transfection de $p27^{kip1}$ étiquetée avec l'épitope HA (HA-p27kip1) et de l'ubiquitine fusionnée à six résidus d'histidine (ubiquitine-6his) autorisera une approche de chromatographie d'affinité sur bille d'agarose couplée au nickel pour purifier les protéines liées à l'ubiquitine. Celles ci seront analysées par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-HA afin de déterminer le degré d'ubiquitinylation de $p27^{kip1}$ en fonction de l'accumulation de NPM1. Les mêmes conditions expérimentales seront répétées en diminuant l'expression de Skp2 par interférence ARN pour vérifier son rôle d'ubiquitine-ligase envers $p27^{kip1}$. Si nos résultats montrent que NPM1 induit bien une ubiquitinylation de $p27^{kip1}$ par le biais de Skp2, nous pourrons traiter nos souris avec des inhibiteurs de Skp2, récemment décrits dans la littérature (Wu et al., 2012). Si la diminution de $p27^{kip1}$ induite par NPM1 est dépendante de Skp2, l'administration de ces composés devrait permettre de restaurer les niveaux normaux de $p27^{kip1}$ dans les prostates de nos souris transgéniques.

L'observation d'une diminution de $p27^{kip1}$ lorsque NPM1 est surexprimé est intéressante d'un point de vue clinique. En effet, il est depuis longtemps connu que la perte de $p27^{kip1}$ est associée à l'agressivité du cancer de la prostate et à sa résistance aux traitements (Tsihlias et al., 1998; Yang et al., 1998). De plus, la perte d'expression de $p27^{kip1}$ est souvent corrélée à une augmentation de l'expression de Skp2 chez l'homme (Drobnjak et al., 2003; Yang et al., 2002). Il serait donc intéressant de corréler l'expression de ces deux marqueurs à celle de NPM1 et de la cycline E dans des échantillons tumoraux prostatiques humain. Cela nous permettrait de vérifier l'existence de l'axe NPM1-Cycline E-Skp2-p27 chez l'homme. La position en amont de NPM1 au sein de cet axe en ferait une cible de choix pour développer

de nouvelles molécules thérapeutiques. Enfin, la comparaison de ces données avec celles concernant l'agressivité des cancers, la survie des patients ou encore la réponse aux traitements permettrait peut-être de placer NPM1 comme un nouveau facteur pronostique quant à l'évolution de la maladie.

# *Annexes*

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

# NPM1 Silencing Reduces Tumour Growth and MAPK Signalling in Prostate Cancer Cells

**Gaëlle Loubeau[1,2,3,4], Rafik Boudra[1,2,3,4], Sabrina Maquaire[1,2,3,4], Corinne Lours-Calet[1,2,3,4], Claude Beaudoin[1,2,3,4], Pierre Verrelle[5,6], Laurent Morel[1,2,3,4]***

**1** Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, Clermont-Ferrand, France, **2** CNRS, UMR 6293, GReD, Clermont-Ferrand, France, **3** Inserm, UMR 1103, GReD – Genetics, Reproduction and Development, Clermont-Ferrand, France, **4** CRNH, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, **5** Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 7283 CREaT -Cancer Resistance Exploring and Targeting, Clermont-Ferrand, France, **6** Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France

## Abstract

The chaperone nucleophosmin (NPM1) is over-expressed in the epithelial compartment of prostate tumours compared to adjacent healthy epithelium and may represent one of the key actors that support the neoplastic phenotype of prostate adenocarcinoma cells. Yet, the mechanisms that underlie NPM1 mediated phenotype remain elusive in the prostate. To better understand NPM1 functions in prostate cancer cells, we sought to characterize its impact on prostate cancer cells behaviour and decipher the mechanisms by which it may act. Here we show that NPM1 favors prostate tumour cell migration, invasion and colony forming. Furthermore, knockdown of NPM1 leads to a decrease in the growth of LNCaP-derived tumours grafted in Nude mice *in vivo*. Such oncogenic-like properties are found in conjunction with a positive regulation of NPM1 on the ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2) kinase phosphorylation in response to EGF (Epidermal Growth Factor) stimulus, which is critical for prostate cancer progression following the setting of an autonomous production of the growth factor. NPM1 could then be a target to switch off specifically ERK1/2 pathway activation in order to decrease or inhibit cancer cell growth and migration.

**Citation:** Loubeau G, Boudra R, Maquaire S, Lours-Calet C, Beaudoin C, et al. (2014) NPM1 Silencing Reduces Tumour Growth and MAPK Signalling in Prostate Cancer Cells. PLoS ONE 9(5): e96293. doi:10.1371/journal.pone.0096293

**Editor:** Lucia R. Languino, Thomas Jefferson University, United States of America

**Received** October 9, 2013; **Accepted** April 6, 2014; **Published** May 5, 2014

**Copyright:** © 2014 Loubeau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by the Region Auvergne. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: laurent.morel@univ-bpclermont.fr

## Introduction

The progression of prostate cancer is associated with alterations of key genes that control the cell homeostasis, their deregulation and/or amplification leading to increased cell proliferation and invasive capacities. We previously identified *NPM1* (nucleophosmin 1) as one of the genes whose expression is significantly increased in prostate tumour cells when compared to non-tumour adjacent tissue [1], indicating that NPM1 could act as an enhancer of prostate cancer progression. NPM1 is a major multifunctional phosphoprotein accumulated at high level in the granular region of the nucleolus and is able to shuttle between the nucleolus, the nucleoplasm and the cytoplasm [2]. Because of its nucleolar localization, its intrinsic RNase activity and its association with maturing pre-ribosomal ribonucleoproteins, NPM1 has been first proposed to regulate ribosomal RNA transcription and processing. However, NPM1 has been more recently demonstrated to display chaperone activities. It binds to histones, favours DNA-histone assembly, mediates nucleosome formation and relaxes chromatin [3] thereby controlling gene expression. NPM1 also interacts with a wide range of maturating proteins to induce their proper folding in the active state. Among those proteins, there are cell growth regulators such as the oncoprotein MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog). Furthermore, NPM1 binds to and inhibits the tumour suppressor proteins P53 and Rb (Retinoblastoma) [4] highlighting that NPM1 could have a role in oncogenic processes. Some of the NPM1 specific interactions with cell cycle regulators have already been clarified, but its role in the behaviour of solid tumour cells, as well as its integration in the cell signalosome is yet to be determined. Here we address the question whether NPM1 could potentiate proliferation, migration and invasion capacities of prostate cancer cells. In this study, we report that the level of NPM1 in prostate cancer cells specifically regulates EGF expression and the MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) signalling pathway. We also show that high levels of NPM1 positively impact cell proliferation and cell migration, thus participating in the control of tumour growth.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All animals were maintained in a controlled environment and animal care was conducted in compliance with the national standard policies (C 63 014.19). All experiments were approved the Auvergne Regional Ethics Committee, France (protocol CE09-08).

### Cell culture and stable transfection

LNCaP (Lymph Node Carcinoma Prostate) cells were cultured in phenol red Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640, Life Technologies, Saint-Aubin, France) supple-

mented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and incubated in standard conditions (37°C, 5% $CO_2$).

Cells were infected according to manufacturer's instructions with lentiviral particles containing either three target-specific constructs (shNPM1) or unrelated sequences (shScr, Srambled) (sc-29771-V, Santa Cruz, Heidelberg, Germany). Following infection, puromycine (1 µg/ml) was added to the culture medium in order to select stably transduced cells and to perform monoclonal selection.

## Wound healing migration assay

Control LNCaP cells (shScr) and NPM1 knocked-down LNCaP cells (shNPM1) were seeded in 24-wells plates and grown to confluence for 24 hours. The monolayer culture was then scrape-wounded with a sterile micropipette tip in order to create a gap of constant width. Cellular debris were washed with Phosphate Buffered Saline 1× (PBS) (Life Technologies). Cells were next grown in RPMI 1640 10%FBS that was replaced 12 hours after wounding and then every 24 hours. LNCaP cell migration was photographed into the wounded region at 24, 48 and 72 hours following the scraping (100× magnification) and remaining wound areas were then quantified with ImageJ free software.

## Boyden Chamber invasion assay

For cell migration assay, $3\times10^5$ shScr and shNPM1 LNCaP cells cultured in serum free RPMI 1640 were seeded into the upper well of a transwell chamber system. Medium containing 10% FBS was added to the lower chamber. After incubation for 24 to 48 hours, the non-migrated cells were removed with the upper well. The cells that migrated to the bottom insert surface were then fixed with methanol and stained with a 5% Giemsa solution. Five random fields were photographed (200× magnification) and cells were quantified with ImageJ free software as the mean ± SD of colonies counted per field.

## Soft agar colony formation assays

Six-wells plates were prepared with 2 ml/well of a warm solution of 0.6% low melting agarose (Agarose Sea Plaque FMS product low melting, 50101, LONZA, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) in RPMI 1640, 10%FBS. After solidification, $5\times10^3$ of shScr or shNPM1 LNCaP cells were plated per well in a solution of 500 µl of 0.3% agarose in RPMI 1640 medium containing 10%FBS. The plates were then incubated in RPMI 1640, 10%FBS medium that was changed every 3–4 days. After 2 weeks, colony formation was quantified using the ImageJ free software: colonies were photographed (100× magnification) on 5 different fields and the relative colony number was calculated as the mean ± SD of the colonies counted per field.

## Clonogenic assay

$1\times10^4$ shScr and shNPM1 LNCaP cells were seeded in 6-wells plates in RMPI 1640, 10%FBS medium. Medium was changed every 3 days. After 2 weeks, the medium was removed and cells were washed with PBS 1× then fixed with methanol and stained with a 5% Giemsa solution. Foci formation was evaluated and colony formation was quantified using the ImageJ free software: colonies were photographed (100× magnification) on 5 different fields and the relative colony number was calculated as the mean ± SD of the colonies counted per field.

## Cell proliferation assay

Cell proliferation was determined using Cell proliferation ELISA BrdU (Bromodéoxyuridine) colorimetric kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Briefly $5\times10^3$ shScr or shNPM1 LNCaP cells per well were seeded in a 96-wells plate. They were cultured for 24 hours in RPMI 1640 medium, 10% FBS in the presence of absence of EGF (E9644, Sigma). Then, BrdU labelling solution was added at a final concentration of 10 µM for 2.5 hours. After fixation, the cells were incubated with anti BrdU-POD solution for 1 hour, and absorbance was measured at 655 nm.

## Western Blotting

Proteins were extracted using HEPES 20 mM, NaCl 0.42 M, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, and Nonidet P-40 1% supplemented with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM (Sigma), protease inhibitors (Complete 1X; Roche), NaF 0.1 mM, and $Na_3VO_4$ 0.1 mM (Sigma). Forty µg of total proteins were then subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-ECL membrane (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Detections were performed using antibodies raised against β-actin (A2066, Sigma), NPM1 (sc-6013-R, Santa Cruz, Heidelberg, France), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, NB100596, Novus), phospho-EGFR Tyr 1068 (2236S, Cell Signaling, Ozyme), ERK1/2 (M5670, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), phospho-ERK1/2 p42/44 (9101S, Cell Signaling, Ozyme) AKT (9272, Cell signaling, Ozyme), phospho-AKT Ser 473 (2118-1 Epitomics) and revealed with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Immunoglobulin G, P.A.R.I.S, Compiègne, France) using a Western Lightning System kit (PerkinElmer, Villebon sur Yvette, France). Signal quantification was performed using Quantity One software (Bio-Rad).

## Promoter construct, transfection and luciferase assays

The human EGF promoter fragment (−392/+123) was generated with the following primers: 5′-GAT-CAAGCTTGGGCTGAAGGTGAACTATCTTTAC-3′ (Forward) and 5′-GATCCTCGAGGACAGAGCAAGG-CAAAGGCTTAGA-3′ (Reverse), then cloned into the HindIII/XhoI restriction sites in a pGL3-basic vector (Promega, Charbonnieres, France). The constitutively active MAP kinase kinase kinase1 (caMEKK1) expression plasmid was a kind gift from Dr. Dirck Bohmann (University of Rochester Medical Center, Rochester, USA). shScr and shNPM1 LNCaP cells were transfected 24 h after seeding with the pGL3-hEGF and/or caMEKK1 plasmids in OPTI-MEM using Metafectene transfectant according to the manufacturer's instructions (Biontex, Martinsried-Planegg, Germany). Twenty-four hours after transfection, cells were lysed into Reporter lysis buffer 1× (Promega) and the luciferase activity was measured using the Genofax A luciferase assay kit (Yelen, Ensue la Redonne, France).

## Preparation of RNA and real-time quantitative PCR

Total cellular RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies) and cDNA was synthesized with 200 U of Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Promega), 5 pmol of random primers (C1181, Promega), 40 U RNAsin (Promega), and 2.5 mM deoxynucleotide triphosphate. mRNA levels were quantitated on a Mastercycler ep Realplex (MasterCycler2, Eppendorf, Le Pecq, France) with Mesagreen QPCR Mastermix Plus for SYBR (Promega). Sequences of the primers are the following: NPM1, 5′-ATGGAAGATTCGATGGACATGG-3′ (Forward) and 5′-CGAGAAGAGACTTCCTCCACTGC -3′ (Reverse); PCNA, 5′-TGCCTTCTGGTGAATTTGCACGT-3′ (Forward) and 5′- ACCGTTGAAGAGAGTGGAGTGGC-3′ (Reverse), Actin, 5′-CGCGAGAAGATGACCCAGATC-3′ (Forward) and 5′TCACCGGAGTCCATCACGA-3′ (Reverse) (Eurogentec, An-

gers, France). For human EGF, primers were purchased from Qiagen (PPH00137B-200, Qiagen, Courtaboeuf, France).

### *In vivo* Nude mouse tumour xenograft model

ShScr and shNPM1 LNCaP cells were grown to confluency then resuspended in matrigel (BD matrigel basement membrane matrix phenol red free, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) to a concentration of $9\times10^6$ cells/ml. Three hundred µl of the cell suspension (approximately $3\times10^6$ cells) were injected subcutaneously in 6 weeks old Nude mice (Swiss NU/NU, Charles River, L'Arbresle, France). Disease progression was monitored daily, based on a set of general wellness criteria set by the animal care committee, and body mass was recorded thrice a week until a predetermined endpoint was reached. Endpoints included: dehydration and/or weight loss of over 10%, any evidence of respiratory distress, body weight increase of over 5 g from the average. Tumours were measured thrice a week using an electronic caliper since palpable tumours were detectable. Mice were killed by cervical dislocation under gas anesthesia. Xenografts were then removed, weighted and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA and protein analyses.

### Statistical Analysis

All assays were done in at least 3 independent experiments. Standard errors were calculated for each mean, and statistical differences between groups were determined by Student's *t* test or the non-parametric Mann & Whitney U test using Prism software. For longitudinal analyses, a random-effect model (mixed model) was considered to study the fixed effects group (NPM1 expression), time-points and interaction group × time taking into account between and within subject variability (random effects slope and intercept).

## Results

### NPM1 regulates clonogenic and proliferative capacities of prostate tumour cells

In order to analyse the impact of NPM1 on prostate tumour cell proliferation, we chose a knockdown strategy and generated LNCaP cell sublines stably expressing control (shScr) or NPM1 specific shRNA (shNPM1). As shown in figure 1a, NPM1 mRNA level decreases by more than 50% and NPM1 protein expression by more than 30% in shNPM1 cells, but this is not associated with modifications in cell morphology. However, NPM1 knockdown alters the ability of LNCaP cells to form colonies after seeding at low confluency (figure 1b). This decrease of clonogenic capacities coincides with a decrease in the cell proliferative potential (figure 1c). Indeed, the down-regulation of NPM1 leads to a 30% decrease in BrdU incorporation and this is associated with a 60% decrease in the mRNA level of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), a key marker of cell proliferation (figure 1d). Interestingly, NPM1 knockdown does not alter cell survival as evaluated by PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) cleavage analyses by western blotting (figure S1), thus indicating that this decrease in the proliferation rate is not associated with an increase of apoptosis. These results consequently show that NPM1 is involved in the increase of proliferation and clonogenic capacities of prostate tumour cells.

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

The above results demonstrate that NPM1 exerts a control on the clonogenic capacities of prostate cancer cells and suggests that, besides its effect on the cell proliferative rate, it could also contribute to both tumour growth and aggressiveness. To further evaluate the role of NPM1, we examined the invasion and migration capacities of shNPM1 LNCaP cells. The knockdown of NPM1 significantly decreased the invasion of LNCaP cells through matrigel-coated filters by 40% (figure 2a). We further assessed the LNCaP cells migration ability by physically wounding cells plated on the cell culture plates. As shown in Figure 2b, at 72 h after being scrubbed, shNPM1 cells were unable to recolonize denuded zone as faster as did the control cells. To test whether the decrease of migration and invasion capacities is accompanied by a decrease of the three-dimensional growth abilities of shNPM1 LNCaP cells, *in vitro* tests in soft agar were performed (figure 2c). Decrease in NPM1 in LNCaP cells almost abolishes their ability to form 3-D colonies. These results from *in vitro* assays strongly suggest that NPM1 regulates the migratory and invasive properties of prostate cancer cells.

To further determine the role of NPM1 in prostate cancer, we analysed tumourigenesis of the shNPM1 LNCaP and shScr LNCaP prostate cancer cell lines *in vivo* following subcutaneous injection in the flank of male nude mice. ShNPM1 cells produce smaller tumours (figure 2d,e) and, contrary to shScr LNCaP cells, are more likely to produce no tumour at all when grafted (figure 2e). In detail, tumours initiated from LNCaP control cells appear at 22 days post-injection whereas tumours originating from LNCaP shNPM1 cells are noticeable only at 24 days post-injection. Furthermore, growth curves never get paralleled even after 29 days (figure 2d). Thus, tumours initiated from NPM1 knocked-down cells remained smaller than control tumours with 85% decrease of the average tumour volume (figure 2e). This important decrease of tumour volume results in a 95% decrease of tumour weight from LNCaP shNPM1 cells (figure 2g). This decrease is unlikely due to a loss of expression of the anti-NPM1 shRNA since all shNPM1 tumours preserve a 90% decrease in NPM1 accumulation (figure 2f). Taken together, these data clearly demonstrate that NPM1 is involved in prostate tumour growth *in vitro* and *in vivo*.

### NPM1 is involved in the control of EGF expression

In order to better understand how NPM1 can promote prostate cancer cell behaviour, we performed a qPCR Array analysis (RT2 ProfilerTM array, PAHS-121A-2, Qiagen) and determined the nature of genes whose transcription levels are modulated by the knockdown of NPM1 (data not shown). Among the 84 genes spotted on the array, the Epidermal Growth Factor (EGF) mRNA accumulation was the most significantly decreased in LNCaP shNPM1 cells. This modulation of EGF expression does not result from a global inhibitory effect on gene expression as most of the genes are unaffected or up-regulated when NPM1 is decreased (data not shown). This result was confirmed by RT-qPCR assays as EGF mRNA accumulation is decreased by 40% in LNCaP shNPM1 cells (figure 3a). Moreover, to test the relative activity of the EGF promoter's gene activity in LNCaP shSCR and shNPM1 cells, we transfected these cells with a phEGF-luciferase reporter plasmid. Knockdown of NPM1 induces a decrease in EGF promoter activity, showing that the effect of NPM1 is likely to be exerted at the transcriptional level (figure 3b). These results suggest that NPM1 controls directly or indirectly EGF expression. As EGF

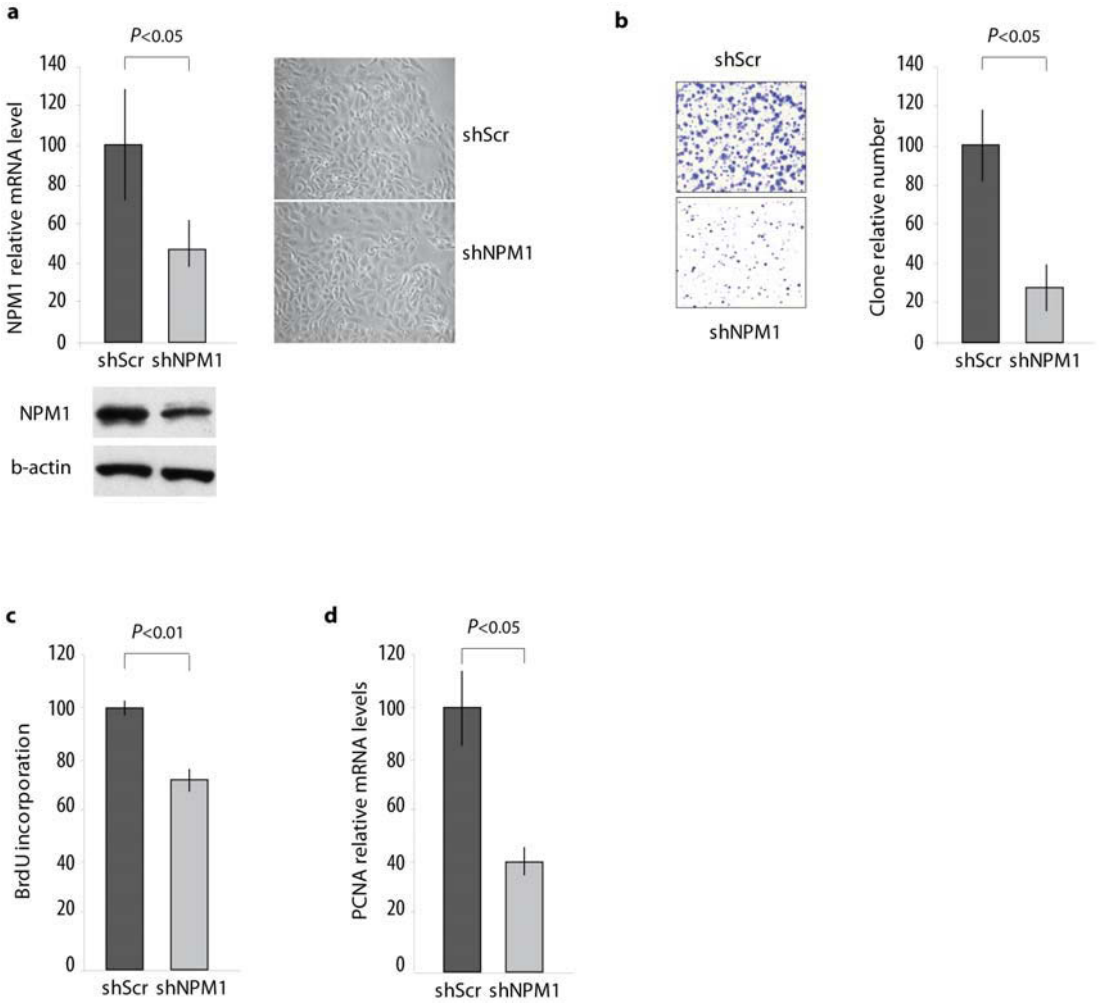



**Figure 1. Regulation of LNCaP cell clonogenic capacities and proliferation rate by NPM1.** (**a**) NPM1 knockdown does not alter LNCaP cells morphology. LNCaP cells were stably transfected with control shRNA (shScr) or specific NPM1 shRNA (shNPM1). NPM1 mRNA and protein levels were analysed by RT-qPCR and western blotting respectively. Morphology of cells was observed by inverted microscopy and photographed. (**b**) NPM1 knockdown inhibits LNCaP cells clonogenicity. Cells were seeded at low confluence over one week, then fixed with methanol and stained with 5% Giemsa blue before microscopic observation. Pictures are representative of three independent experiments with consistent results. The graph represents the number of cell clones (>50 cells) in the shNPM1 condition, calculated as the mean ± SD of the number of clones counted per field, on 5 random fields, using the ImageJ free software and expressed relatively to the number of clones counted in the control condition. (**c, d**) NPM1 controls proliferation of prostate cancer cells. Five thousand cells were seeded per well in a 96-wells plate and cultured for 48 hours. (**c**) Cells were then incubated with a BrdU labeling solution for 2.5 hours and BrdU incorporation was measured by densitometric analysis at 655 nm. (**d**) Proliferation was also analysed by RT-qPCR assay by evaluating PCNA relative mRNA level accumulation normalized using β-actin mRNA level. All data are representative of at least three independent triplicate experiments and BrdU incorporation as mean of triplicate experiments of 96 points each. Data are expressed as the mean ± SD.
doi:10.1371/journal.pone.0096293.g001

is known to specifically activate the EGF receptor (EGFR), we investigated whether the activation of the EGFR complex as well as the activation of its downstream effectors, ERK1/2 and AKT, is modulated by NPM1 expression level. Based on the analysis of their phosphorylation status, we show that the activation of EGFR (pEGFR) and of ERK1/2 (pERK1/2) is dramatically decreased or almost abolished when the expression of NPM1 is inhibited (figure 3c). Interestingly, AKT phosphorylation is less sensitive to such an inhibition, suggesting that NPM1 specifically impacts the MAPK pathway (figure 3c). These effects of NPM1 on EGF expression and ERK1/2 pathway strongly suggest that NPM1 could be involved in the setting of the EGF self-regulation loop.

## NPM1 specifically potentiates the MAPK pathway activity to promote proliferation and migration capacities of prostate cancer cells

The above data demonstrate that NPM1 is involved in the control of EGF expression, a growth factor that controls the MAPK pathway and promotes tumorigenic behaviour of prostate cancer cells. So, we wondered if it was the reason why shNPM1 LNCaP cells were showing decreased tumorigenic behaviour. We thus investigated whether an exogenous intake of EGF could rescue the activation of the EGF/EGFR pathway effectors and subsequently increase LNCaP cells proliferation and migration. Control (shScr) or NPM1 knocked down (shNPM1) LNCaP cells

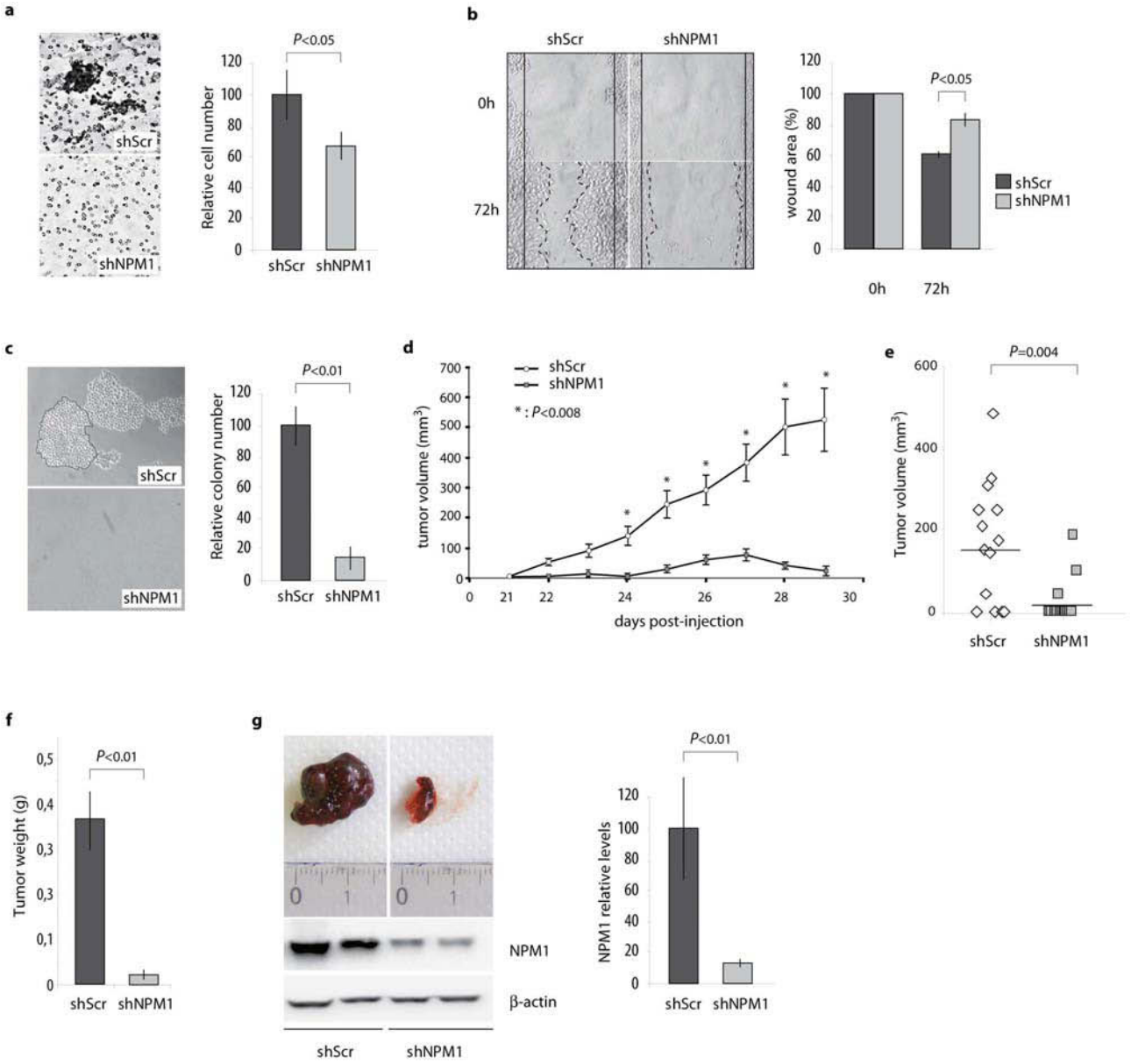



**Figure 2. NPM1 knockdown impacts migration, invasion and growth of prostate cancer cells.** (a) NPM1 controls migration capacities of LNCaP cells. Cells were seeded at confluence in order to create a wound 24 hrs later. Wound recolonization was observed after 72 hours of culture by inverted microscopy and photographed. Histograms show wound area quantification using the ImageJ and pictures are representative of three independent experiments with consistent results. (**b**) NPM1 knockdown inhibits the invasive potential of prostate cancer cells. shScr and shNPM1 LNCaP cells were seeded at confluency in RPMI 1640 serum free medium on matrigel coated microporous membrane. 48 hrs later, migrated cells present on the opposite side of the membrane were fixed and stained with 5% Giemsa blue and observed at microscope (200× magnification). The graph represents the number of cells in the shNPM1 condition, calculated as the mean ± SD of the number of cells counted per field, on 5 random fields, using the ImageJ free software and expressed relatively to the number of cells counted in the control condition. (**c**) NPM1 impacts three-dimensional growth of prostate cancer cells. Control or NPM1 knocked down cells were seeded at low confluency on agarose/RPMI 1640 10% FBS for 2 weeks. Number and size of the emerging clones were then observed under inverted microscope (x100) and photographed. The graph represents the number of cell clones (>50 cells) in the shNPM1 condition, calculated as the mean ± SD of the number of clones counted per field, on 5 random fields, using the ImageJ free software and expressed relatively to the number of clones counted in the control condition. (**d, e, f,g**) NPM1 knock-down abrogates tumourigenicity of LNCaP cells when injected in nude mice. shScr (n = 14) and shNPM1 (n = 14) LNCaP cells were subcutaneously grafted on nude mice and tumour volume was measured every 2 days following engraftment (**d**). Graph in (**e**) is the quantitation of shScr and shNPM1-derived tumours volume at day 24 post-injection. NPM1 relative expression level was evaluated by western blotting in tumours when mice were sacrified (f) and tumour weight was measured (g). The data are representative of at least three independent experiments and are expressed as the mean ± SD.

doi:10.1371/journal.pone.0096293.g002

were starved in order to switch off the signalling pathways and then treated with EGF.

Western blot analyses show that an exogenous EGF supplementation leads to the phosphorylation, *i.e.*, the activation of both

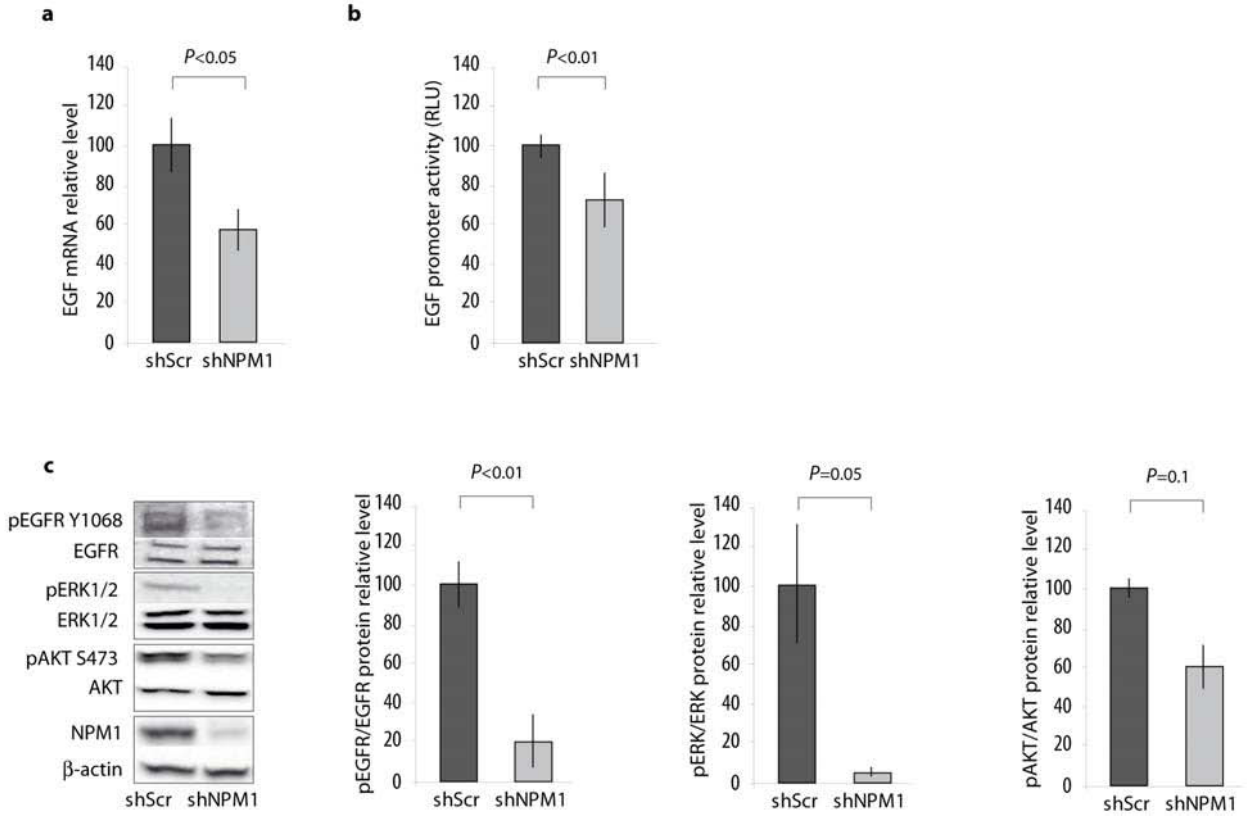



**Figure 3. NPM1 knockdown decreases EGF expression.** (**a**) NPM1 controls EGF expression. Relative EGF mRNA levels compared to β-actin were analyzed by RT-qPCR in LNCaP cells expressing control (shScr) or NPM1 specific shRNA (shNPM1). (**b**) NPM1 control EGF promoter activity. shScr and shNPM1 LNCaP cells were transfected with the phEGF-luciferase reporter plasmid. EGF promoter activity was evaluated by measuring the luciferase activity 24 hours later. Results of the assay were standardized using the CMV promoter as control and expressed as fold-induction over control cells (shScr). (**c**) NPM1 controls activation of the EGF/EGFR pathway downstream effectors. Proteins, extracted from shScr and shNPM1 LNCaP cells cultured in RPMI 1640 10%FBS, were electrophoresed by SDS-PAGE. Transferred membranes were immunoblotted with indicated antibodies. Histograms show the band quantification reported to the β-actin level. Blots are representative of three independent experiments with consistent results. Data are representative of at least three independent experiments and are expressed as the mean ± SD.
doi:10.1371/journal.pone.0096293.g003

the EGF receptor and one of its downstream target, AKT, in both shScr and shNPM1 cells. On the contrary, and most interestingly, phosphorylation of ERK1/2 is specifically impaired in shNPM1 cells (figure 4a). In agreement with this result, addition of exogenous EGF is unable to restore migration and invasion capacities of shNPM1 LNCaP cells in the corresponding assays (figure 4b,c). These results clearly demonstrate that NPM1 is specifically required for the activation of the MAPK signalling pathway and that the potentiation of this transduction pathway is involved in the control of proliferation and migration capacities of prostate cancer cells.

### NPM1 acts upstream of MEK1 and downstream of EGFR to activate the MAPK pathway, for the control of an EGF self-regulation loop in prostate cancer cells

As phosphorylation of ERK1/2 is specifically impaired in shNPM1 cells even in the presence of EGF, it suggests that, in the MAPK pathway, NPM1 acts upstream of ERK1/2. To identify the effector(s) of the EGFR-induced signalling pathway on which NPM1 may act, and to determine whether NPM1 action is direct or not on the EGF gene promoter, we performed transfection assays with a constitutively active form of MEKK1 (caMEKK1): caMEKK1 phosphorylates ERK1/2 kinase MEK1/2, and thereby, constitutively activates ERK1/2 in the absence of MEK1/2 inhibition. In shScr LNCAP cells, caMEKK1 transfection induces the phosphorylation of ERK1/2. In shNPM1 LNCaP cells caMEKK1 transfection induces a similar effect, thus rescuing the EGFR signalling pathway (figure 5a). This result suggests that NPM1 targets the MAPK pathway downstream of EGFR but upstream of MEK1/2 in order to regulate ERK1/2. Moreover, cotransfection of the caMEKK1 construct with a phEGF-luciferase reporter plasmid also rescues the EGF promoter activity (figure 5b) in LNCaP cells knocked-down for NPM1. These results demonstrate that 1- it is unlikely that NPM1 directly transactivates the EGF promoter in prostate cancer cells. 2- NPM1 may rather stimulate the MAPK signalling pathway to enhance the transcription of the EGF gene. 3- Phosphorylation data on AKT and ERK1/2 strongly suggest that NPM1 acts at the level of MEKK1 or Ras/Raf in this pathway.

## Discussion

NPM1 plays an essential role in cell growth and proliferation. Amongst others, it favours cell cycle progression, ribosome biogenesis and centrosome duplication [5–7]. Accordingly, a correlation between increased NPM1 expression levels and tumour progression has been established in a wide set of solid

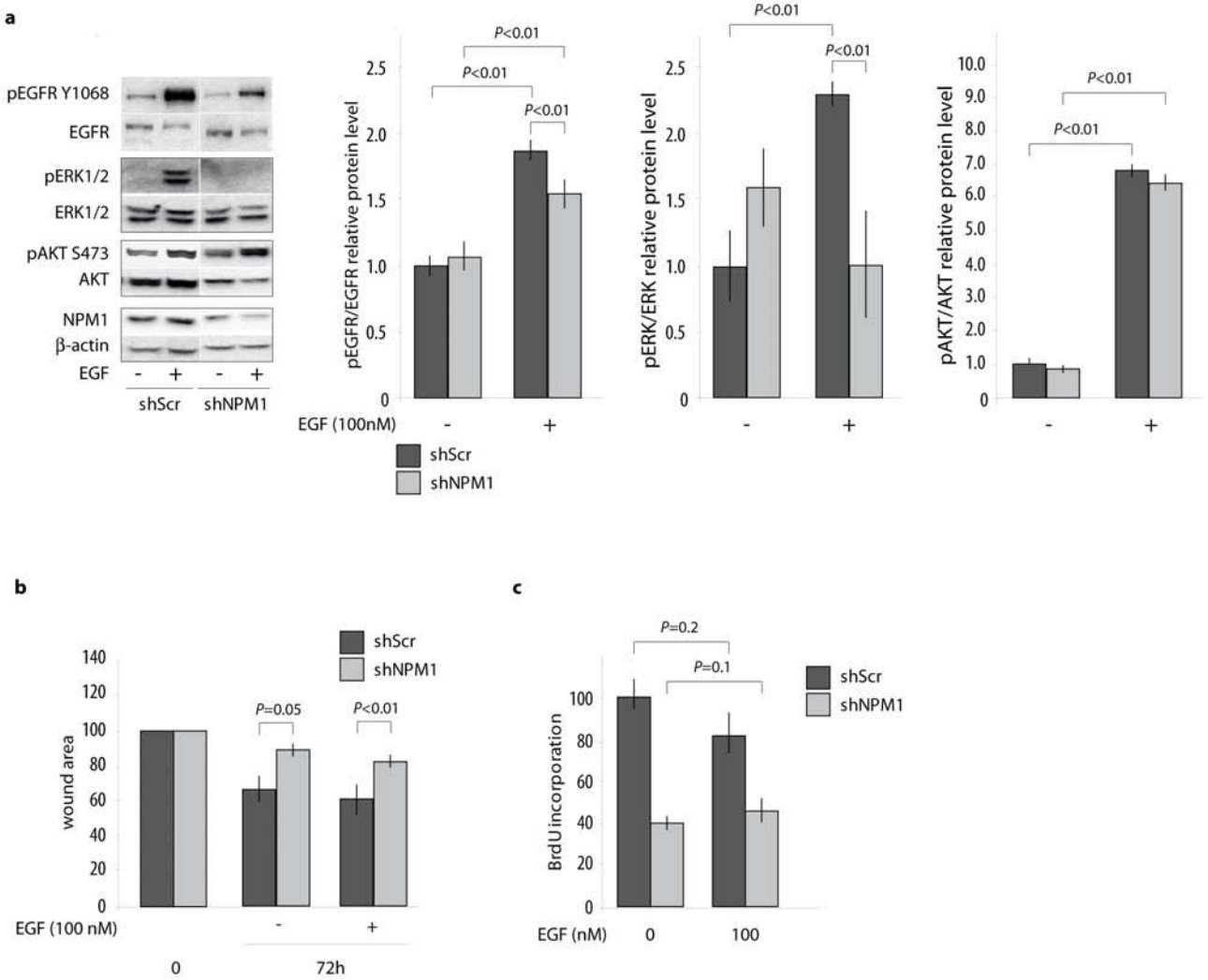



**Figure 4. NPM1 knockdown in prostate cancer cells reduces proliferation and migration capacities by inhibiting the EGF/EGFR pathway activity.** (a) NPM1 down-regulation inhibits EGF induced ERK1/2 pathway activity. shScr and shNPM1 LNCaP cells were treated with 100 nM EGF and phosphorylation of the EGF/EGFR pathway effectors was analysed using Western Blotting. Histograms show the band quantification reported to the β-actin level. The blot is representative of three independent experiments with consistent results. (b) Despite EGF treatment, migration capacities of LNCaP decreased for NPM1 were not restored. Wound closure was analysed 72 hours after continuous treatment with 100 nM EGF. Cells were observed under inverted microscope and photographed. Histograms show wound area quantification using ImageJ. (c) EGF treatment does not rescue proliferation of NPM1 knockdown LNCaP cells. BrdU incorporation assay was performed in shScr and shNPM1 LNCaP 24 hours after 100 nM EGF treatment. Densitometry was measured at 655 nm. The data are representative of at least three independent experiments and are expressed as the mean ± SD.
doi:10.1371/journal.pone.0096293.g004

tumours of diverse histological origins such as in gastric- [8,9], colon [9], kidney [10] or ovary cancers [11]. Nevertheless several studies revealed that, paradoxically, NPM1 is able to both act as a tumour suppressor and as a proto-oncogene during tumourigenesis [12]. On one hand, NPM1 participates to the maintenance of chromosome stability and regulates ARF activity [13] and, on the other hand, NPM1 promotes the inhibition of several tumour suppressors including P53 or Rb, and the activation of the proto-oncogene c-Myc to enhance its transforming activity [14]. Our previous findings showed that the molecular chaperone NPM1 is over-expressed in prostate carcinoma tissue, compared to control adjacent tissue where it stimulates the androgen-dependent transcription [1]. We now wanted to more specifically investigate whether this deregulation of NPM1 expression may act on prostate tumour cells invasive and migration capacities. In this regard, NPM1 was knocked-down in the LNCaP prostate cancer cell lines whose tumour characteristics such as migration, proliferation and invasion capacities are well established. We show that reducing NPM1 expression in LNCaP cells alters the clonogenic and proliferation capacities of these prostate cancer cells as well as their ability to migrate and to invade matrix-containing supports. Accordingly, such cells, when grafted in nude mice, lead to the development of a lower number of also smaller tumours. Conversely, accumulation of NPM1 in LNCaP cells stably expressing an inducible transgene encoding NPM1, increases both clonogenic and proliferation capacities of these cells (figure S2). These results demonstrate that the expression level of NPM1 acts as a controller of the proliferative and of the migration

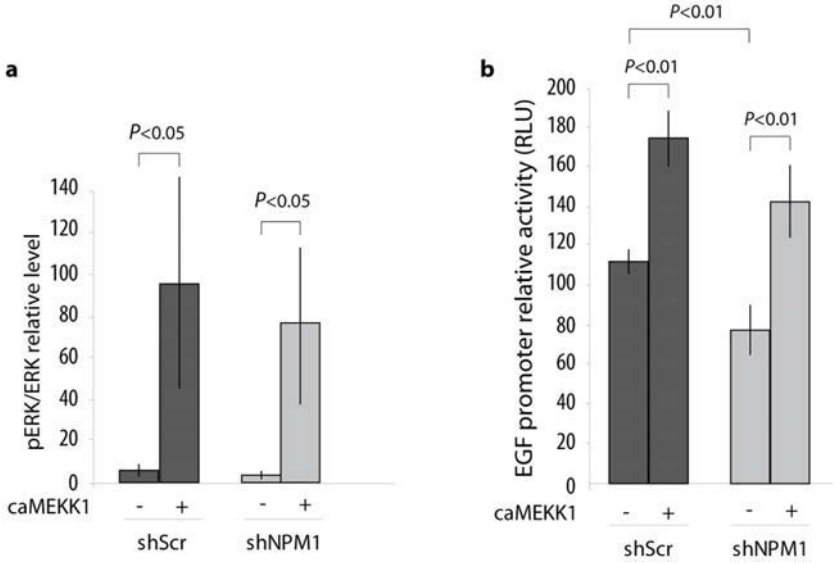



**Figure 5. NPM1 does not act directly on EGF expression but upstream of the MEKK effector to activate the MAPK pathway in prostate cancer cells.** (a) ERK1/2 activation is rescued by caMEKK1. shScr and shNPM1 LNCaP cells are transfected with a constitutively activated construct of MEKK1 (caMEKK1) and ERK1/2 phosphorylation level was analysed using western blotting. (b) ERK1/2 pathway activation restores EGF promoter activity in LNCaP cells downregulated for NPM1. LNCaP shSCR and shNPM1 cells were transiently co-transfected with phEGF-luc and caMEKK1. EGF promoter activity was evaluated by measuring the luciferase activity 24 hours after. Results of the assay were standardized against control reporter activity CMV-Luc and expressed as fold-induction over control cells (shScr). Data are representative of at least three independent experiments and are expressed as the mean ± SD.
doi:10.1371/journal.pone.0096293.g005

capacities of prostate cancer cells. In accordance with these findings, a recent study by Liu et al. [15] shows that the elevated expression of NPM1 is positively correlated with the formation of metastasis and with poor survival of patients with colon cancer. It is furthermore associated with enhanced migration and invasion properties of colon cancer cells. NPM1 overexpression seems thus to potentiate tumorigenic characteristics of different cancer cell types, and may be an important actor in the evolution of tumours aggressiveness.

NPM1 was described to potentiate the action of the androgen receptor (AR) in prostate cancer cells [1] following a direct interaction with this transcription factor on chromatin. AR, and more widely the androgens signalling, is one of the main pathways that support prostatic tumours growth and metastatic dissemination. Nevertheless, NPM1 inhibition induces similar phenotypes in LNCaP cells that express AR and in PC3 cells that do not express this receptor. It is so unlikely that NPM1 controls prostate cell proliferation and migration via such a mechanism (figure S3).

Besides strongly stimulated androgen signalling, overexpression of the EGF growth factor is also observed in prostate tumours [16]. Further evidences point out that EGF signalling is important for prostate cancer cell proliferation: (i) EGFR is over-expressed in prostate cancer cells [18,19] (ii) overexpression of EGFR stimulates cell growth *in vitro* and *in vivo*, [20], (iii) in the TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate) mouse model, the activation of the MAPK pathway involving the ERK1/2 transducers downstream of the EGF/EGFR complex promotes prostate epithelial cell proliferation and tumour progression [21], (iv) ERK1/2 promotes the degradation of extracellular matrix proteins thus favouring tumour invasion [22]. So, it is suggested that these events lead to the establishment of an EGF-dependent autocrine loop which could favour a switch towards a tumour cell-autonomous mechanism and here allow growth factors independent cell growth and proliferation [17]. Such self-regulation loop is characteristic of advanced localized and of therapy resistant prostate cancers. Our results show that LNCaP cells knocked-down for NPM1 accumulate less EGF encoding mRNA than control LNCaP cells. Furthermore, low levels of NPM1 in the cells are associated with a decrease in the EGF promoter activity thus suggesting that NPM1 acts as a positive regulator of EGF gene expression. Although NPM1 is not a transcription factor, this chaperone plays important functions in transcription processes as an actor of chromatin remodelling. In this sense, NPM1 was described as a partner of the acetyltransferase protein p300 or GNC5 in the transcription complex that drives the transcription of the TNFα gene [23]. So, one hypothesis would be that NPM1 can participate to a remodelling complex that enhances transcription at the promoter of the EGF gene.

The increased activity of the EGF/EGFR complex that is associated with prostate tumour progression leads to the activation of different downstream signalling pathways including MEKK/ERK and PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-OH Kinase). In NPM1 knocked-down LNCaP cells, we show a reduced activation of the EGF receptor. These findings may well reflect a reduced availability of EGF in these cells, especially as exogenous intake of EGF partially rescues EGFR activation as attested by its phosphorylation status. However, in the same context, activation of ERK1/2 as well as the proliferation and migration capacities of cells are not restored. Moreover, EGF similarly promotes AKT phosphorylation in LNCaP cells independently of their NPM1 levels. This strongly suggests that NPM1 is not necessary for the activation of the PI3K/AKT pathway downstream of the EGFR, but on the contrary may be specifically required for the activation of the MAPK pathway within these cells. Indeed, the transfection of a constitutively active form of MEKK1 in shNPM1 LNCaP cells rescues the phosphorylation status of ERK1/2 and above all, EGF promoter activity. Thus, our data suggest that the major

impact of NPM1 seems to occur through the activation of the MAPK pathway, downstream of EGFR, but upstream of MEK1.

Ras proteins are very important in the controlling of the MAPK pathway and are activated following EGF stimulation of EGFR. The spatial organization of these proteins into nanoclusters close to the inner leaflet of the membrane is essential for such activation. Through its ability to shuttle between the nucleus and the cytoplasm, NPM1 exerts some extranuclear functions. Thereby, NPM1 is able to bind and to stabilize K-Ras in an active form, and may thus activate MAPK signalling as described in prostate cancer [24–26]. This effect is enhanced after EGF binding on its receptor. We hypothesize that the NPM1 dependent positive regulation of cancer cell migration and invasion secondary to ERK1/2 activation may result from recruitment of K-Ras to the membrane by NPM1.

To conclude, our data demonstrate that NPM1 is involved in the control of prostate cancer cell proliferation and invasion capacities both *in vitro* and *in vivo*. We also show that NPM1 acts as a regulator of the MAPK/ERK pathway and the EGF gene expression, which would explain the change of prostate tumour cell behaviour when NPM1 expression is altered. *A contrario*, when prostate tumour cells display an increased NPM1 expression, one might then expect that it strongly potentiates tumour growth and aggressiveness.

## Supporting Information

**Figure S1 NPM1 knockdown does not induce LNCaP cells apoptosis.** Total proteins from shScr and shNPM1 LNCaP cells cultured in RPMI 1640 10% FBS were analysed by western blotting for PARP (Poly ADP Ribosyl Polymerase) cleavage using a specific anti-PARP antibody (Clone C2-10, 4338-MC-50, Trevigen). As a positive control, shScr LNCaP cells were treated for 24 h with 50 µM cisplatin.
(TIF)

**Figure S2 NPM1 over-expression impacts LNCaP cells three-dimensional growth.** The inducible Flag-NPM1 expressing LNCaP cells were seeded at low confluency on agarose/RPMI 1640 10% FBS for 2 weeks and treated with Doxycycline (1 µg/ml) or vehicle. Number and size of the emerging clones were observed under inverted microscope and photographed. The graph represents the number of cell clones (>50 cells) in the NPM1 overexpression condition, calculated as the mean ± SD of the number of clones counted per field, on 5 random fields, using the ImageJ free software and expressed relatively to the number of clones counted in the control condition, *i.e.* untreated cells. The western blot is representative of three independent experiments and shows the relative accumulation level of the Flag-NPM1 protein using an anti-Flag antibody (F7425, Sigma).
(TIF)

**Figure S3 NPM1 knockdown alters migration and invasion capacities of the PC3 prostate cancer cells.** (**a**) PC-3 cells were transiently transfected using control siRNA (siGFP) or specific NPM1 siRNA (siNPM1). mRNA and protein levels of NPM1 were analysed respectively by RT-qPCR and Western Blotting. (**b**) NPM1 controls migration capacities of PC-3 cells. PC-3 siGFP and siNPM1 cells were plated at confluence in order to create a wound 24 hrs following seeding. Cells were photographed 72 hrs later by inverted microscopy (100× magnification). Histograms show wound areas following quantification with Image J software. (**c**) NPM1 downregulation has an impact on the invasive potential of PC-3 cells. siGFP and siNPM1 transfected PC-3 cells were seeded at confluence in RPMI 1640 with 10%FBS on matrigel in inserts. 48 hours later, cells that invaded the lower of the membrane were fixed and stained with 5% Giemsa and observed at microscope (200× magnification). The data shown are representative of at least three independent triplicates.
(TIF)

**Methods S1 Materials and Methods. Cell culture and transient transfection.**
(DOCX)

## Acknowledgments

We are grateful to Dr Marcin Ratajewski for the helpful caMEKK1 construct, to Angélique De Haze and Jean-Paul Saru for technical assistance and to Dr De Joussineau and Pr Lobaccaro for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GL CB PV LM. Performed the experiments: GL RB SM CLC. Analyzed the data: GL RB CB PV LM. Contributed reagents/materials/analysis tools: GL RB SM CB. Wrote the paper: GL LM.

## References

1. Leotoing L, Meunier L, Manin M, Mauduit C, Decaussin M, et al. (2008) Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. Oncogene 27: 2858–2867.
2. Szebeni A, Herrera JE, Olson MO (1995) Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. Biochemistry 34: 8037–8042.
3. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K (2001) Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. FEBS Lett 506: 272–276.
4. Takemura M, Sato K, Nishio M, Akiyama T, Umekawa H, et al. (1999) Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. J Biochem 125: 904–909.
5. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, et al. (2000) Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. Cell 103: 127–140.
6. Lindstrom MS (2011) NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochem Res Int 2011: 195209.
7. Okuwaki M (2008) The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. J Biochem 143: 441–448.
8. Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T, Terada M (1992) Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. Cancer Res 52: 3372–3377.
9. Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, Dinjens WN, Bosman FT (1996) Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. J Pathol 178: 48–52.
10. Sari A, Calli A, Altinboga AA, Pehlivan FS, Gorgel SN, et al. (2011) Nucleophosmin expression in renal cell carcinoma and oncocytoma. Apmis 120: 187–194.
11. Shields LB, Gercel-Taylor C, Yashar CM, Wan TC, Katsanis WA, et al. (1997) Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. J Soc Gynecol Investig 4: 298–304.
12. Di Fiore PP (2008) Playing both sides: nucleophosmin between tumor suppression and oncogenesis. J Cell Biol 182: 7–9.
13. Brady SN, Yu Y, Maggi LB Jr, Weber JD (2004) ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. Mol Cell Biol 24: 9327–9338.
14. Li QF, Tang J, Liu QR, Shi SL, Chen XF (2010) Localization and altered expression of nucleophosmin in the nuclear matrix during the differentiation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells induced by HMBA. Cancer Invest 28: 1004–1012.
15. Liu Y, Zhang F, Zhang XF, Qi LS, Yang L, et al. (2012) Expression of Nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. J Biomed Sci 19: 53.
16. Davies P, Eaton CL (1989) Binding of epidermal growth factor by human normal, hypertrophic, and carcinomatous prostate. Prostate 14: 123–132.

17. Scher HI, Sarkis A, Reuter V, Cohen D, Netto G, et al. (1995) Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. Clin Cancer Res 1: 545–550.
18. Tillotson JK, Rose DP (1991) Endogenous secretion of epidermal growth factor peptides stimulates growth of DU145 prostate cancer cells. Cancer Lett 60: 109–112.
19. Traish AM, Wotiz HH (1987) Prostatic epidermal growth factor receptors and their regulation by androgens. Endocrinology 121: 1461–1467.
20. Jones HE, Eaton CL, Barrow D, Dutkowski CM, Gee JM, et al. (1997) Comparative studies of the mitogenic effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha and the expression of various growth factors in neoplastic and non-neoplastic prostatic cell lines. Prostate 30: 219–231.
21. Junttila MR, Li SP, Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. Faseb J 22: 954–965.
22. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol Cell Biochem 253: 269–285.
23. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, et al. (2009) Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. Mol Cell Biol 29: 5115–5127.
24. Inder KL, Lau C, Loo D, Chaudhary N, Goodall A, et al. (2009) Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. J Biol Chem 284: 28410–28419.
25. Inder KL, Hill MM, Hancock JF (2010) Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras signaling. Commun Integr Biol 3: 188–190.
26. Weber MJ, Gioeli D (2004) Ras signaling in prostate cancer progression. J Cell Biochem 91: 13–25.

# Characterization of Npm1 in the Male Mouse Genital Tract Reveals a Functional Role in Androgen Responsiveness of Differentiated *Vas Deferens* Epithelial Cells

Laurent Léotoing[1,2,3,¶#a], Sabrina Maquaire[1,2,3,¶#b], Rafik Boudra[1,2,3], Michèle Manin[1,2,3], Corinne Lours-Calet[1,2,3], Gaëlle Loubeau-Legros[1,2,3], Cyrille de Joussineau[1,2,3], Christelle Damon-Soubeyrand[1,2,3], Jérôme Allemand[1,2,3#c], Angélique De Haze[1,2,3], Laurent Morel[1,2,3] and Claude Beaudoin[1,2,3*]

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[2]CNRS UMR6293, Inserm U1103; Clermont Université, F-63001 Clermont-Ferrand, France

[3]CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

[#a]Current Address: INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63009 Clermont-Ferrand, France

[#b]Current Address:

[#c]Current Address: Centre Jean Perrin, 58, rue Montalembert BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France

*Corresponding author

E-mail: Claude.Beaudoin@univ-bpclermont.fr

[¶]These authors contributed equally to this work.

**Keywords:** nucleophosmin, male genital epithelia, androgen signalling, proliferation and differentiation.

**Funding:** This work was supported by grants awarded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Blaise Pascal (UBP), the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). RB is holder of a studentship from the French Foundation for Medical Research (FRM).

# Abstract

Nucleophosmin (NPM1/B23) is a multifunctional nuclear phosphoprotein that plays important roles in the control of cellular growth and homeostasis. Cumulative evidence has indicated that one aspect of cell growth control on which NPM1 might be involved is transcriptional regulation. Its role in this regard depends on interaction with different transcription factors and we have previously showed that NPM1 interacts with the androgen receptor (AR) to regulate its transcriptional activity in prostate cancer cells. Here, we have further explored the physiological functions of NPM1 on epithelial cell proliferation and differentiation as well as on the AR-mediated gene expression in the male genital tract epithelia. We show that Npm1 is co-expressed with the AR in multiple male reproductive tissues of mice. Using a mouse *vas deferens* epithelial cell line (VDEC), we observed that Npm1 is strongly expressed during proliferation but was found decreased upon differentiation although it is largely accumulated within the nuclei where it binds with AR as confirmed by co-immunoprecipitation and Western blot analysis. Decreased proliferation in VDEC depleted for Npm1 is found in conjunction with an increase in global histone methylation that did not affect differentiation of the *vas deferens* epithelial cells although it reduced the expression of the AR target gene *Akr1b7*. Indeed, we show that Npm1 is recruited to the androgen-responsive *Akr1b7* gene promoter in a similar manner to AR and that inhibition of Npm1 by the small molecular inhibitor NSC348884 attenuated androgen-stimulated gene expression as well as the DHT-induced luciferase activity driven by the *Akr1b7* androgen targeted promoter. This study highlights a versatile function of Npm1 that unlikely modulates the proliferation/differentiation swich but functionally regulate the response to stimulation with androgens in differentiated epithelial cells of the *vas deferens*.

55 # Introduction

56 Nucleophosmin (NPM1 also known as B23, NO38 or numatrin) is a multifunctional nuclear
57 phosphoprotein that shuttles between the nucleolus and the cytoplasm [1]. Firstly reported to
58 play a role in ribosome assembly [2] it has also been shown to bind to histones, to mediate
59 nucleosome formation and to relax chromatin [3]. *In vivo*, NPM1 interacts with many growth
60 regulators including the tumor suppressor p53, Rb, ARF, and the HDM2 (Mdm2 in mouse)
61 oncogene [4,5,6]. Not surprisingly, this translated into pleiotropic effects including regulation
62 of nuclear export, DNA transcription, DNA repair as well as cell proliferation and survival
63 (reviewed in [7]). NPM1 is tightly regulated during proliferation and its deregulation or
64 overexpression is postulated to enhance proliferation and oncogene-mediated transformation
65 [8]. Therefore, much of the interest in NPM1 derives from its involvement in cancer and little
66 is known about physiological functions of NPM1 as germ-line deletion in mouse leads to
67 several developmental defects and embryonic lethality at mid-gestation [9].

68 Very recently, we and others have shown that NPM1 enhances the activity of the MAP-
69 kinase signaling pathway in order to increase cellular proliferation as well as both migration
70 and invasion capacities of human prostate cancer cells [10,11]. This is an important issue
71 since sustained ERK phosphorylation following stimulation of the MAPK cascade is known
72 to promote cell cycle progression and interferes with the setting of the differentiation process
73 in the epithelium of the male genital tract as we previously reported [12]. Besides this
74 important function in enhancing ERK1/2 activity, recent data also agree for a more active role
75 of NPM1 in transcriptional regulation of genes involve in cell proliferation and
76 differentiation. In agreement with this statement, studies have shown that NPM1 binds to
77 several transcription factors including YY1, NFkB and AP2α [13,14,15]. Also, it has been
78 described as a former androgen receptor (AR) interacting protein that controls androgen target
79 gene expression [16]. In the prostate gland as well as in the Wolffian-derived sex accessory

80 organs namely *vas deferens*, epididymis and seminal vesicles, androgens play critical roles in
81 the regulation of cell growth, differentiation and survival. In fact, the major physiological
82 androgen testosterone (T) and its more active metabolite 5α-dihydrotestosterone (DHT) are
83 especially known to be essential for the functional maturation of epithelial cells in the male
84 genital tract at puberty as well as for their maintenance during adulthood [17,18,19]. NPM1 is
85 present at a high level in the prostate gland [16] and previous work performed by Tawfic *et al.*
86 suggest that androgenic regulation of the amount and phosphorylation of prostatic NPM1
87 might be related to the early changes associated with androgen mediated growth of the gland
88 [20]. The shuttling of NPM1 in and out if the nucleus has been proposed as an early event too
89 involves in modulating response to growth and apoptotic stimuli in rat prostate epithelial cells
90 [21]. It is thus assumed that NPM1 may constitute a signal required for cell growth and
91 survival in androgen target organs; however, the physiological relevance of these described
92 NPM1 functions have not been explored on epithelial cell proliferation and differentiation as
93 well as on the AR-mediated gene expression in the male genital tract epithelium.
94 In the present study, we show that Npm1 is co-expressed with AR in multiple male
95 reproductive organs of mice such as the epididymis, the *vas deferens* and the prostate. By
96 using a mouse androgen sensitive *vas deferens* epithelial cell line, we report that silencing of
97 Npm1 by short hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown reduced the proliferation rate in
98 conjunction with a global increased in repressive histone methylation marks that did not
99 impair cell differentiation capacities. Nevertheless, our analysis demonstrate that Npm1
100 associates with AR in differentiated androgen sensitive *vas deferens* epithelial cells and
101 indicate that this multifunctional phosphoprotein mediates gene expression induced by the AR
102 signalling in non-pathological conditions as well. Therefore, we propose that Npm1 acts as an
103 AR co-regulatory protein that coordinates a subset of AR functions essential for supporting

104 epithelial cell differentiation in response to stimulation with androgens in male reproductive

105 tissues.

106

107 # Materials and Methods

108 ## Cell culture conditions and transfections

109 Mouse *vas deferens* epithelial cells (VDEC) were grown as previously described [22].
110 Briefly, cells maintained in proliferation were seeded on serum fibronectin-coated plastic in
111 basal medium supplemented with 1ng/ml EGF. Differentiation of VDEC was allowed for 3
112 days after seeding onto matrigel-coated microporous membranes in 6-well plates at confluent
113 density (1.5 x $10^6$ cells/well) in basal medium supplemented or not with dihydrotestosterone
114 (DHT). Medium was changed every two days and experiments were repeated three times.
115 VDEC silenced cells were generated according to manufacturer's instructions after infection
116 with lentiviral particles containing either three target-specific constructs (B23 shRNA, sc-
117 29772-V2) or unrelated scramble sequences (control shRNA, sc-108080) form Santa Cruz
118 Biotechnologies (Heidelberg, Germany). Selection of transduced cells was carried out in the
119 presence of 2µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich®) in order to select stably transduced cells
120 and to perform monoclonal selection.

121 HeLa cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
122 supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum and cultured at 37°C in
123 water-saturated 5% $CO_2$ atmosphere. 3 x $10^5$ cells per well were plated in 6 well-plates and
124 the next day, transient transfections were performed using the PEI Exgen 500 procedure
125 (Euromedex, Mundolsheim, France). Npm1 activity was inhibited, without altering cell
126 viability, using 3,0µM (for VDEC cells) or 2,5µM (for HeLa cells) of NSC348884 (Sigma-
127 Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). For depletion of Npm1, we used a combination of
128 two siRNA duplexes (final concentration 100pmol): 5'-CCACAGAAAAAAGUAAAACTT-
129 3' and 5'-UGAUGAAAAUGAGCACCAGTT-3' as described earlier [16]. GFP siRNA
130 duplex (5'-ACUACCAGCAGAACACCCCTT-3') was used as a control for the siRNA

131 reactions. After 12 h, the medium was replaced with medium supplemented with 5%
132 charcoal-stripped serum for 48 h and then, cells were incubated with androgens or ethanol
133 vehicle for 24 h. Cells were then lysed and the luciferase activity was measured with the assay
134 system from Yelen.
135

## 136 Immunohistochemistry and immunofluorescence

137 Use of animals in this research was strictly compliant with the guidelines set by the French
138 charter on the Ethics of Animal Experimentation and protocols were approved by the local
139 committee on the Ethics of Animal Experiments (Permit Number: CE09-08). Mouse tissues
140 (20-weeks old) were fixed in 4% paraformaldehyde-PBS for 24 h at 4°C, washed in 70%
141 ethanol, embedded in paraffin and treated for AR and Npm1 expression determination.
142 Sections were deparaffined with Histoclear, rehydrated with graded alcohol and distilled
143 water, and washed in PBS. Slides were boiled 25 min in citrate buffer (10mM, pH 6), washed
144 twice in water and twice in 1X PBS. For AR and Npm1 immunostaining, endogenous
145 peroxidase activity was quenched with 0.3% of hydrogen peroxide for 30 min. Slides were
146 washed in 1X PBS, incubated 1 hour at RT in blocking buffer (1,5 % goat serum-1X PBS)
147 and incubated overnight at 4°C with either the anti-AR PG21 antibody (Millipore; dilution:
148 1/200 for *vas deferens*, 1/400 for ventral prostate and epididymis), or the anti-NPM1 antibody
149 (Zymed Laboratories; dilution: 1/1000) diluted in 1,5 % goat serum-1X PBS. After washing
150 with 1X PBS, slides were incubated with anti-rabbit biotinylated or anti-mouse biotinylated
151 secondary antibody respectively (Jackson immunoresearch). Slides were washed in 1X PBS,
152 incubated 10 minutes in Streptavidin-HRP (Jackson immunoresearch; dilution: 1/500), and
153 washed again in 1X PBS. Revelation was realized using the Novared kit. Slides were
154 dehydrated, mounted using the cytoseal 60 mounting medium (Euromedex, Mundolsheim,
155 France), and image acquisitions were performed with Zeiss Axiovision. For AR and Npm1

156 immunofluorescent co-staining, slides were incubated overnight at 4°C in a mix containing
157 anti-AR antibody (PG21; dilution: 1/50 for *vas deferens*, 1/100 for ventral prostate and
158 epididymis) and anti-NPM1 antibody (Zymed Laboratories; dilution: 1/100) in 1,5 % goat
159 serum-1X PBS. After washing with 1X PBS, slides were incubated 1 hour with a mix
160 containing Alexa Fluor 488 anti-rabbit and Alexa Fluor 555 anti-mouse secondary antibodies
161 (Invitrogen; dilution: 1/1000 in 1% SVF-1X PBS). After washing with 1X PBS, slides were
162 mounted with 50% glycerol-1X PBS and examined with a Zeiss Axioplan 2 microscope
163 equiped with epi-illumination.
164

## 165 RNA extractions, Northern blot analysis and Reverse-
## 166 Transcription quantitative PCR

167 Total RNA was isolated from VDEC using the RNAzol method according to the
168 manufacturer's instructions (Quantum, Montreuil-sous-bois, France). Total RNA (30µg) was
169 separated on 1% denaturing formaldehyde-agarose gel, transferred onto nylon membrane in
170 10X SSC and then immobilized under UV light. After prehybridization, the membrane was
171 hybridized at 42°C in a solution containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 5X SSC,
172 1mM EDTA, 10µg/ml of denatured salmon sperm DNA, and $^{32}$P-labelled human NPM1
173 probe. After washing at 65°C for 20 min in 0,2X SSC and 0.1% SDS as a final stringency, the
174 membrane was exposed on Kodak x-ray film at -80°C. The membrane was then stripped and
175 reprobed for *Gapdh*. For cDNA synthesis, five hundred nanograms mRNA were reverse
176 transcribed for 1 h at 42°C with 5pmoles of random hexamer primers, 200 units reverse
177 transcriptase (MuMLV RT, Promega), 2mM dNTPs and 20 units RNAsin (Promega) as
178 described [23]. A half microliter of one-tenth dilution of the cDNA was used in each
179 quantitative PCR reaction. These were conducted with the mouse *Npm1* (Mm02391781_g1),

180 *AR* (Mm00442688_m1) and *Akr1b7* (Mm00477605_m1) TaqMan® probes from Life
181 Technologies. Each reaction was performed in triplicate in a final volume of 15µl with 0.75µl
182 of the appropriate 20X probe mix and 7.5µl of PCR Mastermix (Precision-iC.,
183 PrimerDesign.co.uk). Relative mRNA accumulation was determined by the ΔΔCt method and
184 *Gapdh* (Mm99999915_g1) was used for quantative normalization of cDNA in each cell-
185 derived sample. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test.
186

187 **Preparation of cytosol, nuclear and polysome extracts**

188 Mouse *Vas deferens* epithelial cells were harvested, washed in cold ice 1X PBS buffer and
189 homogenized in buffer A [50mM NaCl, 10mM Hepes (pH 8.0), 0.5M sucrose, 1mM EDTA,
190 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 0.2% Triton X-100, 1mM PMSF, 1µg/ml apoprotinin,
191 1µg/ml leupeptin and 7mM mercaptoethanol]. The homogenate was incubated on ice for 15
192 min, passed through a 26-gauge needle with a seringue and then, centrifuged at 10,000 x *g* for
193 15 min at 4°C. The 10,000 x *g* pellet was washed in buffer B [50mM NaCl, 10mM HEPES
194 (pH 8.0), 25% glycerol, 0.1mM EDTA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 1mM PMSF,
195 1µg/ml apoprotinin, 1µg/ml leupeptin and 7mM mercaptoethanol], resuspended in buffer C
196 [0.42M NaCl, 10mM HEPES (pH 8.0), 25% glycerol, 0.1mM EDTA, 0.5mM spermidine,
197 0.15mM spermine, 1mM PMSF, 1µg/ml apoprotinin, 1µg/ml leupeptin and 7mM
198 mercaptoethanol], sonicated on ice, and then centrifuged at 12,000 x *g* for 15 min at 4°C and
199 the supernatants (nuclear extracts) were frozen at -80°C. The 10,000 x *g* supernatants were
200 centrifuged at 100,000 x *g* for 2 h at 4°C, and the supernatants (cytosol extracts) were frozen
201 at -80°C. The 100,000 x *g* pellets were resuspended in buffer C, incubated on ice for 1 h, and
202 centrifuged at 10,000 x *g* for 15 min at 4°C, and then the resultant supernatant (polysomal
203 extracts) was frozen at -80°C. Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein
204 assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

205

206 ## Western blotting and co-immunoprecicipation

207 Mouse tissues were harvested from 20-weeks old animals and immediately homogenized
208 in ice cold NaCl buffer [0.42M NaCl, 20mM Hepes (pH 8.0), 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM EDTA,
209 25% glycerol, 0.1% NP40, 1mM PMSF, 1μg/ml apoprotinin, 1μg/ml leupeptin]. To make the
210 whole-cell lysates, cells were washed with 1X PBS and resuspended in ice cold NaCl buffer.
211 After brief sonication on ice and clarification for 30 min at 15,000 x *g*, 40μg of proteins were
212 resolved through SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes.
213 Membranes were blocked with milk buffer [5% milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20]
214 for 1 h and incubated with the indicated primary antibody in milk buffer overnight at 4°C.
215 The membranes were washed three times with TBS-Tween 20 and then incubated 90 min
216 with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin G secondary
217 antibody (P.A.R.I.S biotech, Compiègne, France), followed by enhanced chemiluminescence
218 (Santa Cruz Biotechnology) according to manufacturer's instruction. For
219 immunoprecipitation, cells were harvested, washed in cold ice PBS buffer and isolated nuclei
220 were lysed in IP buffer [0.15M NaCl, 0,1% Triton X-100, 5mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM
221 EDTA]. Nuclear extracts were first precleared with protein A-Sepharose beads for 1 h and
222 then incubated with rabbit normal IgG or specific anti-AR (PG-21) and anti-NPM1 (C-19,
223 Santa Cruz Biotechnologies) antibodies conjugated with preequilibrated protein A-Sepharose
224 beads rotating 3 h at 4°C. The beads were collected by centrifugation and washed three times
225 with IP buffer. Proteins were eluted by boiling in sodium dodecyl sulfate-sample buffer,
226 resolved on polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes for
227 immunoblotting.

228

229 ## Cell proliferation assays

230 Cell proliferation was determined using the colorimetric XTT assay proliferation kit
231 according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science). Briefly, 2000 cells by
232 well were seeded in 96-wells plate and cultured for 48 hours in 200 µl of minimal medium
233 (without insulin and EGF). The medium was then replaced by 100µl of minimal medium
234 complemented with EGF (1 ng/ml) and insulin (5µg/ml) and the cells were cultured for 48
235 additional hours. Fifty µl of XTT reagent (XTT labelling plus electron-coupling) was added to
236 each well and the plate was incubated for 3 hours at 37°C. The coloured complex was then
237 measured using a microplate reader at 450 nm with a 650 nm reference wavelength. For the
238 cell-based BrdU (Bromode oxyuridine) proliferation assay, the cells were cultured in the same
239 conditions with the exception that the BrdU labelling solution was added at a final
240 concentration of 10 mM for 2.5 hours and the absorbance was measured at 655 nm following
241 fixation after an additional incubation of 1 hour with the anti BrdU-POD solution according to
242 the Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric kit from Roche Applied Science.
243

## 244 Chromatin immunoprecipitation

245 VDEC cells allowed to differentiate for 96 hours were treated or not for 2 days with $1x10^{-7}$
246 M DHT, cross-linked with 1% formaldehyde at RT for 10 min and rinced twice in ice-cold
247 PBS. The pellets were resuspended in lysis buffer [1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl
248 pH 8.0 and protease inhibitors] and sonicated to an average DNA fragment size of 200 to
249 1000 bp. Supernatants were collected and diluted in dilution buffer [1% Triton X-100, 2mM
250 EDTA, 150mM NaCl and 20mM Tris-HCl pH 8.0] followed by immunoclearing with sheared
251 salmon sperm DNA, bovine serum albumin and protein A-Sepharose for 2h at 4°C.
252 Immunoprecipitation was performed for overnight at 4°C with specific rabbit anti-AR (PG-
253 21), rabbit anti-NPM1 (C-19), mock rabbit IgG (Diagenode) and protein A-Sepharose. After
254 reversing cross-links, DNA fragments were purified over PCR purification columns (Qiagen,

255 Courtaboeuf, France), eluted in 30 µl water, and amplified by PCR with primer sequences for
256 the proximal androgen response element of the *Akr1b7* as described [24].
257

258 ## Statistical analyses

259 All experiments were repeated at least three times and results were expressed as mean ±
260 SD. Statistical differences between groups were determined by Student's t test and the
261 criterion for statistical significance was $P<0,05$. For western blotting results, the band
262 intensities were measured by using the ImageJ and normalized with actin.
263

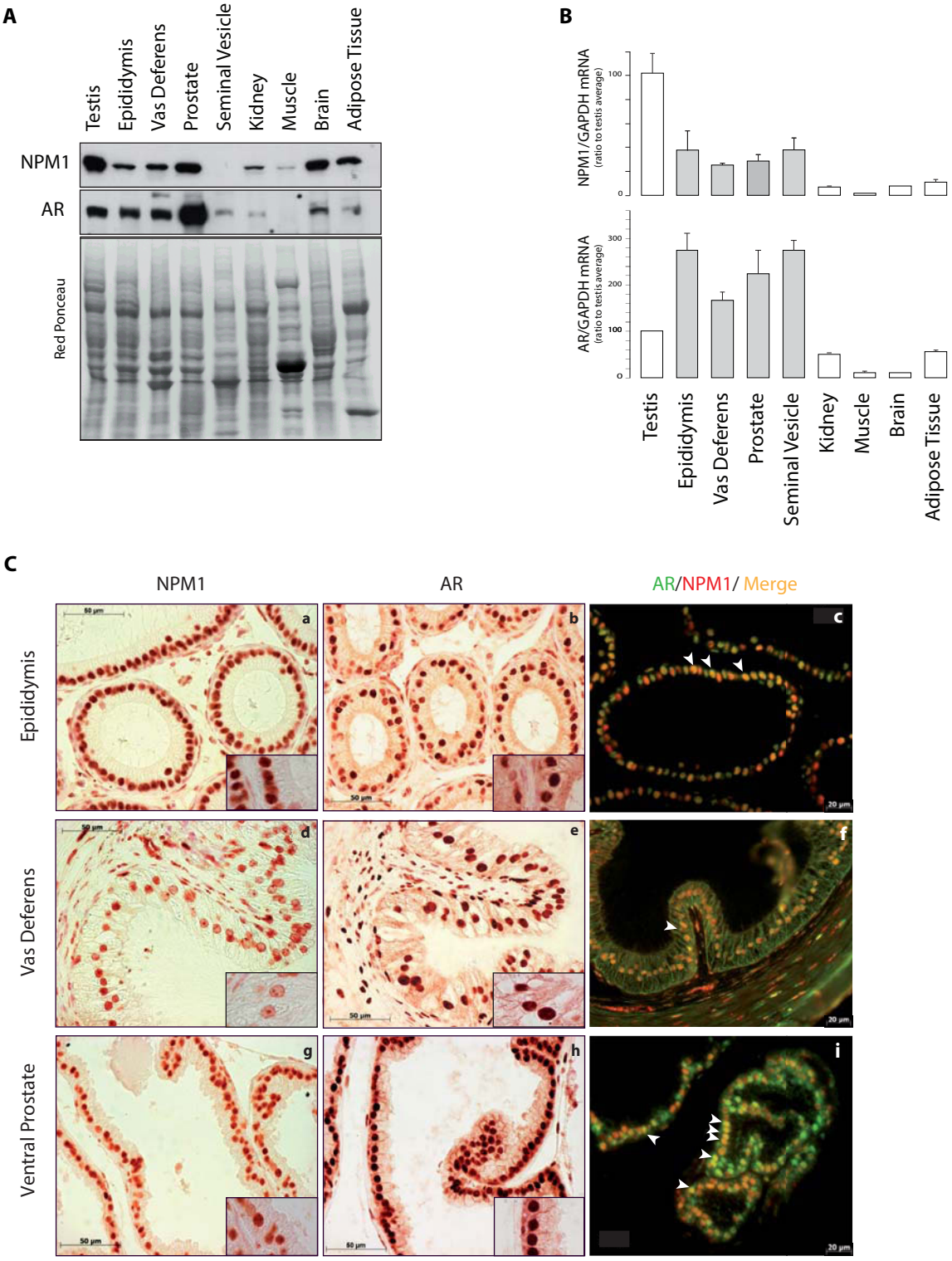



**Figure 1. NPM1 is expressed in male murine tissues.** (A) Tissue extracts were prepared from testis, epididymis, *vas deferens*, prostate, seminal vesicles, kidney, muscle, brain and adipose tissue of 20 weeks-old wild-type males. Aliquots of each extracts (80µg/lane) were examined by western blot analysis for NPM1 and AR. Ponceau red solution was used to control protein loading. (B) *Npm1* and *AR* transcripts were assayed by RT-qPCR and normalized to *Gapdh*. (C) Npm1 (a, d, g) and AR (b, e, h) were detected by immunofluorescence in epididymis, *vas deferens*, and ventral prostate of 16 weeks-old mice. Note that AR (green) and NPM1 (red) immunostaining overlay in the nuclei of the epithelial cell compartment (see arrows on merge images c, f, i). Magnifications, x63.

264 # Results

265 ## Mouse reproductive tissues co-express Npm1 and AR proteins

266 To gain some insight into the relative abundance of Npm1 in mouse reproductive organs,
267 total protein extracts were prepared from male androgen target tissues taken from 20-weeks
268 old wild-type mice and assayed by western immunoblotting (Fig. 1A). Npm1 was detected in
269 all male reproductive tissues examined as well as in the brain and the adipose tissue, although
270 its relative level in seminal vesicles appears to be much less than in the other organs.
271 Interestingly, Npm1 is highly expressed with AR in prostate and testis and moderately in
272 other male mice reproductive organs such as epididymis and *vas deferens* suggesting a
273 potential relationship between Npm1 and AR. In accordance, the transcript levels of both
274 genes measured by RT-qPCR show that *Npm1* and *AR* mRNAs are highly expressed in the
275 genital tract tissues of adult male mice (Fig. 1B). We also examined the subcellular
276 localization of Npm1 in relation to AR using both anti-NPM1 and anti-AR antibody
277 immunostaining and fluorescent microscopy (Fig. 1C). Histological analysis performed with
278 epididymis, *vas deferens*, and ventral prostate indicated that Npm1 was predominantly
279 expressed in the nuclei of the luminal epithelial layers with a pronounced nucleoli
280 accumulation (panels a, d and g; see enlarged images in the insets). AR is most exclusively
281 found in the nuclei of epithelial cells with a strong additional staining in the stromal elements
282 of the *vas deferens* (Fig. 1C; panels b, e, h). In line with NPM's activity toward AR, a
283 subpopulation of Npm1 molecules was found to co-localize with AR primarily in the nucleus
284 of the epithelial cell layers as indicated by the overlay of the double immunolabeling of both
285 Npm1 and AR (Fig. 1C, panels c, f, i; merge image). These data indicate that Npm1 is highly
286 expressed in the male reproductive tissues and suggest that AR and Npm1 might interact in
287 AR-positive, AR-dependent epithelial cells, an issue that will be addressed further below.

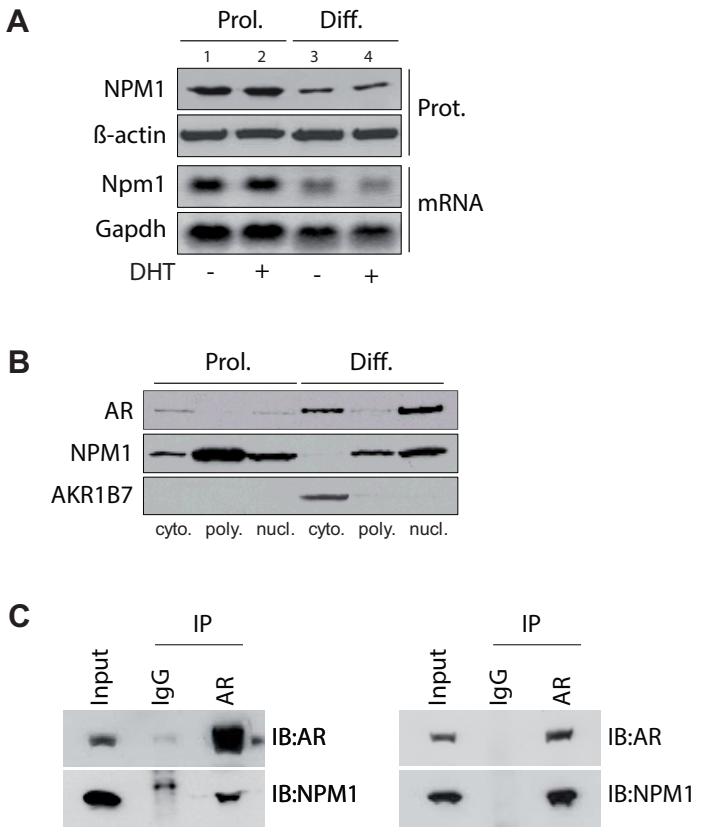



**Figure 2. NPM1 expression and localization are changed after differentiation of androgen sensitive epithelial cells.** (A) Expression levels of NPM1 were assayed in proliferating and differentiated VDEC. Cells were maintained in proliferation (Prol.) or allowed to differentiated (Diff.) as described in *Materials and Methods*. The cells were then treated with 100nM DHT for 48 h or left untreated, after which whole cell extracts were prepared. Proteins (40µg) were seperated by SDS-PAGE and western blot analysis was performed using an anti-NPM1 antibody. Samples were immunostained for β-actin as an internal reference (upper panels). Northern blot analysis of total RNAs from proliferating and differentiated VDEC. Blots were hybridized with $^{32}$P-labeled mouse full-length NPM1 cDNA probe. The expression of *Gapdh* was used as an internal control (lower panels). (B) Changes in the subcellular distribution of NPM1 in VDEC following terminal differentiation. Equal amount of proteins (40µg) from cytosol (c), polyribosomal (p) and nuclear (n) extracts were prepared from cells treated with DHT (100nM) for 48 h. (C) Cellular interaction of NPM1 and AR. Equal amounts of nuclear cell extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-NPM1 (left) and anti-AR (right) antibodies and rabbit IgG was used as a control. The precipitated fractions were then resolved by SDS-PAGE and analysed by western blot using anti-NPM1 or anti-AR antibodies as indicated.

288

289 **Dynamic regulation of Npm1 is linked to androgen responsiveness in**
290 **epithelial cells undergoing differentiation**

291 As epididymis, *vas deferens* and ventral prostate express relatively high levels of Npm1
292 and are known to be androgen responsive tissues, we used a mouse *vas deferens* epithelial cell
293 line (VDEC) to determine whether Npm1 levels might be affected by androgens. Of great
294 interest, this cell line can be maintained in proliferation or allow to differentiate and can
295 express androgen responsive gene such as *Akr1b7* as described earlier [22,25]. Since NPM1 is
296 known to be more abundant in growing cells than in resting cells [26], we were also able to
297 study Npm1 expression throughout the differentiation process. Total cellular lysates from
298 control untreated or DHT-stimulated proliferating and fully differentiated VDEC cells were
299 analyzed by Western blot immunoassay (Fig. 2). The results show that there was a marked
300 decrease in the level of total cellular Npm1 protein during epithelial cell differentiation (Fig.
301 2A, upper panels). However, NPM1 protein levels did not change after 48 h of 100nM DHT
302 treatment, indicating thus that NPM1 is unlikely androgen responsive in this cell line
303 (compare lane 2 vs 1 and lane 4 vs 3). In addition, there was also a decrease in the steady-state
304 level of *Npm1* mRNA to less than 30% following cell differentiation (Fig. 2A, lower panels;
305 compare lane 1,2 vs 3,4) suggesting that *Npm1* gene expression could be transcriptionally
306 and/or post-transcriptionally down-regulated following differentiation as already reported
307 [27].

308 NPM1 is a nucleolar phosphoprotein, which is capable of shuttling in and out of the
309 nucleolus or between the nucleus and the cytoplasm during the cell cycle [1,28]. It exists as
310 monomeric and oligomeric forms in cells and it has been suggested that the reversible change
311 of oligomerization between hexameric and monomeric forms of NPM1 may be a way of
312 modulating NPM's diverse functions [29,30]. To determine how cell proliferation and

313 differentiation influence the subcellular distribution of Npm1, we prepared cytosolic, nuclear
314 and polyribosomal extracts from VDEC (Fig. 2B). In growing epithelial cells, the Npm1
315 concentration was greatest in the polyribosomal compartment whereas cytosol and nuclei had
316 approximately 1/10$^{th}$ and 1/5$^{th}$ the relative level of immunoreactivity detected in the
317 polyribosomes. Npm1 levels in both cytosol and polyribosomes declined after cell
318 differentiation and had fallen by 90 % and 80 % respectively. In contrast, the level of Npm1
319 in the nuclei was not affected and remained high with AR in differentiated epithelial cells. Of
320 interest, androgens did not change the relative levels of Npm1 in these compartments (not
321 shown) although the androgen induced protein Akr1b7 strongly accumulated in the cytoplasm
322 in response to DHT as expected [31]. To verify whether Npm1 associates with AR in these
323 cells, nuclear extracts prepared from differentiated DHT-treated VDEC cells were
324 immunoprecipitated with mock rabbit IgG, anti-AR, or anti-NPM1 polyclonal antibodies.
325 Figure 2C shows that the Npm1 protein was detected only when the anti-AR antibody was
326 used and as anticipated, an anti-NPM1 antibody also co-immunoprecipitates AR. This latter
327 finding taken together with previous published data suggest that changes in the abundance of
328 Npm1 might be related to the transition from a proliferative state to a differentiated state,
329 thereby affecting the shuttling of Npm1 between subcellular compartments as well as its
330 ability to regulate the transcriptional activity of AR.
331

## 332 Impaired proliferation after Npm1 depletion did not accelerate 333 transition to differentiation

334 The reduction of Npm1 assessed during cell differentiation did not allow us to determine
335 whether its down-regulation is necessary for differentiation or is the consequence of the
336 differentiation process. To distinguish between these two possibilities, we adopted a silencing
337 approach using lentiviral vectors containing a specific short hairpin RNA to deplete Npm1 in

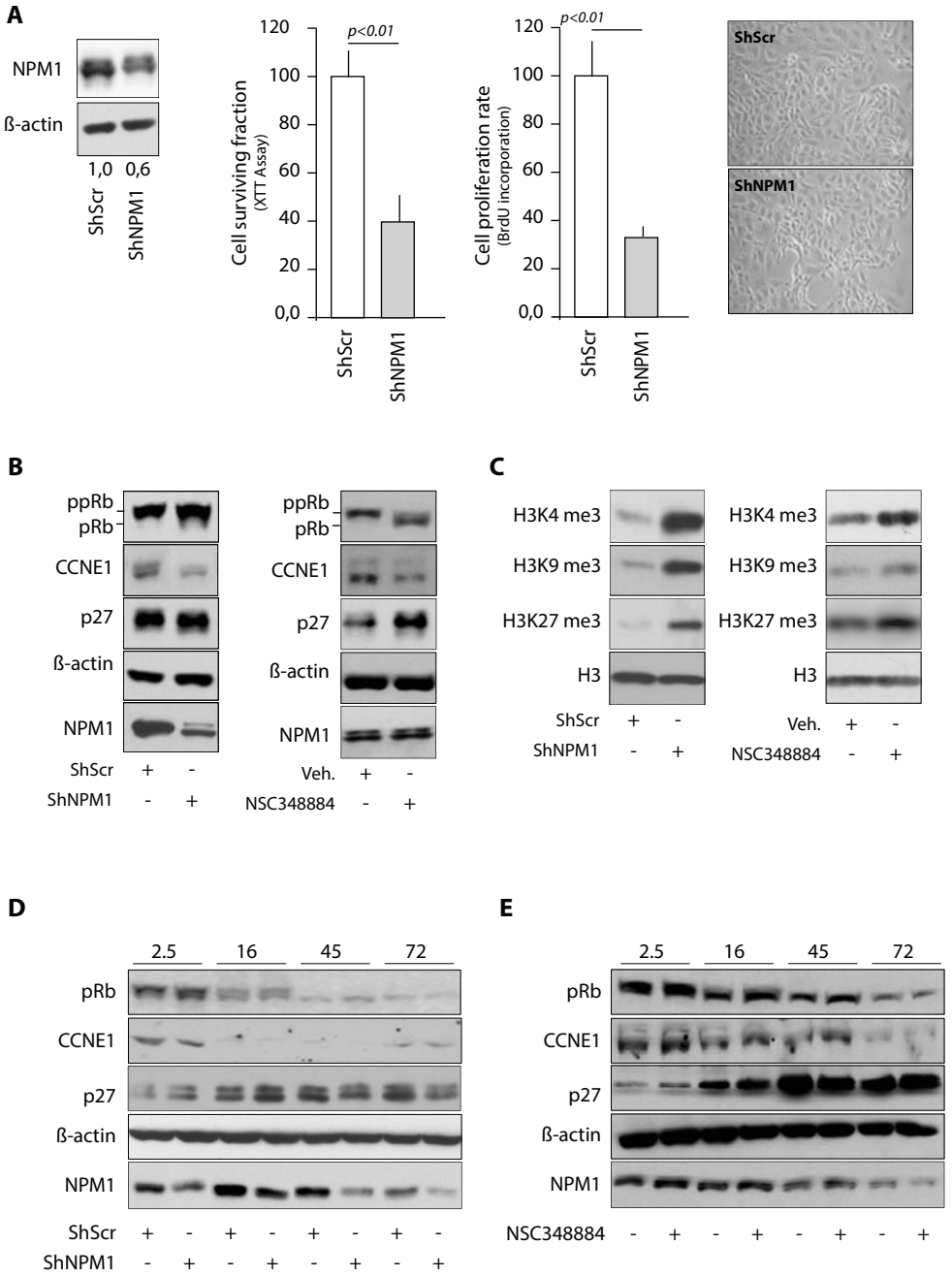



**Figure 3. Impaired proliferation in cultured VDEC inhibited for NPM1 did not promote the transition to differentiation.** (A) NPM1 suppression reduces cell proliferation. NPM1 abundance was assayed by western blot in puromycin selected cultures transduced with lentiviral vector containing either a non-specific scramble or a specific NPM1 shRNA sequence (left). Cells were then plated on 96-well plates for 24h and incubated with XTT or BrdU reagent according to the *Material and Method*s (middle). (right) Light microscopy visualization of the same population of cells as left and middle panels. (B) Cells with a reduced NPM1 expression (shNPM1 transduced) and/or inhibited for NPM1 (NSC treated) accumulated in the $G_0/G_1$-phase of the cell cycle and revealed an enhanced expression of p27kip1. (C) Immunoblot analysis of methylation of the indicated H3 lysine residues in lysates of cells silenced (left) or inhibited (right) for Npm1. (D and E) NPM1-silenced and NSC-treated VDEC cultures, respectively, were induced to differentiate and expression of regulatory cell cycle protein were evaluated at the indicated time point. The experiments are representative of three independent experiments.

338 cells maintained into proliferation or allowed to differentiate. As shown in Fig. 3A (left),
339 silencing efficiency, measured by protein level, was 40% compared to control cultures
340 transduced with lentiviral vector containing a scramble shRNA sequence. Consistent with
341 previous reports, the depletion of Npm1 reduces cell proliferation as measured by cell-based
342 assays using either the incorporation of bromodeoxyuridine or the colorimetric reduction of
343 the XTT tetrazolium dye (Fig. 3A, middle). Of interest, shRNA-mediated depletion of Npm1
344 is not associated to an increase in cell death since no morphological hallmarks of apoptosis
345 were observable between silenced or non-silenced cells (Fig. 3A, right and not shown). Npm1
346 knock-down recapitulated some changes we have already reported for cell cycle regulatory
347 proteins upon differentiation of the *vas deferens* epithelial cell line with the decrease of hyper-
348 phosphorylated forms of the retinoblastoma protein (ppRb) and of cyclin E in conjunction
349 with the up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 (Fig 3B and [12]).
350 Interestingly, these changes were heightened in cells treated with nontoxic doses of the
351 pharmacological inhibitor of Npm1 (i.e., NSC348884, as described by [32]) suggesting that
352 hexameric oligomerization of Npm1 may be required for controlling proliferation in these
353 cells.

354 The concomitant increase in the methylation levels of histone H3 lysine residues 4
355 (H3K4me3), 9 (H3K9me3) and 27(H3K27me3) in cells silenced or inhibited for Npm1 raise
356 questions relative to the functional role of these post-translational modifications (Fig 3C).
357 One possibility is that suppression of Npm1 is a prerequisite to the transition to differentiation
358 through generalized transcriptional changes mediated by repressive and activating histone
359 modifications. To begin unraveling this question, we investigated the differentiation kinetic of
360 silenced or non-silenced cultures by assessing by western blot the abundance of pRb, cyclin E
361 and p27kip1 throughout the differentiation process. As shown in Figure 3D, all the cell cycle
362 regulatory proteins tested were similarly modulated during the time course of differentiation

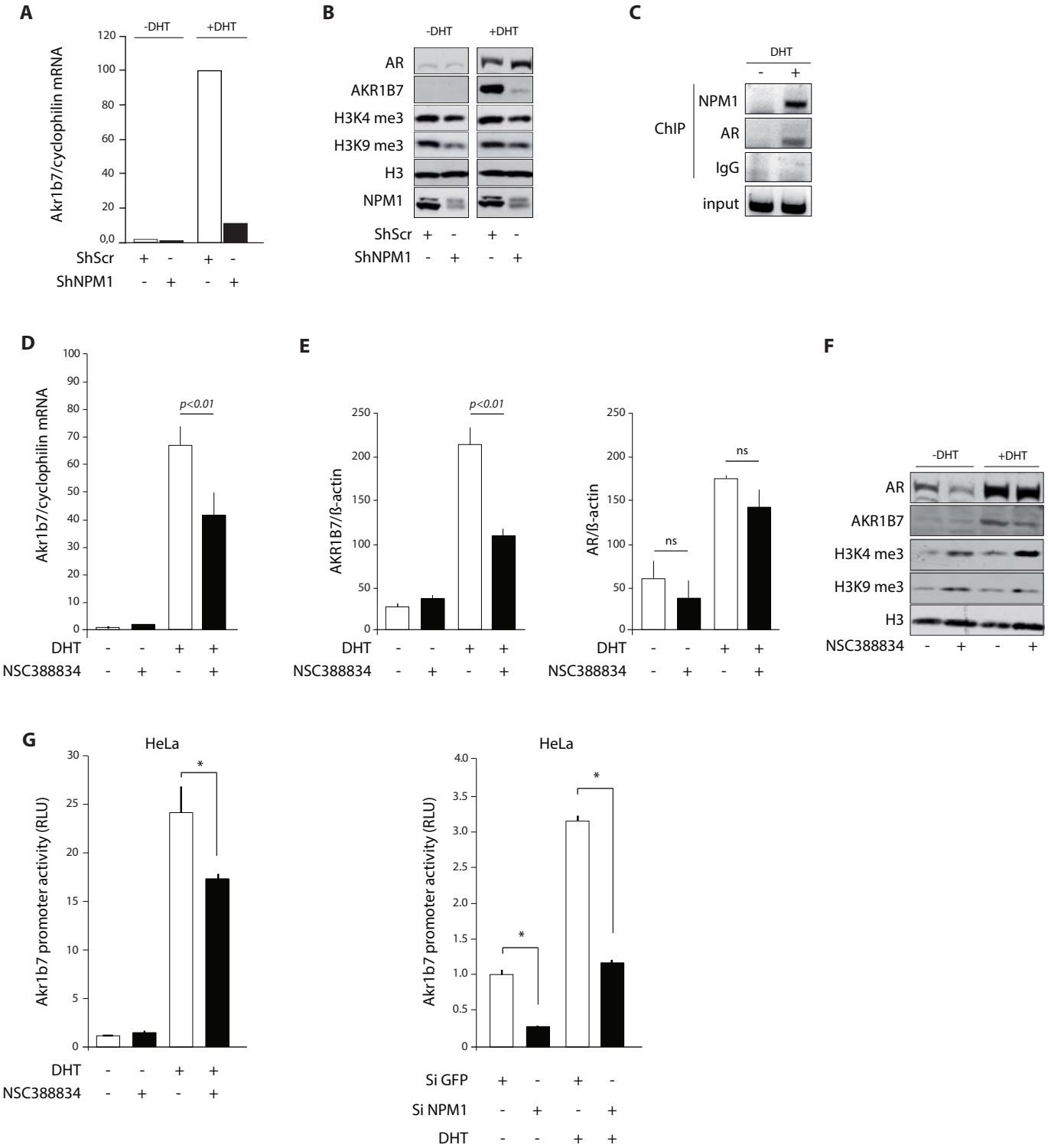



**Figure 4. NPM1 regulates expression of AR-stimulated target genes in differentiated VDEC.** VDEC silenced or non-silenced for NPM1 were allowed to differentiate in the presence and the absence of androgens (100nM). After 4 days, *Akr1b7* transcripts were assayed by RT-qPCR (A) and protein levels were assayed d by western blot (B). ChIP was prepared from differentiated VDEC cells previously treated with 100nM DHT for 48 h (C). Analyses were carried out with control (IgG) or antibodies against AR or NPM1 and the precipitated chromatin was amplified by PCR using primers flanking the proximal promoter region (ARE) of the *Akr1b7* gene. (D, E, F) Same as in A and B except that VDEC cells were incubated with or without the NPM1 inhibitor NSC38884 (3µM) for 48 hours before assessment of the *Akr1b7* mRNA (D), Akr1b7 protein (E) and AR protein levels (F). (G) Luciferase reporter activity in AR co-transfected HeLa cells is shown for the *Akr1b7* proximal promoter with or without NSC34884 (left panel) or siRNA against NPM1 (siNPM, right panel) in the presence or absence of 10nM DHT. Results in A, D, E and G are presented as mean ± SE of values of three independents experiments. * $P < 0,05$, compared with non-treated cells.

363 in both control and NPM1-silenced cultures. Consistent with this finding, disruption of NPM1
364 oligomer formation by the small molecular inhibitor (SMI) NSC34888 did not reveal any
365 difference in the *in vitro* differentiation capacity of cultured VDEC (Fig. 3E). Together, these
366 data clearly indicates that NPM1 is required for *vas deferens* epithelial cell proliferation but
367 its down-regulation unlikely acts a key regulatory event for the proliferation to differentiation
368 switch.
369

## 370 NPM1 inhibition impairs AR-dependent transcription in 371 differentiated VDEC

372 Androgens are crucial in driving terminal differentiation in the male genital tract epithelia
373 and their effects require transcriptional changes mediated by repressive and activating histone
374 modifications affecting AR transcriptional activities. Since we have previously shown that
375 NPM1 regulates androgen-stimulated transcription in human prostate cancer cells [16], we
376 examined whether NPM1 also regulates the expression of the well-known *Akr1b7* androgen
377 regulated target gene in differentiated epithelial cells of the *vas deferens*. Four days after
378 differentiation, cells silenced or non-silenced for NPM1 were treated with 100nM DHT and
379 twenty-four hours later, the endogenous androgen responsive Akr1b7 protein and mRNA
380 levels were measured respectively by western blotting and reverse transcription real-time
381 PCR. The results in Figures 4A and B show that depletion of NPM1 strongly reduced the
382 *Akr1b7* mRNA level as well as the protein abundance by more than 90%. This let us
383 hypothesize that NPM1 might be involved in the transcriptional activation of the *Akr1b7* gene
384 promoter, an issue that have been addressed *in vivo* using chromatin immunoprecipitation
385 (ChIP) assays. Because the activation of *Akr1b7* gene promoter is very heterogeneous in the
386 VDEC population and increases with both androgen concentrations and time of incubation,

387 ChIP assays were performed using differentiated *vas deferens* epithelial cells treated for 2
388 days with 100nM DHT. After harvesting, anti-NPM ChIP assays demonstrated reproducible
389 enrichment at the proximal -118/-96 ARE of the *Akr1b7* endogenous target gene relative to
390 mock rabbit IgG samples in response to DHT (Fig. 4C). Reproducible enrichment was also
391 observed at the same ARE after anti-AR ChIP demonstrating that NPM1 can be selectively
392 recruited to the AR bound proximal promoter of the *Akr1b7* target gene in an androgen-
393 dependent manner.

394 Similar to the findings in Figures 5A and B, treatment of VDEC with 3µM NSC348884
395 decreases *Akr1b7* mRNA level by 50% following exposure to DHT when compared to control
396 non treated cells (Fig. 4D) whereas in the Akr1b7 protein had fallen by around 40% in the
397 same conditions (Fig. 4E). Since AR protein accumulation was not significantly affected (Fig.
398 4F) our results are in accordance with the notion that inhibition of NPM1 can influence AR
399 transcriptional activity. NSC348884 at 3µM (for VDEC) and 2,5µM (for HeLa) did not affect
400 cell viability by inducing apoptosis (data not shown) and thus, we examined the activity of the
401 *Akr1b7*-luciferase reporter gene in transfected HeLa cells treated with NSC 348884. As
402 expected, inhibition of NPM1 reduced DHT-stimulated transcription of the *Akr1b7*-luciferase
403 reporter gene by about 40% (Fig. 4G, left) while depletion of NPM1 significantly decreased
404 the *Akr1b7*-driven luciferase expression by 70% in HeLa cells after NPM1 siRNA
405 transfection (Fig 5G, right). Although NPM1 was described as a key factor in rRNA
406 processing [2], the decreased DHT-dependent transcription we observed is unlikely the result
407 of a general effect on transcription since expression of a CMV-driven luciferase reporter gene
408 was unaffected by the reduction of NPM1 (data not shown).

409 Taken with our current immunoprecipitation and western analysis, these findings indicate
410 that NPM1 and AR can reside within a same protein complex in non transformed epithelial

411 cells from male genital tract tissues and are recruited onto the same response elements to

412 control target genes expression after stimulation with androgens.

413 # Discussion

414 The mechanisms by which androgens support male reproductive functions are not fully
415 understood despite the well-established fact that they serve critical roles in differentiation,
416 maturation and proper functioning of the male reproductive system. The androgen receptor
417 (AR) mediates the effects of androgens and like other nuclear hormone receptors, functional
418 activities of the AR can be modulated through interactions with various co-regulators [33]. In
419 the present report, we demonstrated that nucleophosmin (NPM1) is co-expressed with AR in
420 many male reproductive organs as well as other tissues such as the brain and the adipose
421 tissue of mice. In addition, it is highly abundant in the *ex vivo* model of *vas deferens* epithelial
422 cells maintained in proliferation while it is present at a much lower levels after differentiation
423 and preferentially co-accumulates with the AR in the nuclei. Thus far, biochemical analyses
424 have established that NPM1 associates with DNA and RNA [34], processes RNA [35],
425 prevents misfolding and aggregation of targets proteins as a molecular chaperone [36] and
426 mediates chromatin assembly as a histone chaperone [3]. Moreover, the biological
427 significance of NPM1 in ribosome biogenesis and transport [2], anti-apoptotic activity [37],
428 the regulation of centrosome duplication [38] and the regulation of tumor suppressor such as
429 ARF and p53 have also been documented [9]. Here, we show that NPM1 is recruited to the
430 endogenous androgen-responsive *Akr1b7* gene promoter and acts as an AR co-activator. In
431 light of these results, we hypothesize that NPM1 plays crucial roles in the regulation of AR
432 transcriptional activity upon functional maturation and differentiation of androgen-responsive
433 epithelia in the male genital tract.

434 In this study, we demonstrated by immunostaining studies that both proteins show a
435 nuclear distribution in epithelial cells of mice ventral prostate, epididymis and *vas deferens*
436 with AR co-localizing with NPM1 in one to two aggregates in the nucleolar compartment.
437 These organs are profoundly influenced by androgens and our investigations point to the

438 coordinate and dynamic modulation in nuclear-associated NPM1 and its link to AR in
439 response to stimulation with androgens in differentiated epithelia of the male genital tract.
440 NPM1 knockout results in lethality between embryonic day E11.5 and E12.5 in mice [9] and
441 does not allow to define *in vivo* NPM's physiological function in modulating androgen
442 actions in male reproductive tissues. However, our use of a mouse androgen sensitive *vas*
443 *deferens* epithelial cell line emphasizes the aforementioned hypothesis. First, down-regulation
444 of NPM1 upon epithelial cell differentiation results in a loss of a cytoplasmic-associated
445 NPM1 without a significant change in the nuclear levels of the protein while the nuclear
446 fraction of AR strongly increases in the same conditions (this study and [12]). Second,
447 endogenous NPM1 was found specifically co-immunoprecipitated with AR using nuclear
448 extracts and conversely, endogenous AR was also detected in the complex pull-downed by an
449 NPM1 antibody. In agreement with these observations, NPM1 is known to be less abundant in
450 resting cells than in proliferating cells [39] and more notably, the nucleolar residency of
451 NPM1 in differentiated VDEC cells is somehow fitting with its described localization at the
452 nucleolus which is suggested to be regulated by post-translational modifications. Recently,
453 Wang *et al.* reported that casein kinase 2 (CK2)-mediated phosphorylation of NPM1 is
454 essential for its retention in the nuclear compartment [40] leading to its stabilization in the
455 nuclear matrix [20]. Because, androgens have been shown previously to enhance
456 phosphorylation of NPM1 by protein kinase CK2 in the rat ventral prostate nuclei [41], one
457 possibility is that androgens may regulate the dynamic nature of NPM1 in the nucleolus and
458 its ribosome biogenesis function. In this context, it is noteworthy that synthesis of ribosomes,
459 especially their assembly into polysomes, markedly declined after androgen deprivation
460 [42,43]. In addition, prostatic ribosomes from animals treated with 5α-dihydrotestosterone
461 support a significantly higher incorporation of radiolabelaled amino acids into proteins than
462 do ribosomes isolated from castrated animal controls [43]. How androgens participate in

463 rRNA synthesis, ribosome biogenesis and polysomes assembly is not yet fully understood
464 however, one hypothesis is that the interaction described herein between AR and NPM1 may
465 be important for the production of new ribosomes as a prerequisite for sustained androgen-
466 dependent epithelial cell growth and differentiation.

467 Recently, we presented evidences revealing that NPM1 operates as a novel AR-binding
468 transcriptional co-activator in androgen-associated gene transcription, albeit in a pathological
469 context [16]. In the present study, we further demonstrate that NPM1 is involved in mediating
470 gene expression induced by androgen signalling, thus acting as a positive co-regulator of AR
471 during epithelial cell differentiation. To delineate the functional significance of NPM1 in AR-
472 mediated gene expression, we examined the expression profile of the androgen-responsive
473 gene *Akr1b7* in differentiated VDEC cells treated with the small molecular inhibitor
474 NSC348884 which targets NPM1 oligomer formation. Compared with the control, we
475 observed that NPM1 dimer disruption decreases by half the accumulations of *Akr1b7*
476 transcripts and protein that were previously found to be up-regulated in the presence of
477 androgens. This reiterates the potential importance of NPM1 as a transcriptional co-activator
478 that regulates AR-mediated gene transcription and in this regard, transcription of a luciferase
479 gene reporter driven by the *Akr1b7* promoter is decreased when NPM1 is knocked-down or
480 inhibited. These observations indicate that oligomerization of NPM1 may be a necessary step
481 in regulating its transcriptional role during AR-induced transcription and prompt us to
482 speculate that NPM1 may function as a molecular chaperone for AR, preventing self-
483 aggregation, aiding AR complex formation or regulating its trafficking and correct cellular
484 localization. This activity might be explained by the ability of NPM1 to bind nuclear
485 localization signal containing peptides and to stimulate import of proteins into the nucleus
486 [1,36]. By doing so, NPM1 could presumably mediate the nuclear import of AR into the
487 nucleus upon epithelial cell differentiation and ensure AR stabilization in a transcriptional

488 competent state as already proposed for other transcription factors. On the basis of these
489 observations, we therefore examined the functional relationship between AR and NPM1 on
490 the proximal ARE of the *Akr1b7* promoter. To this end, our ChIP analysis indicates that
491 recruitment of AR and NPM1 to the proximal promoter of *Akr1b7* in response to stimulation
492 with androgens is evident and concomitant with *Akr1b7* mRNA upregulation. Such a co-
493 localization at the Akr1b7 promoter strengthens a functional involvement of NPM1 in the
494 AR-mediated transcription activation and is still consistent with the existing evidence that
495 changes in NPM1 localization might closely relate to its AR regulatory functions.

496 The hypothesis described above warrant further investigation, but we cannot overlook
497 the possibility that NPM1 enhances AR-dependent transcription. For example, NPM1 is
498 capable to bind to histones [3], activates transcription from a chromatin template [45] and
499 participate to the regulation of transcription through its interaction with several transcription
500 factors [14,46]. Recently, NPM1 was described as a novel chromatin-remodeling factor which
501 ability to enhance chromatin transcription is dependent on acetylation. In fact, NPM1 was
502 shown to be acetylated by the histone acetylase p300, resulting in an increased affinity toward
503 acetylated histones [45]. Interestingly, ligand-induced AR activity is also enhanced by p300
504 and mutation of the AR acetylation motif reduces DHT-stimulated activity revealing thus that
505 acetylation is an essential step in ligand-dependent activation of AR [47]. Together with our
506 data showing that NPM1 is an AR-interacting protein expressed in male androgen target
507 tissues, these findings suggest that NPM1 and p300 could be recruited with AR in a
508 transcriptional regulatory complex in response to androgens. Moreover, our results relative to
509 the global changes in histone H3 methylation suggest that NPM1 might also interact with
510 histone demethylation enzymes affecting transcriptional gene activation. Therefore, a
511 potential role for NPM1 in the regulation of AR transcriptional activity should be further

512 explored to determine whether NPM1 participates to the modification of promoter-associates
513 epigenetic marks and to the recruitment of the RNA polymerase II onto chromatin.
514 In summary, we have evaluated NPM1 expression in male mouse reproductive tissues
515 and have observed that both NPM1 and AR co-localize in the nuclear fraction of androgen-
516 sensitive *vas deferens* epithelial cells after differentiation. Inhibition and/or depletion of
517 NPM1 decreased expression of the androgen target gene *Akr1b7* and our current
518 immunoprecipitation/western analysis agree with the results of the ChIP assay suggesting that
519 NPM1 and AR interact with each other and bind to promoter and enhancer elements of
520 androgen responsive genes. These data support the hypothesis that changes in NPM1
521 localization closely relates to its regulatory function in the nuclear compartment and represent
522 an event in modulating response to androgens in epithelial cells of male reproductive tissues.
523

524 **ACKNOWLEDGEMENTS**

525 We are obliged to the members of the CNRS UMR6293-GReD for helpful discussion and
526 critical reading during the preparation of the manuscript. We gratefully acknowledge J.-P.
527 Saru for help in various phases of the experimental work. The NSC348884 was kindly
528 provided at first time by Dr Mahadevan (Arizona Cancer Center, University of Arizona,
529 Tucson, AZ, USA).

530

531 # ABBREVIATIONS

532 Akr1b7, aldo-keto reductase 1b7; AR, androgen receptor; ARE, androgen-responsive
533 element; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DHT, 5α-dihydrotestosterone; MAPK,
534 mitogen-activated protein kinase; NPM1, nucleophosmin; NSC348884, di-[((6-methyl-1*H*-
535 benzo[d]imidazol-2-yl)methyl)((5-methyl-3-oxo-3*H*-indol-2-yl)methyl)]) aminoethane; PolII,
536 polymerase II; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; shRNA, short hairpin RNA; T, testosterone;
537 VDEC, *vas deferens* epithelial cell.

538

539 # REFERENCES


540 1. Szebeni A, Herrera JE, Olson MO (1995) Interaction of nucleolar protein B23 with
541 peptides related to nuclear localization signals. Biochemistry 34: 8037-8042.
542 2. Savkur RS, Olson MO (1998) Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA byprotein B23
543 endoribonuclease. Nucleic Acids Res 26: 4508-4515.
544 3. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K (2001) Function of
545 nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. FEBS Lett
546 506: 272-276.
547 4. Takemura M, Sato K, Nishio M, Akiyama T, Umekawa H, et al. (1999) Nucleolar protein
548 B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase
549 alpha activity. J Biochem (Tokyo) 125: 904-909.
550 5. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG (2002) Nucleophosmin regulates
551 the stability and transcriptional activity of p53. Nat Cell Biol 4: 529-533.
552 6. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ (2004) Physical and functional interactions of the Arf
553 tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. Mol Cell Biol 24: 985-996.
554 7. Lindstrom MS (2011) NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis
555 and Chromatin Remodeling. Biochem Res Int 2011: 195209.
556 8. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP (2006) Nucleophosmin and cancer. Nat Rev
557 Cancer 6: 493-505.
558 9. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, et al. (2005) Role of
559 nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. Nature 437: 147-153.
560 10. Inder KL, Lau C, Loo D, Chaudhary N, Goodall A, et al. (2009) Nucleophosmin and
561 nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal
562 transduction. J Biol Chem 284: 28410-28419.

563 11. Loubeau G, Boudra R, Maquaire S, Lours-Calet C, Beaudoin C, et al. (2014) NPM1
564 silencing reduces tumour growth and MAPK signalling in prostate cancer cells. PloS
565 One 9: e96293.
566 12. Leotoing L, Manin M, Monte D, Baron S, Communal Y, et al. (2007) Crosstalk between
567 androgen receptor and epidermal growth factor receptor-signalling pathways: a
568 molecular switch for epithelial cell differentiation. J Mol Endocrinol 39: 151-162.
569 13. Dhar SK, Lynn BC, Daosukho C, St Clair DK (2004) Identification of nucleophosmin as
570 an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. J Biol Chem
571 279: 28209-28219.
572 14. Inouye CJ, Seto E (1994) Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-
573 protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. J Biol Chem 269: 6506-
574 6510.
575 15. Liu H, Tan BC, Tseng KH, Chuang CP, Yeh CW, et al. (2007) Nucleophosmin acts as a
576 novel AP2alpha-binding transcriptional corepressor during cell differentiation. EMBO
577 Rep 8: 394-400.
578 16. Leotoing L, Meunier L, Manin M, Mauduit C, Decaussin M, et al. (2008) Influence of
579 nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen
580 receptor in prostate cancer cell. Oncogene 27: 2858-2867.
581 17. Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour AA, Boutin EL, et al. (1992) Normal and
582 abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-
583 epithelial interactions, and growth factors. J Androl 13: 465-475.
584 18. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, et al. (1987) The
585 endocrinology and developmental biology of the prostate. Endocr Rev 8: 338-362.
586 19. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG (1987) Biological actions of androgens. Endocr
587 Rev 8: 1-28.

588 20. Tawfic S, Olson MO, Ahmed K (1995) Role of protein phosphorylation in post-
589 translational regulation of protein B23 during programmed cell death in the prostate
590 gland. J Biol Chem 270: 21009-21015.
591 21. Wang G, Pan Y, Ahmad KA, Ahmed K (2010) Protein B23/nucleophosmin/numatrin
592 nuclear dynamics in relation to protein kinase CK2 and apoptotic activity in prostate
593 cells. Biochemistry 49: 3842-3852.
594 22. Manin M, Veyssiere G, Cheyvialle D, Chevalier M, Lecher P, et al. (1992) In vitro
595 androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas
596 deferens. Endocrinology 131: 2378-2386.
597 23. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C,
598 et al. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes
599 adrenal cancer development. Hum Mol Genet 19: 1561-1576.
600 24. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, et al. (2005) LSD1
601 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent
602 transcription. Nature 437: 436-439.
603 25. Manin M, Martinez A, Van Der Schueren B, Reynaert I, Jean C (2000) Acquisition of
604 androgen-mediated expression of mouse vas deferens protein (MVDP) gene in
605 cultured epithelial cells and in vas deferens during postnatal development. J Androl
606 21: 641-650.
607 26. Feuerstein N, Spiegel S, Mond JJ (1988) The nuclear matrix protein, numatrin (B23), is
608 associated with growth factor-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts and with
609 T lymphocyte proliferation stimulated by lectins and anti-T cell antigen receptor
610 antibody. J Cell Biol 107: 1629-1642.

611 27. Hsu CY, Yung BY (1998) Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-
612 induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Oncogene 16:
613 915-923.
614 28. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA (1989) Major nucleolar proteins shuttle
615 between nucleus and cytoplasm. Cell 56: 379-390.
616 29. Chou YH, Yung BY (1995) Cell cycle phase-dependent changes of localization and
617 oligomerization states of nucleophosmin / B23. Biochem Biophys Res Commun 217:
618 313-325.
619 30. Herrera JE, Correia JJ, Jones AE, Olson MO (1996) Sedimentation analyses of the salt-
620 and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23.
621 Biochemistry 35: 2668-2673.
622 31. Manin M, Baron S, Goossens K, Beaudoin C, Jean C, et al. (2002) Androgen receptor
623 expression is regulated by the PI3- kinase/Akt pathway in normal and tumoral
624 epithelial cells. Biochem J 366: 729-736.
625 32. Qi W, Shakalya K, Stejskal A, Goldman A, Beeck S, et al. (2008) NSC348884, a
626 nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human
627 cancer cells. Oncogene 27: 4210-4220.
628 33. Rosenfeld MG, Glass CK (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by
629 nuclear receptors. J Biol Chem 276: 36865-36868.
630 34. Dumbar TS, Gentry GA, Olson MO (1989) Interaction of nucleolar phosphoprotein B23
631 with nucleic acids. Biochemistry 28: 9495-9501.
632 35. Herrera JE, Savkur R, Olson MO (1995) The ribonuclease activity of nucleolar protein
633 B23. Nucleic Acids Res 23: 3974-3979.
634 36. Szebeni A, Olson MO (1999) Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities.
635 Protein Sci 8: 905-912.

636 37. Ye K (2005) Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis.
637 Cancer Biol Ther 4: 918-923.
638 38. Okuda M (2002) The role of nucleophosmin in centrosome duplication. Oncogene 21:
639 6170-6174.
640 39. Chan WY, Liu QR, Borjigin J, Busch H, Rennert OM, et al. (1989) Characterization of
641 the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and
642 abnormal growth. Biochemistry 28: 1033-1039.
643 40. Wang G, Pan Y, Ahmad KA, Ahmed K Protein B23/nucleophosmin/numatrin nuclear
644 dynamics in relation to protein kinase CK2 and apoptotic activity in prostate cells.
645 Biochemistry 49: 3842-3852.
646 41. Tawfic S, Goueli SA, Olson MO, Ahmed K (1993) Androgenic regulation of the
647 expression and phosphorylation of prostatic nucleolar protein B23. Cell Mol Biol Res
648 39: 43-51.
649 42. Mainwaring WI, Wilce PA (1973) The control of the form and function of the ribosomes
650 in androgen-dependent tissues by testosterone. Biochem J 134: 795-805.
651 43. Mainwaring WI, Derry NS (1983) Enhanced transcription of rRNA genes by purified
652 androgen receptor complexes in vitro. J Steroid Biochem 19: 101-108.
653 44. Magee JA, Chang LW, Stormo GD, Milbrandt J (2006) Direct, androgen receptor-
654 mediated regulation of the FKBP5 gene via a distal enhancer element. Endocrinology
655 147: 590-598.
656 45. Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK (2005) Human histone chaperone
657 nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. Mol Cell Biol
658 25: 7534-7545.
659 46. Weng JJ, Yung BY (2005) Nucleophosmin/B23 regulates PCNA promoter through YY1.
660 Biochem Biophys Res Commun 335: 826-831.

661 47. Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, et al. (2000) p300 and p300/cAMP-
662 response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at
663 sites governing hormone-dependent transactivation. J Biol Chem 275: 20853-20860.
664
665

# *Références Bibliographiques*

Abbott, B.D., Lin, T.-M., Rasmussen, N.T., Albrecht, R.M., Schmid, J.E., and Peterson, R.E. (2003). Lack of expression of EGF and TGF-alpha in the fetal mouse alters formation of prostatic epithelial buds and influences the response to TCDD. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. *76*, 427–436.

Abe, M., Manola, J.B., Oh, W.K., Parslow, D.L., George, D.J., Austin, C.L., and Kantoff, P.W. (2004). Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. Clin. Prostate Cancer *3*, 49–53.

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev. *15*, 2177–2196.

Abreu-Martin, M.T., Chari, A., Palladino, A.A., Craft, N.A., and Sawyers, C.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 activates androgen receptor-dependent transcription and apoptosis in prostate cancer. Mol. Cell. Biol. *19*, 5143–5154.

Agoulnik, I.U., Vaid, A., Bingman, W.E., Erdeme, H., Frolov, A., Smith, C.L., Ayala, G., Ittmann, M.M., and Weigel, N.L. (2005). Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. Cancer Res. *65*, 7959–7967.

Ahn, J.-Y., Liu, X., Cheng, D., Peng, J., Chan, P.-K., Wade, P.A., and Ye, K. (2005). Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. Mol. Cell *18*, 435–445.

Alekseev, O.M., Richardson, R.T., Tsuruta, J.K., and O'Rand, M.G. (2011). Depletion of the histone chaperone tNASP inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer PC-3 cells. Reprod. Biol. Endocrinol. RBE *9*, 50.

Amato, R.J., Jac, J., Mohammad, T., and Saxena, S. (2008). Pilot study of rapamycin in patients with hormone-refractory prostate cancer. Clin. Genitourin. Cancer *6*, 97–102.

Amico, A.V. D', Whittington, R., Malkowicz, S.B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G.A., Tomaszewski, J.E., Renshaw, A.A., Kaplan, I., Beard, C.J., et al. (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. JAMA *280*, 969–974.

Amorino, G.P., and Parsons, S.J. (2004). Neuroendocrine cells in prostate cancer. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. *14*, 287–300.

Andrews, A.J., Chen, X., Zevin, A., Stargell, L.A., and Luger, K. (2010). The histone chaperone Nap1 promotes nucleosome assembly by eliminating nonnucleosomal histone DNA interactions. Mol. Cell *37*, 834–842.

Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. Methods San Diego Calif *34*, 266–272.

Le Bacquer, O., Petroulakis, E., Paglialunga, S., Poulin, F., Richard, D., Cianflone, K., and Sonenberg, N. (2007). Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. J. Clin. Invest. *117*, 387–396.

Balusu, R., Fiskus, W., Rao, R., Chong, D.G., Nalluri, S., Mudunuru, U., Ma, H., Chen, L., Venkannagari, S., Ha, K., et al. (2011). Targeting levels or oligomerization of

nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1. Blood *118*, 3096–3106.

Beltran, H., Rickman, D.S., Park, K., Chae, S.S., Sboner, A., MacDonald, T.Y., Wang, Y., Sheikh, K.L., Terry, S., Tagawa, S.T., et al. (2011). Molecular Characterization of Neuroendocrine Prostate Cancer and Identification of New Drug Targets. Cancer Discov. *1*, 487–495.

Bergstralh, D.T., Conti, B.J., Moore, C.B., Brickey, W.J., Taxman, D.J., and Ting, J.P.-Y. (2007). Global functional analysis of nucleophosmin in Taxol response, cancer, chromatin regulation, and ribosomal DNA transcription. Exp. Cell Res. *313*, 65–76.

Berman, D.M., Desai, N., Wang, X., Karhadkar, S.S., Reynon, M., Abate-Shen, C., Beachy, P.A., and Shen, M.M. (2004). Roles for Hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. Dev. Biol. *267*, 387–398.

Berry, P.A., Maitland, N.J., and Collins, A.T. (2008). Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. Mol. Cell. Endocrinol. *288*, 30–37.

Besten, W. den, Kuo, M.-L., Williams, R.T., and Sherr, C.J. (2005). Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. Cell Cycle Georget. Tex *4*, 1593–1598.

Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. Nucleic Acids Res. *36*, D149–D153.

Bethel, C.R., Faith, D., Li, X., Guan, B., Hicks, J.L., Lan, F., Jenkins, R.B., Bieberich, C.J., and De Marzo, A.M. (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, A.A., Sciavolino, P.J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C.R., Gridley, T., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., et al. (1999). Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. Genes Dev. *13*, 966–977.

Bieberich, C.J., Fujita, K., He, W.W., and Jay, G. (1996). Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. J. Biol. Chem. *271*, 31779–31782.

Bitting, R.L., and Armstrong, A.J. (2013). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. Endocr. Relat. Cancer *20*, R83–R99.

Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J., et al. (2000). Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. Cancer Res. *60*, 6111–6115.

Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., et al. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat. Cell Biol. *2*, 645–652.

Bryant, K.L., Mancias, J.D., Kimmelman, A.C., and Der, C.J. (2014). KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. Trends Biochem. Sci. *39*, 91–100.

Burgess, R.J., and Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. Nat. Struct. Mol. Biol. *20*, 14–22.

Cai, H., Memarzadeh, S., Stoyanova, T., Beharry, Z., Kraft, A.S., and Witte, O.N. (2012). Collaboration of Kras and Androgen Receptor Signaling Stimulates EZH2 Expression and Tumor-Propagating Cells in Prostate Cancer. Cancer Res. *72*, 4672–4681.

Cammas, A., Sanchez, B.J., Lian, X.J., Dormoy-Raclet, V., van der Giessen, K., López de Silanes, I., Ma, J., Wilusz, C., Richardson, J., Gorospe, M., et al. (2014). Destabilization of nucleophosmin mRNA by the HuR/KSRP complex is required for muscle fibre formation. Nat. Commun. *5*, 4190.

Campos, E.I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W.-H.W., Seepany, H., Gao, Z., Day, L.A., Greenblatt, J.F., et al. (2010). The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 1343–1351.

Cancilla, B., Jarred, R.A., Wang, H., Mellor, S.L., Cunha, G.R., and Risbridger, G.P. (2001). Regulation of prostate branching morphogenesis by activin A and follistatin. Dev. Biol. *237*, 145–158.

Cardillo, M.R., and Ippoliti, F. (2006). IL-6, IL-10 and HSP-90 expression in tissue microarrays from human prostate cancer assessed by computer-assisted image analysis. Anticancer Res. *26*, 3409–3416.

Carver, B.S., Chapinski, C., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Chen, Y., Chandarlapaty, S., Arora, V.K., Le, C., Koutcher, J., Scher, H., et al. (2011). Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. Cancer Cell *19*, 575–586.

Chan, S. (2004). Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. Br. J. Cancer *91*, 1420–1424.

Chan, P.K., Chan, F.Y., Morris, S.W., and Xie, Z. (1997). Isolation and characterization of the human nucleophosmin/B23 (NPM) gene: identification of the YY1 binding site at the 5' enhancer region. Nucleic Acids Res. *25*, 1225–1232.

Chang, J.H., Dumbar, T.S., and Olson, M.O. (1988). cDNA and deduced primary structure of rat protein B23, a nucleolar protein containing highly conserved sequences. J. Biol. Chem. *263*, 12824–12827.

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. (2013). A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. Cell *154*, 1074–1084.

Chang, W.Y., Birch, L., Woodham, C., Gold, L.I., and Prins, G.S. (1999). Neonatal estrogen exposure alters the transforming growth factor-beta signaling system in the developing rat prostate and blocks the transient p21(cip1/waf1) expression associated with epithelial differentiation. Endocrinology *140*, 2801–2813.

Chaveroux, C., Eichner, L.J., Dufour, C.R., Shatnawi, A., Khoutorsky, A., Bourque, G., Sonenberg, N., and Giguère, V. (2013a). Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERRα are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. Cell Metab. *17*, 586–598.

Chaveroux, C., Eichner, L.J., Dufour, C.R., Shatnawi, A., Khoutorsky, A., Bourque, G., Sonenberg, N., and Giguère, V. (2013b). Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERRα are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. Cell Metab. *17*, 586–598.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature *436*, 725–730.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. Nature *383*, 407–413.

Chou, C.C., and Yung, B.Y. (2001). Increased stability of nucleophosmin/B23 in anti-apoptotic effect of ras during serum deprivation. Mol. Pharmacol. *59*, 38–45.

Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G., and Rombauts, W. (2001). Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *76*, 23–30.

Colombo, E., Marine, J.-C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. Nat. Cell Biol. *4*, 529–533.

Cook, C., Vezina, C.M., Allgeier, S.H., Shaw, A., Yu, M., Peterson, R.E., and Bushman, W. (2007). Noggin is required for normal lobe patterning and ductal budding in the mouse prostate. Dev. Biol. *312*, 217–230.

Cooke, P.S., Young, P., and Cunha, G.R. (1991). Androgen Receptor Expression in Developing Male Reproductive Organs*. Endocrinology *128*, 2867–2873.

Cooney, K.A., Wetzel, J.C., Merajver, S.D., Macoska, J.A., Singleton, T.P., and Wojno, K.J. (1996). Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. Cancer Res. *56*, 1142–1145.

Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G., and Klocker, H. (1994a). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. Cancer Res. *54*, 5474–5478.

Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G., and Klocker, H. (1994b). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. Cancer Res. *54*, 5474–5478.

Culig, Z., Hobisch, A., Bartsch, G., and Klocker, H. (2000). Androgen receptor--an update of mechanisms of action in prostate cancer. Urol. Res. *28*, 211–219.

Culig, Z., Klocker, H., Bartsch, G., and Hobisch, A. (2002). Androgen receptors in prostate cancer. Endocr. Relat. Cancer *9*, 155–170.

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

Cunha, G.R., and Donjacour, A.A. (1989). Mesenchymal-epithelial interactions in the growth and development of the prostate. Cancer Treat. Res. *46*, 159–175.

Cunha, G.R., Chung, L.W., Shannon, J.M., Taguchi, O., and Fujii, H. (1983). Hormone-induced morphogenesis and growth: role of mesenchymal-epithelial interactions. Recent Prog. Horm. Res. *39*, 559–598.

Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. Nature *450*, 736–740.

Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. Semin. Cancer Biol. *16*, 253–264.

DeMarzo, A.M., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., and Epstein, J.I. (2003). Pathological and molecular aspects of prostate cancer. The Lancet *361*, 955–964.

Dergunova, N.N., Bulycheva, T.I., Artemenko, E.G., Shpakova, A.P., Pegova, A.N., Gemjian, E.G., Dudnik, O.A., Zatsepina, O.V., and Malashenko, O.S. (2002). A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. Immunol. Lett. *83*, 67–72.

DeSalle, L.M., and Pagano, M. (2001). Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. FEBS Lett. *490*, 179–189.

Díaz-Flores, L., Madrid, J.F., Gutiérrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Argüelles, H., and Díaz-Flores, L. (2006). Adult stem and transit-amplifying cell location. Histol. Histopathol. *21*, 995–1027.

Dibble, C.C., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2009). Characterization of Rictor Phosphorylation Sites Reveals Direct Regulation of mTOR Complex 2 by S6K1. Mol. Cell. Biol. *29*, 5657–5670.

Ding, Z., Wu, C.-J., Chu, G.C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S.R., Labrot, E.S., Wu, X., Lis, R., et al. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. Nature *470*, 269–273.

Donjacour, A.A., Thomson, A.A., and Cunha, G.R. (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, N.H., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. Science *314*, 467–471.

Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. Genes Dev. *24*, 1253–1265.

Drobnjak, M., Melamed, J., Taneja, S., Melzer, K., Wieczorek, R., Levinson, B., Zeleniuch-Jacquotte, A., Polsky, D., Ferrara, J., Perez-Soler, R., et al. (2003). Altered expression of p27 and Skp2 proteins in prostate cancer of African-American patients. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *9*, 2613–2619.

Dubrovska, A., Kim, S., Salamone, R.J., Walker, J.R., Maira, S.-M., García-Echeverría, C., Schultz, P.G., and Reddy, V.A. (2009). The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 268–273.

Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. Mol. Cell *39*, 171–183.

Economides, K.D., and Capecchi, M.R. (2003). Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. Development *130*, 2061–2069.

Edwards, S., Campbell, C., Flohr, P., Shipley, J., Giddings, I., Te-Poele, R., Dodson, A., Foster, C., Clark, J., Jhavar, S., et al. (2005). Expression analysis onto microarrays of randomly selected cDNA clones highlights HOXB13 as a marker of human prostate cancer. Br. J. Cancer *92*, 376–381.

Engreitz, J.M., Sirokman, K., McDonel, P., Shishkin, A.A., Surka, C., Russell, P., Grossman, S.R., Chow, A.Y., Guttman, M., and Lander, E.S. (2014). RNA-RNA Interactions Enable Specific Targeting of Noncoding RNAs to Nascent Pre-mRNAs and Chromatin Sites. Cell *159*, 188–199.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., et al. (2005). Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. N. Engl. J. Med. *352*, 254–266.

Fang, Y., Fliss, A.E., Robins, D.M., and Caplan, A.J. (1996). Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. J. Biol. Chem. *271*, 28697–28702.

Feldman, B.J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. Nat. Rev. Cancer *1*, 34–45.

Feuerstein, N., and Randazzo, P.A. (1991). In vivo and in vitro phosphorylation studies of numatrin, a cell cycle regulated nuclear protein, in insulin-stimulated NIH 3T3 HIR cells. Exp. Cell Res. *194*, 289–296.

Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev. *16*, 1472–1487.

Finka, A., and Goloubinoff, P. (2013). Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. Cell Stress Chaperones *18*, 591–605.

Foster, C.S., Dodson, A.R., Ambroisine, L., Fisher, G., Møller, H., Clark, J., Attard, G., De-Bono, J., Scardino, P., Reuter, V.E., et al. (2009). Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement. Br. J. Cancer *101*, 1137–1144.

Freestone, S.H., Marker, P., Grace, O.C., Tomlinson, D.C., Cunha, G.R., Harnden, P., and Thomson, A.A. (2003). Sonic hedgehog regulates prostatic growth and epithelial differentiation. Dev. Biol. *264*, 352–362.

Frehlick, L.J., Eirín-López, J.M., and Ausió, J. (2007). New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *29*, 49–59.

Fritzsche, S., Kenzelmann, M., Hoffmann, M.J., Müller, M., Engers, R., Gröne, H.-J., and Schulz, W.A. (2006). Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma. Endocr. Relat. Cancer *13*, 839–849.

Fukami-Kobayashi, J., and Mitsui, Y. (1999). Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. Exp. Cell Res. *246*, 338–347.

Gadad, S.S., Shandilya, J., Kishore, A.H., and Kundu, T.K. (2010). NPM3, a member of the nucleophosmin/nucleoplasmin family, enhances activator-dependent transcription. Biochemistry (Mosc.) *49*, 1355–1357.

Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., and Kroemer, G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. Cell Cycle Georget. Tex *5*, 2592–2601.

Gingrich, J.R., Barrios, R.J., Morton, R.A., Boyce, B.F., DeMayo, F.J., Finegold, M.J., Angelopoulou, R., Rosen, J.M., and Greenberg, N.M. (1996). Metastatic Prostate Cancer in a Transgenic Mouse. Cancer Res. *56*, 4096–4102.

Gioeli, D., and Paschal, B.M. (2012). Post-translational modification of the androgen receptor. Mol. Cell. Endocrinol. *352*, 70–78.

Gioeli, D., Mandell, J.W., Petroni, G.R., Frierson, H.F., and Weber, M.J. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. Cancer Res. *59*, 279–284.

Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, A., Talcott, J., Hennekens, C.H., and Kantoff, P.W. (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 3320–3323.

Gleason, D.F., and Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. J. Urol. *111*, 58–64.

Gnanapragasam, V.J., Leung, H.Y., Pulimood, A.S., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2001). Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. Br. J. Cancer *85*, 1928–1936.

Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., et al. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. Cell *140*, 678–691.

Gong, C., and Maquat, L.E. (2011). lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. Nature *470*, 284–288.

Grasso, C.S., Wu, Y.-M., Robinson, D.R., Cao, X., Dhanasekaran, S.M., Khan, A.P., Quist, M.J., Jing, X., Lonigro, R.J., Brenner, J.C., et al. (2012a). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature *487*, 239–243.

Grasso, C.S., Wu, Y.-M., Robinson, D.R., Cao, X., Dhanasekaran, S.M., Khan, A.P., Quist, M.J., Jing, X., Lonigro, R.J., Brenner, J.C., et al. (2012b). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature *487*, 239–243.

Gregory, C.W., He, B., Johnson, R.T., Ford, O.H., Mohler, J.L., French, F.S., and Wilson, E.M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. Cancer Res. *61*, 4315–4319.

Gregory, C.W., Fei, X., Ponguta, L.A., He, B., Bill, H.M., French, F.S., and Wilson, E.M. (2004). Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. J. Biol. Chem. *279*, 7119–7130.

Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., and Pandolfi, P.P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. Nature *437*, 147–153.

Grishina, I.B., Kim, S.Y., Ferrara, C., Makarenkova, H.P., and Walden, P.D. (2005). BMP7 inhibits branching morphogenesis in the prostate gland and interferes with Notch signaling. Dev. Biol. *288*, 334–347.

Gubin, A.N., Njoroge, J.M., Bouffard, G.G., and Miller, J.L. (1999). Gene expression in proliferating human erythroid cells. Genomics *59*, 168–177.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKCα, but Not S6K1. Dev. Cell *11*, 859–871.

Guo, L., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1996). Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. Genes Dev. *10*, 165–175.

Guo, Z., Yang, X., Sun, F., Jiang, R., Linn, D.E., Chen, H., Chen, H., Kong, X., Melamed, J., Tepper, C.G., et al. (2009). A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. Cancer Res. *69*, 2305–2313.

Gurumurthy, M., Tan, C.H., Ng, R., Zeiger, L., Lau, J., Lee, J., Dey, A., Philp, R., Li, Q., Lim, T.M., et al. (2008). Nucleophosmin interacts with HEXIM1 and regulates RNA polymerase II transcription. J. Mol. Biol. *378*, 302–317.

Halkidou, K., Gnanapragasam, V.J., Mehta, P.B., Logan, I.R., Brady, M.E., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2003). Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. Oncogene *22*, 2466–2477.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. Nat. Cell Biol. *4*, 850–858.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011a). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011b). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Harris, K.A., and Reese, D.M. (2001). Treatment options in hormone-refractory prostate cancer: current and future approaches. Drugs *61*, 2177–2192.

Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature *475*, 324–332.

Heidenberg, H.B., Sesterhenn, I.A., Gaddipati, J.P., Weghorst, C.M., Buzard, G.S., Moul, J.W., and Srivastava, S. (1995). Alteration of the Tumor Suppressor Gene p53 in a High Fraction of Hormone Refractory Prostate Cancer. J. Urol. *154*, 414–421.

Herger, B., Fernandez, P., Fiskus, W., Rao, R., and Bhalla, K. (2007). Targeting mutant nucleophosmin (NPM)1 induces differentiation and loss of clonogenic survival of human AML cells. Cancer Res. *67*, 4084–4084.

Hill, R., Song, Y., Cardiff, R.D., and Van Dyke, T. (2005). Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model. Cancer Res. *65*, 10243–10254.

Hingorani, K., Szebeni, A., and Olson, M.O. (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. J. Biol. Chem. *275*, 24451–24457.

Hodgson, M.C., Astapova, I., Cheng, S., Lee, L.J., Verhoeven, M.C., Choi, E., Balk, S.P., and Hollenberg, A.N. (2005). The Androgen Receptor Recruits Nuclear Receptor CoRepressor (N-CoR) in the Presence of Mifepristone via Its N and C Termini Revealing a Novel Molecular Mechanism for Androgen Receptor Antagonists. J. Biol. Chem. *280*, 6511–6519.

Hong, H., Kao, C., Jeng, M.-H., Eble, J.N., Koch, M.O., Gardner, T.A., Zhang, S., Li, L., Pan, C.-X., Hu, Z., et al. (2004). Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. Cancer *101*, 83–89.

Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. Cell *136*, 763–776.

Hu, R., Dunn, T.A., Wei, S., Isharwal, S., Veltri, R.W., Humphreys, E., Han, M., Partin, A.W., Vessella, R.L., Isaacs, W.B., et al. (2009). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. *69*, 16–22.

Hu, Y.-C., Yeh, S., Yeh, S.-D., Sampson, E.R., Huang, J., Li, P., Hsu, C.-L., Ting, H.-J., Lin, H.-K., Wang, L., et al. (2004). Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer. J. Biol. Chem. *279*, 33438–33446.

Huang, J., Dibble, C.C., Matsuzaki, M., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. Mol. Cell. Biol. *28*, 4104–4115.

Huang, L., Pu, Y., Alam, S., Birch, L., and Prins, G.S. (2005a). 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, W.Y., Birch, L., Luccio-Camelo, D., Yamaguchi, T., and Prins, G.S. (2009). The role of Wnt5a in prostate gland development. Dev. Biol. *328*, 188–199.

Huang, N., Negi, S., Szebeni, A., and Olson, M.O.J. (2005b). Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. J. Biol. Chem. *280*, 5496–5502.

HUGGINS C, STEVENS RE, Jr., and HODGES CV (1941). Studies on prostatic cancer: Ii. the effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. Arch. Surg. *43*, 209–223.

Hurwitz, A.A., Foster, B.A., Allison, J.P., Greenberg, N.M., and Kwon, E.D. (2001). The TRAMP mouse as a model for prostate cancer. Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan Al *Chapter 20*, Unit 20.5.

Inder, K.L., Lau, C., Loo, D., Chaudhary, N., Goodall, A., Martin, S., Jones, A., van der Hoeven, D., Parton, R.G., Hill, M.M., et al. (2009). Nucleophosmin and Nucleolin Regulate K-Ras Plasma Membrane Interactions and MAPK Signal Transduction. J. Biol. Chem. *284*, 28410–28419.

Ingham, P.W., Nakano, Y., and Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. Nat. Rev. Genet. *12*, 393–406.

Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003a). Tumor Suppressor ARF Degrades B23, a Nucleolar Protein Involved in Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation. Mol. Cell *12*, 1151–1164.

Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003b). Tumor Suppressor ARF Degrades B23, a Nucleolar Protein Involved in Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation. Mol. Cell *12*, 1151–1164.

Ito, T., Bulger, M., Pazin, M.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. Cell *90*, 145–155.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. Nat. Cell Biol. *6*, 1122–1128.

Jenster, G., van der Korput, H.A.G.M., Trapman, J., and Brinkmann, A.O. (1995a). Identification of Two Transcription Activation Units in the N-terminal Domain of the Human Androgen Receptor. J. Biol. Chem. *270*, 7341–7346.

Jenster, G., van der Korput, H.A., Trapman, J., and Brinkmann, A.O. (1995b). Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. J. Biol. Chem. *270*, 7341–7346.

Jian, Y., Gao, Z., Sun, J., Shen, Q., Feng, F., Jing, Y., and Yang, C. (2009). RNA aptamers interfering with nucleophosmin oligomerization induce apoptosis of cancer cells. Oncogene *28*, 4201–4211.

Johansson, H., and Simonsson, S. (2010). Core transcription factors, Oct4, Sox2 and Nanog, individually form complexes with nucleophosmin (Npm1) to control embryonic stem (ES) cell fate determination. Aging *2*, 815–822.

Johnson, A., and Skotheim, J.M. (2013). Start and the restriction point. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 717–723.

Jung, C., Kim, R.-S., Zhang, H.-J., Lee, S.-J., and Jeng, M.-H. (2004). HOXB13 induces growth suppression of prostate cancer cells as a repressor of hormone-activated androgen receptor signaling. Cancer Res. *64*, 9185–9192.

Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., and Hightower, L.E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress Chaperones *14*, 105–111.

Kappes, F., Waldmann, T., Mathew, V., Yu, J., Zhang, L., Khodadoust, M.S., Chinnaiyan, A.M., Luger, K., Erhardt, S., Schneider, R., et al. (2011). The DEK oncoprotein is a Su(var) that is essential to heterochromatin integrity. Genes Dev. *25*, 673–678.

Kasper, S. (2008). Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. Stem Cell Rev. *4*, 193–201.

Kim, B.-Y., Gaynor, R.B., Song, K., Dritschilo, A., and Jung, M. (2002). Constitutive activation of NF-kappaB in Ki-ras-transformed prostate epithelial cells. Oncogene *21*, 4490–4497.

Kim, J.-H., Yoon, M.-S., and Chen, J. (2009). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mediates amino acid inhibition of insulin signaling through serine 727 phosphorylation. J. Biol. Chem. *284*, 35425–35432.

King, P.J., Guasti, L., and Laufer, E. (2008). Hedgehog signalling in endocrine development and disease. J. Endocrinol. *198*, 439–450.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell *128*, 693–705.

Kreisberg, J.I., Malik, S.N., Prihoda, T.J., Bedolla, R.G., Troyer, D.A., Kreisberg, S., and Ghosh, P.M. (2004). Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. Cancer Res. *64*, 5232–5236.

Ku, S., Lasorsa, E., Adelaiye, R., Ramakrishnan, S., Ellis, L., and Pili, R. (2014). Inhibition of hsp90 augments docetaxel therapy in castrate resistant prostate cancer. PloS One *9*, e103680.

Kuo, M.-L., Besten, W. den, Bertwistle, D., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. Genes Dev. *18*, 1862–1874.

Kurahashi, T., Miyake, H., Hara, I., and Fujisawa, M. (2007). Expression of major heat shock proteins in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. J. Urol. *177*, 757–761.

Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T.M., Ojala, P.M., Meek, D., and Laiho, M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. Cancer Cell *5*, 465–475.

Lamm, M.L., Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Lee, J., Clemens, J.Q., Hebner, C.M., and Bushman, W. (2001). Mesenchymal factor bone morphogenetic protein 4 restricts ductal budding and branching morphogenesis in the developing prostate. Dev. Biol. *232*, 301–314.

Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C., and Garrido, C. (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. Prion *1*, 53–60.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. J. Cell Sci. *126*, 1713–1719.

Laschak, M., Bechtel, M., Spindler, K.-D., and Hessenauer, A. (2011). Inability of NCoR/SMRT to repress androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cell lines. Int. J. Mol. Med. *28*, 645–651.

Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., and Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. Nature *275*, 416–420.

Lasnitzki, I., and Mizuno, T. (1977). Induction of the rat prostate gland by androgens in organ culture. J. Endocrinol. *74*, 47–55.

Laurie, N.A., Donovan, S.L., Shih, C.-S., Zhang, J., Mills, N., Fuller, C., Teunisse, A., Lam, S., Ramos, Y., Mohan, A., et al. (2006). Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. Nature *444*, 61–66.

Leong, K.G., Wang, B.-E., Johnson, L., and Gao, W.-Q. (2008). Generation of a prostate from a single adult stem cell. Nature *456*, 804–808.

Léotoing, L., Meunier, L., Manin, M., Mauduit, C., Decaussin, M., Verrijdt, G., Claessens, F., Benahmed, M., Veyssière, G., Morel, L., et al. (2008a). Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. Oncogene *27*, 2858–2867.

Léotoing, L., Meunier, L., Manin, M., Mauduit, C., Decaussin, M., Verrijdt, G., Claessens, F., Benahmed, M., Veyssière, G., Morel, L., et al. (2008b). Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. Oncogene *27*, 2858–2867.

Li, Z., and Hann, S.R. (2013). Nucleophosmin is essential for c-Myc nucleolar localization and c-Myc-mediated rDNA transcription. Oncogene *32*, 1988–1994.

Li, C., Larsson, C., Futreal, A., Lancaster, J., Phelan, C., Aspenblad, U., Sundelin, B., Liu, Y., Ekman, P., Auer, G., et al. (1998). Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. Oncogene *16*, 481–487.

Li, J., Zhang, X., Sejas, D.P., Bagby, G.C., and Pang, Q. (2004). Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. J. Biol. Chem. *279*, 41275–41279.

Li, J., Fu, J., Toumazou, C., Yoon, H.-G., and Wong, J. (2006). A role of the amino-terminal (N) and carboxyl-terminal (C) interaction in binding of androgen receptor to chromatin. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *20*, 776–785.

Li, J., Sejas, D.P., Burma, S., Chen, D.J., and Pang, Q. (2007). Nucleophosmin suppresses oncogene-induced apoptosis and senescence and enhances oncogenic cooperation in cells with genomic instability. Carcinogenesis *28*, 1163–1170.

Li, Z., Boone, D., and Hann, S.R. (2008). Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 18794–18799.

Lin, Y., Liu, G., Zhang, Y., Hu, Y.-P., Yu, K., Lin, C., McKeehan, K., Xuan, J.W., Ornitz, D.M., Shen, M.M., et al. (2007). Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase is required for prostatic morphogenesis and the acquisition of strict androgen dependency for adult tissue homeostasis. Dev. Camb. Engl. *134*, 723–734.

Lindström, M.S. (2010). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochem. Res. Int. *2011*, e195209.

Lindström, M.S. (2011). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochem. Res. Int. *2011*, 195209.

Linja, M.J., Savinainen, K.J., Saramäki, O.R., Tammela, T.L.J., Vessella, R.L., and Visakorpi, T. (2001). Amplification and Overexpression of Androgen Receptor Gene in Hormone-Refractory Prostate Cancer. Cancer Res. *61*, 3550–3555.

Liu, X., Liu, Z., Jang, S.-W., Ma, Z., Shinmura, K., Kang, S., Dong, S., Chen, J., Fukasawa, K., and Ye, K. (2007). Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 9679–9684.

Lo, S.-J., Fan, L.-C., Tsai, Y.-F., Lin, K.-Y., Huang, H.-L., Wang, T.-H., Liu, H., Chen, T.-C., Huang, S.-F., Chang, C.-J., et al. (2013). A novel interaction of nucleophosmin with BCL2-associated X protein regulating death evasion and drug sensitivity in human hepatoma cells. Hepatol. Baltim. Md *57*, 1893–1905.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. (2005). Rheb Binds and Regulates the mTOR Kinase. Curr. Biol. *15*, 702–713.

Lopergolo, A., and Zaffaroni, N. (2009). Biomolecular markers of outcome prediction in prostate cancer. Cancer *115*, 3058–3067.

Lotan, T.L., Gurel, B., Sutcliffe, S., Esopi, D., Liu, W., Xu, J., Hicks, J.L., Park, B.H., Humphreys, E., Partin, A.W., et al. (2011). PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 6563–6573.

Loubeau, G., Boudra, R., Maquaire, S., Lours-Calet, C., Beaudoin, C., Verrelle, P., and Morel, L. (2014). NPM1 silencing reduces tumour growth and MAPK signalling in prostate cancer cells. PloS One *9*, e96293.

Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. Nature *432*, 307–315.

Lu, W., Luo, Y., Kan, M., and McKeehan, W.L. (1999). Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. J. Biol. Chem. *274*, 12827–12834.

MacArthur, C.A., and Shackleford, G.M. (1997). Npm3: a novel, widely expressed gene encoding a protein related to the molecular chaperones nucleoplasmin and nucleophosmin. Genomics *42*, 137–140.

Maddison, L.A., Sutherland, B.W., Barrios, R.J., and Greenberg, N.M. (2004a). Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer. Cancer Res. *64*, 6018–6025.

Maddison, L.A., Huss, W.J., Barrios, R.M., and Greenberg, N.M. (2004b). Differential expression of cell cycle regulatory molecules and evidence for a “cyclin switch” during progression of prostate cancer. The Prostate *58*, 335–344.

Maddison, L.A., Sutherland, B.W., Barrios, R.J., and Greenberg, N.M. (2004c). Conditional Deletion of Rb Causes Early Stage Prostate Cancer. Cancer Res. *64*, 6018–6025.

Maiguel, D.A., Jones, L., Chakravarty, D., Yang, C., and Carrier, F. (2004). Nucleophosmin Sets a Threshold for p53 Response to UV Radiation. Mol. Cell. Biol. *24*, 3703–3711.

Majumder, P.K., Febbo, P.G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L.M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T.J., Golub, T.R., et al. (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. Nat. Med. *10*, 594–601.

Majumder, S., Liu, Y., Ford, O.H., Mohler, J.L., and Whang, Y.E. (2006). Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. The Prostate *66*, 1292–1301.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. Nat. Rev. Genet. *11*, 285–296.

Martinou, J.C., and Green, D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 63–67.

De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Epstein, J.I., and Coffey, D.S. (1998). Prostate Stem Cell Compartments. Am. J. Pathol. *153*, 911–919.

Massagué, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. Nature *432*, 298–306.

Melamed, J., Einhorn, J.M., and Ittmann, M.M. (1997). Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *3*, 1867–1872.

Mellinghoff, I.K., Vivanco, I., Kwon, A., Tran, C., Wongvipat, J., and Sawyers, C.L. (2004). HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. Cancer Cell *6*, 517–527.

Miller, G.J., Miller, H.L., van Bokhoven, A., Lambert, J.R., Werahera, P.N., Schirripa, O., Lucia, M.S., and Nordeen, S.K. (2003). Aberrant HOXC Expression Accompanies the Malignant Phenotype in Human Prostate. Cancer Res. *63*, 5879–5888.

Montano, X., and Djamgoz, M.B.A. (2004a). Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. FEBS Lett. *571*, 1–8.

Montano, X., and Djamgoz, M.B.A. (2004b). Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. FEBS Lett. *571*, 1–8.

Montgomery, R.B., Mostaghel, E.A., Vessella, R., Hess, D.L., Kalhorn, T.F., Higano, C.S., True, L.D., and Nelson, P.S. (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. Cancer Res. *68*, 4447–4454.

Mosammaparast, N., Ewart, C.S., and Pemberton, L.F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. EMBO J. *21*, 6527–6538.

Motoi, N., Suzuki, K.-I., Hirota, R., Johnson, P., Oofusa, K., Kikuchi, Y., and Yoshizato, K. (2008). Identification and characterization of nucleoplasmin 3 as a histone-binding protein in embryonic stem cells. Dev. Growth Differ. *50*, 307–320.

Mukai, M., Dong, Q., Hardy, M.P., Kiyokawa, H., Peterson, R.E., and Cooke, P.S. (2005). Altered prostatic epithelial proliferation and apoptosis, prostatic development, and serum testosterone in mice lacking cyclin-dependent kinase inhibitors. Biol. Reprod. *73*, 951–958.

Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Krishna, N.S., Underwood, M.A., and Edwards, J. (2005). Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer. The Prostate *64*, 101–107.

Mulholland, D.J., Tran, L.M., Li, Y., Cai, H., Morim, A., Wang, S., Plaisier, S., Garraway, I.P., Huang, J., Graeber, T.G., et al. (2011). Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth. Cancer Cell *19*, 792–804.

Mulholland, D.J., Kobayashi, N., Ruscetti, M., Zhi, A., Tran, L.M., Huang, J., Gleave, M., and 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*, 1878–1889.

Murray, A.W. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. Cell *116*, 221–234.

Negi, S.S., and Olson, M.O.J. (2006). Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. J. Cell Sci. *119*, 3676–3685.

Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E., et al. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. Cell *103*, 127–140.

Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. FEBS Lett. *506*, 272–276.

Okuwaki, M., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2002a). The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. Mol. Biol. Cell *13*, 2016–2030.

Okuwaki, M., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2002b). The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. Mol. Biol. Cell *13*, 2016–2030.

Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Khochbin, S., Solary, E., et al. (2006). HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *20*, 1179–1181.

Parisotto, M., and Metzger, D. (2013). Genetically engineered mouse models of prostate cancer. Mol. Oncol. *7*, 190–205.

Patel, R., Gao, M., Ahmad, I., Fleming, J., Singh, L.B., Rai, T.S., McKie, A.B., Seywright, M., Barnetson, R.J., Edwards, J., et al. (2013). Sprouty2, PTEN, and PP2A interact to regulate prostate cancer progression. J. Clin. Invest. *123*, 1157–1175.

Pearson, H.B., Phesse, T.J., and Clarke, A.R. (2009). K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. Cancer Res. *69*, 94–101.

Philpott, A., and Leno, G.H. (1992). Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in Xenopus egg extracts. Cell *69*, 759–767.

Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (1998). Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 8858–8863.

Podlasek, C.A., Duboule, D., and Bushman, W. (1997). Male accessory sex organ morphogenesis is altered by loss of function of Hoxd-13. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *208*, 454–465.

Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Clemens, J.Q., Bak, P.M., and Bushman, W. (1999a). Prostate development requires Sonic hedgehog expressed by the urogenital sinus epithelium. Dev. Biol. *209*, 28–39.

Podlasek, C.A., Clemens, J.Q., and Bushman, W. (1999b). Hoxa-13 gene mutation results in abnormal seminal vesicle and prostate development. J. Urol. *161*, 1655–1661.

Pourmand, G., Ziaee, A.-A., Salem, S., Abedi, A.R., Mehrsai, A., Alavi, H.A., Ahmadi, A., and Saadati, H.R. (2009). Role of PTEN Gene in Progression of Prostate Cancer. Urol. J. *4*, 95–100.

Prescott, J., and Coetzee, G.A. (2006). Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. Cancer Lett. *231*, 12–19.

Prins, G.S., and Putz, O. (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. Differentiation *76*, 641–659.

Pu, Y., Huang, L., and Prins, G.S. (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.

Pu, Y., Huang, L., Birch, L., and Prins, G.S. (2007). Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: Fgf10-dependent and -independent pathways. Endocrinology *148*, 1697–1706.

Qiu, J. (2006). Epigenetics: unfinished symphony. Nature *441*, 143–145.

Rajan, R., Vanderslice, R., Kapur, S., Lynch, J., Thompson, R., and Djakiew, D. (1996). Epidermal growth factor (EGF) promotes chemomigration of a human prostate tumor cell line, and EGF immunoreactive proteins are present at sites of metastasis in the stroma of lymph nodes and medullary bone. The Prostate *28*, 1–9.

Ren, Z., Aerts, J.L., Pen, J.J., Heirman, C., Breckpot, K., and De Grève, J. (2014). Phosphorylated STAT3 physically interacts with NPM and transcriptionally enhances its expression in cancer. Oncogene.

Robzyk, K., Oen, H., Buchanan, G., Butler, L.M., Tilley, W.D., Mandal, A.K., Rosen, N., and Caplan, A.J. (2007). Uncoupling of hormone-dependence from chaperone-dependence in the L701H mutation of the androgen receptor. Mol. Cell. Endocrinol. *268*, 67–74.

Rocchi, P., Beraldi, E., Ettinger, S., Fazli, L., Vessella, R.L., Nelson, C., and Gleave, M. (2005). Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. Cancer Res. *65*, 11083–11093.

van Royen, M.E., van Cappellen, W.A., de Vos, C., Houtsmuller, A.B., and Trapman, J. (2012). Stepwise androgen receptor dimerization. J. Cell Sci. *125*, 1970–1979.

Ruscetti, M.A., and Wu, H. (2013). PTEN in Prostate Cancer. In Prostate Cancer, D.J. Tindall, ed. (Springer New York), pp. 87–137.

Sakr, W., Gp, H., Bf, C., Je, P., and Jd, C. (1993). The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. J. Urol. *150*, 379–385.

Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Brogna, C., Piccirilli, M., Andrea, G. D', Occhiogrosso, G., Pichierri, A., and Caroli, E. (2005). Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *24*, 203–207.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. Curr. Opin. Cell Biol. *17*, 596–603.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. Mol. Cell *22*, 159–168.

Sato, K., Hayami, R., Wu, W., Nishikawa, T., Nishikawa, H., Okuda, Y., Ogata, H., Fukuda, M., and Ohta, T. (2004). Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. J. Biol. Chem. *279*, 30919–30922.

Savkur, R.S., and Olson, M.O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA byprotein B23 endoribonuclease. Nucleic Acids Res. *26*, 4508–4515.

Schoenberg, D.R., and Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. Nat. Rev. Genet. *13*, 246–259.

Schutzman, J.L., and Martin, G.R. (2012). Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 20023–20028.

Sekhar, K.R., Benamar, M., Venkateswaran, A., Sasi, S., Penthala, N.R., Crooks, P.A., Hann, S.R., Geng, L., Balusu, R., Abbas, T., et al. (2014). Targeting Nucleophosmin 1 Represents a Rational Strategy for Radiation Sensitization. Int. J. Radiat. Oncol. *89*, 1106–1114.

Sengupta, S., Peterson, T.R., and Sabatini, D.M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. Mol. Cell *40*, 310–322.

Shandilya, J., Swaminathan, V., Gadad, S.S., Choudhari, R., Kodaganur, G.S., and Kundu, T.K. (2009). Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. Mol. Cell. Biol. *29*, 5115–5127.

Sharma, A., Yeow, W.-S., Ertel, A., Coleman, I., Clegg, N., Thangavel, C., Morrissey, C., Zhang, X., Comstock, C.E.S., Witkiewicz, A.K., et al. (2010). The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. J. Clin. Invest. *120*, 4478–4492.

Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. Genes Dev. *24*, 1967–2000.

Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. Cell *96*, 575–585.

Shiota, M., Yokomizo, A., Masubuchi, D., Tada, Y., Inokuchi, J., Eto, M., Uchiumi, T., Fujimoto, N., and Naito, S. (2010). Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. The Prostate *70*, 540–554.

Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., Yang, A., Montironi, R., McKeon, F., and Loda, M. (2000). p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. Am. J. Pathol. *157*, 1769–1775.

Signoretti, S., Pires, M.M., Lindauer, M., Horner, J.W., Grisanzio, C., Dhar, S., Majumder, P., McKeon, F., Kantoff, P.W., Sellers, W.R., et al. (2005). p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 11355–11360.

Siiteri, P.K., and Wilson, J.D. (1974). Testosterone Formation and Metabolism During Male Sexual Differentiation in the Human Embryo. J. Clin. Endocrinol. Metab. *38*, 113–125.

Sitaram, N., and Nagaraj, R. (1995). Seminal plasmin. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *17*, 415–422.

Skjøth, I.H.E., and Issinger, O.-G. (2006). Profiling of signaling molecules in four different human prostate carcinoma cell lines before and after induction of apoptosis. Int. J. Oncol. *28*, 217–229.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat. Genet. *21*, 70–71.

Sparks, C.A., and Guertin, D.A. (2010). Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. Oncogene *29*, 3733–3744.

Spivakov, M., and Fisher, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. Nat. Rev. Genet. *8*, 263–271.

Staibano, S., Mascolo, M., Mancini, F.P., Kisslinger, A., Salvatore, G., Di Benedetto, M., Chieffi, P., Altieri, V., Prezioso, D., Ilardi, G., et al. (2009). Overexpression of chromatin assembly factor-1 (CAF-1) p60 is predictive of adverse behaviour of prostatic cancer. Histopathology *54*, 580–589.

Stanbrough, M., Leav, I., Kwan, P.W., Bubley, G.J., and Balk, S.P. (2001). Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 10823–10828.

Stanbrough, M., Bubley, G.J., Ross, K., Golub, T.R., Rubin, M.A., Penning, T.M., Febbo, P.G., and Balk, S.P. (2006). Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. Cancer Res. *66*, 2815–2825.

Sugimoto, M., Kuo, M.-L., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2003). Nucleolar Arf Tumor Suppressor Inhibits Ribosomal RNA Processing. Mol. Cell *11*, 415–424.

Sugimura, Y., Foster, B.A., Hom, Y.K., Lipschutz, J.H., Rubin, J.S., Finch, P.W., Aaronson, S.A., Hayashi, N., Kawamura, J., and Cunha, G.R. (1996). Keratinocyte growth factor (KGF) can replace testosterone in the ductal branching morphogenesis of the rat ventral prostate. Int. J. Dev. Biol. *40*, 941–951.

Sullivan, K.D., Gallant-Behm, C.L., Henry, R.E., Fraikin, J.-L., and Espinosa, J.M. (2012). The p53 circuit board. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer *1825*, 229–244.

Szebeni, A., Hingorani, K., Negi, S., and Olson, M.O.J. (2003). Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23. J. Biol. Chem. *278*, 9107–9115.

Takeda, H., Lasnitzki, I., and Mizuno, T. (1986). Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. J. Endocrinol. *110*, 467–470.

Takemura, M., Sato, K., Nishio, M., Akiyama, T., Umekawa, H., and Yoshida, S. (1999a). Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. J. Biochem. (Tokyo) *125*, 904–909.

Takemura, M., Sato, K., Nishio, M., Akiyama, T., Umekawa, H., and Yoshida, S. (1999b). Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. J. Biochem. (Tokyo) *125*, 904–909.

Tan, C., and Du, X. (2012). KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. World J. Gastroenterol. WJG *18*, 5171–5180.

Tan, J., Sharief, Y., Hamil, K.G., Gregory, C.W., Zang, D.Y., Sar, M., Gumerlock, P.H., deVere White, R.W., Pretlow, T.G., Harris, S.E., et al. (1997). Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *11*, 450–459.

Tantivejkul, K., Kalikin, L.M., and Pienta, K.J. (2004). Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. J. Cell. Biochem. *91*, 706–717.

Taplin, M.-E., Bubley, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N., and Balk, S.P. (1995). Mutation of the Androgen-Receptor Gene in Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer. N. Engl. J. Med. *332*, 1393–1398.

Taplin, M.E., Bubley, G.J., Ko, Y.J., Small, E.J., Upton, M., Rajeshkumar, B., and Balk, S.P. (1999). Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. Cancer Res. *59*, 2511–2515.

Tarapore, P., Shinmura, K., Suzuki, H., Tokuyama, Y., Kim, S.-H., Mayeda, A., and Fukasawa, K. (2006). Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing. FEBS Lett. *580*, 399–409.

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. (2010a). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell *18*, 11–22.

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. (2010b). Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. Cancer Cell *18*, 11–22.

Templeton, A.J., Dutoit, V., Cathomas, R., Rothermundt, C., Bärtschi, D., Dröge, C., Gautschi, O., Borner, M., Fechter, E., Stenner, F., et al. (2013). Phase 2 trial of single-agent everolimus in chemotherapy-naive patients with castration-resistant prostate cancer (SAKK 08/08). Eur. Urol. *64*, 150–158.

Thomson, A.A. (2001). Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. Reproduction *121*, 187–195.

Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. J. Biol. Chem. *284*, 8023–8032.

Tilley, W.D., Buchanan, G., Hickey, T.E., and Bentel, J.M. (1996). Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *2*, 277–285.

Tímár, J. (2014). The clinical relevance of KRAS gene mutation in non-small-cell lung cancer. Curr. Opin. Oncol. *26*, 138–144.

Tokuyama, Y., Horn, H.F., Kawamura, K., Tarapore, P., and Fukasawa, K. (2001). Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. J. Biol. Chem. *276*, 21529–21537.

Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Cao, X., Wang, L., Dhanasekaran, S.M., Kalyana-Sundaram, S., Wei, J.T., Rubin, M.A., Pienta, K.J., et al. (2007). Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. Nat. Genet. *39*, 41–51.

Tomlinson, D.C., Freestone, S.H., Grace, O.C., and Thomson, A.A. (2004). Differential effects of transforming growth factor-beta1 on cellular proliferation in the developing prostate. Endocrinology *145*, 4292–4300.

Tørring, N., Jensen, L.V., Wen, J.G., Sørensen, F.B., Djurhuus, J.C., and Nexø, E. (2001). Chronic treatment with epidermal growth factor induces growth of the rat ventral prostate. Scand. J. Urol. Nephrol. *35*, 339–344.

Tsang, C.K., Liu, H., and Zheng, X.F.S. (2010). mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. Cell Cycle *9*, 953–957.

Tsihlias, J., Kapusta, L.R., DeBoer, G., Morava-Protzner, I., Zbieranowski, I., Bhattacharya, N., Catzavelos, G.C., Klotz, L.H., and Slingerland, J.M. (1998). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. Cancer Res. *58*, 542–548.

Tyagi, R.K., Lavrovsky, Y., Ahn, S.C., Song, C.S., Chatterjee, B., and Roy, A.K. (2000). Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *14*, 1162–1174.

Umekawa, H., Chang, J.H., Correia, J.J., Wang, D., Wingfield, P.T., and Olson, M.O. (1993). Nucleolar protein B23: bacterial expression, purification, oligomerization and secondary structures of two isoforms. Cell. Mol. Biol. Res. *39*, 635–645.

Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D., and Raymond, E. (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *16*, 525–537.

Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinänen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J., and Kallioniemi, O.-P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat. Genet. *9*, 401–406.

Waltregny, D., Alami, Y., Clausse, N., de Leval, J., and Castronovo, V. (2002). Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. The Prostate *50*, 162–169.

Wang, B.-E., Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., De Sauvage, F.J., and 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, D., Baumann, A., Szebeni, A., and Olson, M.O. (1994). The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. J. Biol. Chem. *269*, 30994–30998.

Wang, Q.-Q., Zhang, Z.-Y., Xiao, J.-Y., Yi, C., Li, L.-Z., Huang, Y., and Yun, J.-P. (2011). Knockdown of nucleophosmin induces S-phase arrest in HepG2 cells. Chin. J. Cancer *30*, 853–860.

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

Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., and Cunha, G. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. Differ. Res. Biol. Divers. *68*, 270–279.

Weber, M.J., and Gioeli, D. (2004). Ras signaling in prostate cancer progression. J. Cell. Biochem. *91*, 13–25.

Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. Nat. Cell Biol. *1*, 20–26.

van de Wijngaart, D.J., Dubbink, H.J., van Royen, M.E., Trapman, J., and Jenster, G. (2012). Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. Mol. Cell. Endocrinol. *352*, 57–69.

Wilson, J.D., and Lasnitzki, I. (1971). Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the rabbit and rat. Endocrinology *89*, 659–668.

Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L., and Sobin, L.H. (2002). TNM residual tumor classification revisited. Cancer *94*, 2511–2516.

Witzel, I.-I., Koh, L.F., and Perkins, N.D. (2010). Regulation of cyclin D1 gene expression. Biochem. Soc. Trans. *38*, 217.

Wong, J.C.T., Hasan, M.R., Rahman, M., Yu, A.C., Chan, S.K., Schaeffer, D.F., Kennecke, H.F., Lim, H.J., Owen, D., and Tai, I.T. (2013). Nucleophosmin 1, upregulated in adenomas and cancers of the colon, inhibits p53-mediated cellular senescence. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *133*, 1567–1577.

Wu, L., Grigoryan, A.V., Li, Y., Hao, B., Pagano, M., and Cardozo, T.J. (2012). Specific small molecule inhibitors of Skp2-mediated p27 degradation. Chem. Biol. *19*, 1515–1524.

Wu, M.H., Chang, J.H., Chou, C.C., and Yung, B.Y.M. (2002). Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *97*, 297–305.

Xu, J., Zheng, S.L., Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Wiklund, F., Sun, J., Kader, A.K., Li, G., Purcell, L.D., Kim, S.-T., et al. (2010). Inherited genetic variant predisposes to aggressive but not indolent prostate cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 2136–2140.

Yamaguchi, T.P., Bradley, A., McMahon, A.P., and Jones, S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. Development *126*, 1211–1223.

Yan, G., Fukabori, Y., Nikolaropoulos, S., Wang, F., and McKeehan, W.L. (1992). Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *6*, 2123–2128.

Yang, G., Ayala, G., De Marzo, A., Tian, W., Frolov, A., Wheeler, T.M., Thompson, T.C., and Harper, J.W. (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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *8*, 3419–3426.

Yang, R.M., Naitoh, J., Murphy, M., Wang, H.J., Phillipson, J., deKernion, J.B., Loda, M., and Reiter, R.E. (1998). Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. J. Urol. *159*, 941–945.

Yao, J., Fu, C., Ding, X., Guo, Z., Zenreski, A., Chen, Y., Ahmed, K., Liao, J., Dou, Z., and Yao, X. (2004). Nek2A kinase regulates the localization of numatrin to centrosome in mitosis. FEBS Lett. *575*, 112–118.

Yeh, S., and Chang, C. (1996). Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 5517–5521.

Yip, C.K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D.M., and Kang, S.A. (2010). Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. Mol. Cell *38*, 768–774.

Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., and Reeves, S.A. (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. Curr. Biol. CB *10*, 47–50.

Yoo, J.-Y., Lim, B.J., Choi, H.-K., Hong, S.W., Jang, H.S., Kim, C., Chun, K.-H., Choi, K.-C., and Yoon, H.-G. (2013). CK2-NCoR signaling cascade promotes prostate tumorigenesis. Oncotarget *4*, 972–983.

Yusoff, P., Lao, D.-H., Ong, S.H., Wong, E.S.M., Lim, J., Lo, T.L., Leong, H.F., Fong, C.W., and Guy, G.R. (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. J. Biol. Chem. *277*, 3195–3201.

Zaarur, N., Gabai, V.L., Porco, J.A., Calderwood, S., and Sherman, M.Y. (2006). Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. Cancer Res. *66*, 1783–1791.

Zeng, Y., Opeskin, K., Horvath, L.G., Sutherland, R.L., and Williams, E.D. (2005). Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. The Prostate *65*, 222–230.

Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K.G. (1995). What is the restriction point? Curr. Opin. Cell Biol. *7*, 835–842.

Zhang, H., Shi, X., Paddon, H., Hampong, M., Dai, W., and Pelech, S. (2004). B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. J. Biol. Chem. *279*, 35726–35734.

Zhang, J., Thomas, T.Z., Kasper, S., and Matusik, R.J. (2000). A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. Endocrinology *141*, 4698–4710.

Zhao, X.Y., Malloy, P.J., Krishnan, A.V., Swami, S., Navone, N.M., Peehl, D.M., and Feldman, D. (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. Nat. Med. *6*, 703–706.

Zhou, G., Hashimoto, Y., Kwak, I., Tsai, S.Y., and Tsai, M.-J. (2003). Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. Mol. Cell. Biol. *23*, 7742–7755.

Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Corney, D.C., Wang, W., Goodrich, D.W., Roy-Burman, P., and Nikitin, A.Y. (2006). Synergy of p53 and Rb Deficiency in a Conditional Mouse Model for Metastatic Prostate Cancer. Cancer Res. *66*, 7889–7898.

Zhou, Z.X., Sar, M., Simental, J.A., Lane, M.V., and Wilson, E.M. (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. J. Biol. Chem. *269*, 13115–13123.

Zhou, Z.X., Kemppainen, J.A., and Wilson, E.M. (1995). Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *9*, 605–615.

Zilliacus, J., Wright, A.P., Carlstedt-Duke, J., Nilsson, L., and Gustafsson, J.A. (1995). Modulation of DNA-binding specificity within the nuclear receptor family by substitutions at a single amino acid position. Proteins *21*, 57–67.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. Cell *144*, 757–768.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J. Biol. Chem. *274*, 11549–11556.