



Université  
de Liège

Université de Liège Faculté de Médecine  
Biochimie, Laboratoire d'Endocrinologie

# Implication de la clusterine dans la survie des cellules prostatiques lors de l'apoptose

Thèse présentée en vue de l'obtention de grade de  
docteur en Sciences (Biochimie, Biologie moléculaire et  
cellulaire, bioinformatique et modélisation)

Hayet Ammar

2013-2014

## Remerciements

*Au terme de cette longue aventure, c'est une joie pour moi de remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Tout d'abord je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Georges Hennen de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie également le professeur Jean-Olivier Defraigne de m'avoir permis de continuer ma thèse au sein de son laboratoire.*

*Mes plus vifs remerciements vont au Docteur Jean Closset sans qui je n'aurais pas pu réaliser mon rêve d'intégrer le monde scientifique. Avec qui j'ai développé le sens critique et la curiosité scientifique. Je tiens à le remercier pour sa patience (tout au long de ces années) et sa disponibilité même en étant pensionné. Je remercie également son épouse pour sa compréhension. « Toutes mes excuses de vous avoir autant dérangés ».*

*Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Ahmed Igout pour son soutien et son écoute tout au long de ces années. J'ai eu la chance de bénéficier de son expérience scientifique et de ses conseils judicieux. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et du jury de défense de celle-ci.*

*Je présente toute ma reconnaissance au Professeur Yves Combarous de l'Université de Tours, au Professeur Martine Raes de l'Université Catholique de Namur, au Professeur Bernard Joris et au Professeur David Waltregny pour avoir accepté d'examiner ma dissertation doctorale et de faire partie de mon jury de thèse.*

*Toute ma gratitude va également au Professeur Jacques Piette, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Mes remerciements vont également aux membres de mon comité de thèse le Professeur Marie Paule Merville, le Docteur Ahmed Igout et le Docteur Jean Closset pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de défense de celle-ci.*

*Je souhaite remercier les membres d'équipe du laboratoire d'endocrinologie (au début de ma thèse) Jaques Fréson, Anne Demille, Viet Ha Nguen, Anne Cornet, Laurence Melen, les secrétaires Anette et Annie, surtout le docteur Michael McNamara pour son écoute et son encouragement ainsi que Catherine D'Andrea pour son aide technique et son soutien moral dans les moments difficiles, et son accompagnement lors des trois déménagements du laboratoire après le départ du professeur Georges Hennen.*

*Mes remerciements vont aux membres du laboratoire de cardiologie du professeur Jean Olivier Defraigne, Annie, Jean-Paul et Marie Eve qui ont participé à mon intégration dans leur laboratoire. Je ne dois pas oublier de remercier Marie (la secrétaire de Professeur Lahaye) pour les photocopies.*

*Je tiens à remercier le Docteur Nicolas Smargiasso et le Docteur Gabriel Mazzucchelli dans le laboratoire de spectrométrie de masse du professeur DePaw pour leur collaboration.*

*Je voudrais également témoigner ma reconnaissance aux membres du Laboratoire d'Oncologie moléculaire du Docteur Rosita Winkler pour leur aide technique et leur soutien. Merci à Laurence, Dominique, tout particulièrement à Guillaume mon sauveur pour le scan et tous les qu'oiques en informatique et à Jean Christophe pour sa lecture du manuscrit (en 2010).*

*Je tiens à remercier le Docteur Mustapha Zeddou et le Docteur Roland Creimers du laboratoire de Pathologie et des tissus conjonctifs, pour leur aide pour l'analyse au FACS.*

*Je souhaite remercier Le Professeur Akeila Belahcène, le Professeur Frédéric Van Den Brule, les deux techniciennes Pascale Welle-Henaux et Naima Maloujahmoum et le Docteur Stéphane Califice du Laboratoire des recherches sur les Métastases pour leur aide technique (pour le FACS et la culture cellulaire) pendant les deux premières années de mon travail. Je tiens également à remercier Pierre Mineur du laboratoire de biologie et des tissus conjonctifs pour le microscope à fluorescence ainsi que le Professeur Patrick Motte du laboratoire de la Génomique fonctionnelle et l'imagerie moléculaire végétale, pour la microscopie confocale.*

*Je voudrais également témoigner ma reconnaissance à tous mes amis qui m'ont soutenue pendant les moments les plus difficiles de la vie et qui me soutiennent toujours (je ne cite pas de noms car la liste est longue), « Un grand merci à toutes et à tous, je vous aime ». Je tiens à remercier tout particulièrement Zakia Belaid, Ben Issa Elmoualij et Nor Eddine Sounni qui m'ont toujours soutenue et encouragée à clôturer cette thèse.*

*Je ne peux pas m'empêcher de remercier mes ex-collègues chez Dyax, Ricarda Finnern, Han, Henk et Rob pour leur encouragement. Je remercie également Madame Fabienne Crahay au centre Corail (Forem), pour son aide précieuse pour la mise en page du présent manuscrit.*

*Je termine en remerciant toute ma famille en Tunisie, tout particulièrement mes parents, qui m'ont toujours encouragée à poursuivre mes études et à aller plus loin.*

*Enfin, ma profonde gratitude va à ma petite famille ici en Belgique. A toi Hamadi, qui a été là pour me soutenir, qui a partagé avec moi les moments de joies et de déceptions, tout au long de cette épreuve. A ma grande Selma qui m'a toujours soutenue même en étant loin de moi. A mon grand Maher qui a toujours mis de l'ambiance avec son humour et son énergie débordante. A mon petit trésor Nora qui me comble d'amour et me donne de l'énergie. Si j'ai tenu aussi longtemps pour achever cette thèse c'est grâce à vous et c'est pour vous. Je vous dédie ce travail.*

## TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS.....	5
I. Introduction .....	9
Chapitre 1. La Prostate.....	11
1. La prostate normale.....	11
1.1. Anatomie .....	11
1.2. Histologie prostatique .....	12
1.2.1. Le compartiment épithélial .....	12
1.2.2. Le compartiment stromal.....	13
1.3. La fonction prostatique .....	14
1.4. Le contrôle du développement et de la fonction prostatique .....	14
1.4.1. Les androgènes.....	15
1.4.2. Interactions épithélium-stroma .....	22
1.4.3. Les œstrogènes.....	23
2. Le cancer de la prostate .....	25
2.1. Modèle de la tumorigenèse de la prostate .....	25
2.2. Mécanismes de résistance à la castration.....	27
2.2.1. Mécanismes dépendant du RA.....	28
2.2.2. Mécanismes indépendant du RA.....	30
Chapitre 2. L'Apoptose.....	33
1. Introduction .....	33
2. L'apoptose et la nécrose .....	33
3. Séquence signalitique de l'apoptose .....	34
4. Les voies d'induction de l'apoptose.....	35
4.1. La voie mitochondriale ou la voie intrinsèque .....	37
4.2. La voie extrinsèque ou voie induite par les récepteurs de mort.....	38
4.2.1. TNF et la voie de signalisation TNF.....	39
5. La famille des caspases .....	40
5.1. Activation des caspases .....	41
6. Régulation de l'apoptose .....	42
7. L'apoptose prostatique .....	45
Chapitre 3. La Clusterine .....	49
1. Introduction .....	49
2. Fonctions de la clusterine .....	50
2.1. La clusterine est une chaperonne extracellulaire .....	50

2.2.	La reproduction .....	52
2.3.	L'inhibition du complexe d'attaque du système du complément.....	52
2.4.	Le transport des lipides .....	53
2.5.	La clusterine entre apoptose et survie .....	53
3.	Le gène de la clusterine : organisation, promoteur et régulation .....	55
3.1.	Promoteur et régulation.....	57
4.	Clusterine : La protéine ou formes protéiques.....	59
4.1.	La forme sécrétée (sCLU).....	60
4.2.	Formes intracellulaires : forme nucléaire et forme cytoplasmique.....	61
5.	La clusterine dans la prostate .....	63
5.1.	La clusterine dans l'apoptose prostatique .....	63
5.2.	La clusterine et le cancer prostatique .....	65
5.2.1.	Expression de la clusterine dans le cancer prostatique .....	65
5.2.2.	La clusterine dans la résistance du cancer prostatique .....	67
5.2.3.	La clusterine est une cible thérapeutique : Le custirsén OGX-011 un anti-sens contre la clusterine .....	67
II.	Objectif et stratégies du travail .....	69
III.	Résultats.....	71
1.	Partie 1 : Etablissement de lignées stables exprimant de manière inducible la sClu .....	72
1.1.	Etablissement de lignées stables exprimant de manière inducible la clusterine .....	72
1.1.1.	Etablissement de la lignée MLL-Tet On.....	73
1.1.2.	Développement des doubles lignées stables pTet-on pTRE .....	75
2.	Partie 2 : Caractérisation de la lignée stable et inducible pour l'expression de la sCLU.....	76
2.1.	Etude de la régulation de sClu en fonction de la concentration de la doxycycline.....	77
2.2.	Localisation de la sClu dans les cellules MLLTet-sClu par microscopie confocale .....	77
2.3.	Etude de la prolifération des clones MLLTet-sClu .....	78
2.4.	Purification de la clusterine.....	78
3.	Partie 3: Etude des effets de survie de la surexpression de la sClu dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes et ciblage de son mécanisme d'action .....	79
4.	Partie 4: Analyse protéomique de la lignée MLLTet-sClu et identification des nouveaux partenaires de sClu .....	81
IV.	Discussion et perspectives .....	85
1.	La Clusterine active la survie via un mécanisme extracellulaire.....	86
2.	Implication de la mégaline dans le mode d'action de la sCLU.....	87
3.	La sCLU active la voie de survie Akt .....	88
4.	La sCLU n'active pas la voie de survie NF kappa B.....	90
5.	La sCLU active la survie via d'autres voies de signalisation .....	91

6.	Identifications des nouveaux facteurs et des nouvelles voies possibles.....	91
7.	La sCLU stimule l'expression de la cytokine OPN .....	94
8.	Conclusion générale.....	97
V.	Matériel et méthodes .....	99
1.	Animaux .....	99
2.	Les lignées cellulaires.....	99
2.1.1.	Cultures cellulaires .....	99
2.1.2.	Test de viabilité .....	99
2.1.3.	Transfections .....	99
2.1.4.	La cytométrie de flux.....	100
2.1.5.	Etablissement d'une double lignée stable à partir des cellules MATLyLu .....	100
3.	La protéomique.....	104
3.1.	Principe .....	104
3.2.	Séparation des protéines par 2D-PAGE.....	104
3.3.	HPLC (high performance liquid chromatography) .....	105
3.4.	Détection des peptides.....	105
3.4.1.	Source électrospray ou ESI (electrospray ionisation).....	105
3.4.2.	Analyseur à trappe à ions ou Ion Trap.....	106
3.4.3.	Détecteur.....	107
3.4.4.	Séquençage des peptides par spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS .....	107
3.4.5.	Identification dans une base de données .....	107
VI.	Bibliographie .....	109
VII.	Annexes.....	131







# ABRÉVIATIONS

ActD	Actinomycine D
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AF-1	<i>Activating Function-1</i>
AF-2	<i>Activating Function-2</i>
AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
AIP	Atrophie Inflammatoire Proliférative
Akt	<i>Protein Kinase B</i>
AMPC	Adénosine Monophosphate cyclique
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease-Activating Factor-1</i>
ARE	<i>Androgen Response Element</i>
ARF1	<i>ADP Ribosylation Factor 1</i>
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ASO	Oligonucléotide Antisense
ATP	Adenosine Triphosphate
BAD	<i>BCL-2 Antagonist of cell Death</i>
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma-2</i>
Bcl-X <sub>L</sub>	<i>B-Cell Lymphoma-Extra Large</i>
BH3	<i>Bcl-2 Homology 3</i>
BPH	<i>Begnin Prostate Hyperplasia</i>
B-Myb	<i>Myb related protein B</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
Cdx1/2	<i>Caudal-Type Homeobox Protein 1</i>
CLE	<i>Clusterin Element</i>
CLI	<i>Complement Lysis Inhibitor</i>
CPAI	Cancer Prostatique Androgéno-Indépendant
CRE	<i>cAMP Response Element</i>
CRPC	<i>Castration Resistant Prostate Cancer</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DBS	<i>Dinucleotide-Binding Site</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
Dox	<i>Doxycycline</i>
DR	<i>Death Receptor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>



Egr-1	<i>Early Growth Response Protein 1</i>
ERG	<i>ETS –Related Gene; ETS (Erythroblast Transformation Specific)</i>
ERK1/2	<i>Early Regulated Kinases ½</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FADD	<i>Fas Associated Death Domain Protein</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FLICE	<i>FADD-Like IL-1β-Converting Enzyme</i>
FLIP	<i>Flice-Like Inhibitory Protein</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GnRH	<i>Gonadotropins Releasing Hormone</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GSTP1	<i>Glutathione S-Transférase Pi 1</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HRE	<i>Hormone Response Element/Elément de réponse aux hormones</i>
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICE	<i>Interleukin-1β Processing Enzyme</i>
IGF-1	<i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>
IKK	<i>IκB Kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinase</i>
KDa	<i>Kilo Dalton</i>
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
KLK 2	<i>Kallikrein-Related Peptidase 2</i>
KLK 3	<i>Kallikrein-Related Peptidase 3</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	<i>Luteinising Hormone/Hormone Lutéinisante</i>
LH-RH	<i>Luteinising Hormone Releasing Hormone</i>
LNCaP	<i>Lymph Node Cancer Prostate</i>
LRP2	<i>Lipoprotein Receptor 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2 Homolog</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis Oncogene</i>
nCLU	<i>Nuclear Clusterin</i>
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NFE2	<i>Nuclear Factor Erythroid-Derived 2</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>

NKX3.1	<i>NK3 Homeobox 1</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NOTCH-1	<i>Notch Homolog 1</i>
NTD	<i>N-Terminal Domain</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5 bi-Phosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate</i>
Pim-1	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
PIN/NIP	<i>Prostatic Intraepithelial Neoplasia/Néoplasie Intraépithéliale Prostatique</i>
PK	<i>Protein Kinase</i>
PMEM	<i>Perméabilité de la membrane externe mitochondriale</i>
PS	<i>Phosphatidyl Sérine</i>
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
PSCA	<i>Prostate Stem Cell Antigen</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
RA/AR	<i>Récepteurs aux androgènes/Androgen Receptor</i>
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
RE/ER	<i>Récepteurs aux oestrogènes/Estrogen Receptor</i>
RG	<i>Récepteurs aux glucocorticoïdes</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RIPK-1	<i>Receptor Interacting Protein Kinase-1</i>
RNASEL	<i>Ribonuclease L (2'-5'-Oligoadenylate-Dependent Rnase L)</i>
sCLU (ou sClu)	<i>Secreted Clusterin</i>
SHBG	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
Smac/Diablo	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pi</i>
Smad	<i>SMA (Small Body Size) and MAD (Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3)</i>
SP1	<i>Specificity Protein 1</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIM	<i>TRAF-Interacting Motifs</i>
TMPRSS2-ERG	<i>Transmembrane Protease Serine 2-ETS Related Gene</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
TRADD	<i>TNF-R1-Associated Death Domain Protein</i>
TRAF	<i>TNFR-Activated Factor</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TRPM-2	<i>Testosterone-Repressed Prostate Messenge-2</i>
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
XIAP	<i>X-Linked Inhibitor Apoptosis Protein</i>





# I. INTRODUCTION

La clusterine est une protéine multifonctionnelle impliquée dans différents processus physiologiques et pathologiques (Rizzi and Bettuzzi, 2008; Rosenberg and Silkensen, 1995; Shannan et al., 2006; Zlokovic, 1996).

Elle a été isolée initialement du liquide séminale de bélier (Blaschuk et al., 1983; Fritz et al., 1983). Dans la prostate, la CLU a été clonée dès 1989 à partir du modèle de la prostate de rat en régression suite à l'apoptose massive induite dans cette glande par la privation d'androgènes (Montpetit et al., 1986). La prostate est un organe androgéno-dépendant qui perd plus de 80% de son poids dans les 7 jours qui suivent la castration (Kyprianou and Isaacs, 1988a). Dans ce modèle, la CLU a été considérée comme un inducteur d'apoptose, cependant la surexpression de cette protéine dans les cellules épithéliales prostatiques LNCaP, confère à ces dernières la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée (Sensibar et al., 1995).

Dans le cancer prostatique la clusterine a été associée à la progression vers l'androgéno-indépendance (Miyake et al., 2000c). Elle a également été considérée comme un facteur de survie impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses prostatiques et l'inhibition de son expression favorise l'entrée en apoptose de ces cellules (Miyake et al., 2000a; Miyake et al., 2005a; Miyake et al., 2000b; Trougakos et al., 2004).

Pendant les années qui nous séparent du clonage de la clusterine, le domaine de recherche la concernant s'est fortement complexifié sur le plan moléculaire. Plusieurs résultats expérimentaux ont montré que la clusterine est produite sous plusieurs formes ayant chacune leurs activités biologiques propres et des modes d'action particuliers au niveau cellulaire (Bettuzzi and Rizzi, 2009; Caccamo et al., 2005; Caccamo et al., 2004; Caccamo et al., 2003; Kim and Choi, 2011; Kim et al., 2012; Moretti et al., 2007b; Rizzi et al., 2009; Trougakos et al., 2009a; Yang et al., 2000; Zhang et al., 2006).

Notre travail expérimental s'inscrit dans ce cadre d'étude et se focalise sur la forme sécrétée de la clusterine. Pour une compréhension du contexte de notre travail, il nous paraissait utile de reprendre dans cette introduction quelques éléments de l'anatomie, de l'histologie et de la physiologie prostatique, d'évoquer les mécanismes impliqués dans la progression du cancer de la prostate (chapitre 1), de résumer les principales voies d'apoptose (Chapitre 2) et enfin de synthétiser l'ensemble des connaissances actuelles concernant la clusterine, ses différentes formes et leurs principales propriétés (Chapitre 3).





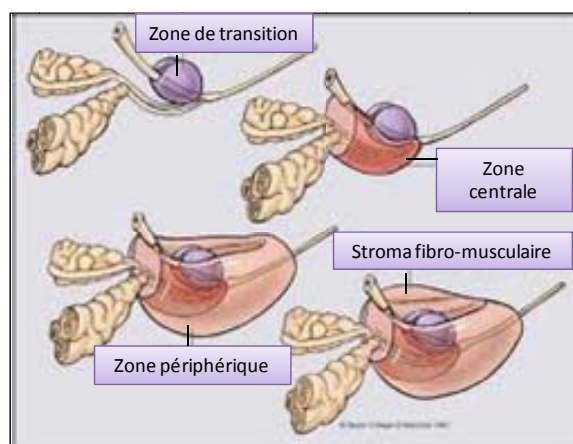
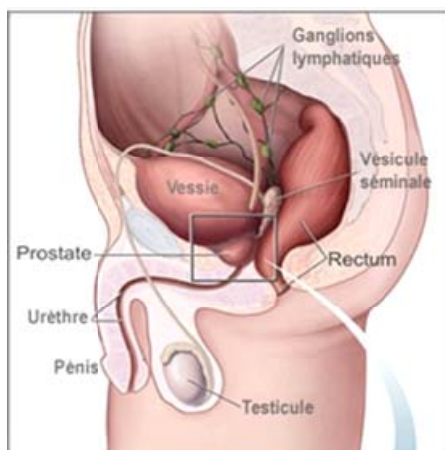
# CHAPITRE 1. LA PROSTATE

## 1. LA PROSTATE NORMALE

### 1.1. ANATOMIE

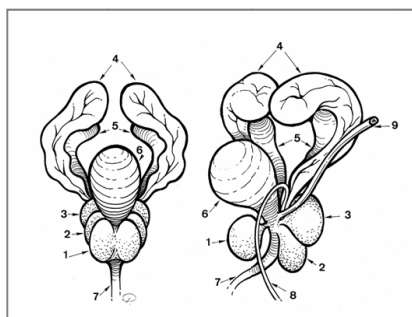
La prostate est une glande accessoire de l'appareil reproducteur mâle des mammifères. Elle est située dans le pelvis et elle entoure l'urètre juste en dessous de la vessie (Figure I.1).

Chez l'homme, la prostate représente une masse glandulaire compacte. Bien qu'elle ne possède pas de lobe anatomiquement distinct, l'organisation anatomique et histologique décrite par McNeal définit trois zones glandulaires : la zone centrale, la zone de transition, la zone périphérique et une quatrième zone non glandulaire qui correspond au stroma fibro-musculaire antérieur (McNeal et al., 1988).



**Figure I.1. Appareil urogénital de l'homme adulte.** La prostate est située sous la vessie autour de l'urètre et en avant du rectum (à gauche). A droite, l'image montre l'organisation zonale de la prostate de l'homme selon Mc Neal. La prostate est subdivisée en quatre zones tissulaires distinctes agencées autour de l'urètre. (D'après <http://cancertopics/wyntk/prostate>).

Chez le rat, la prostate est constituée de trois paires de lobes: les lobes ventraux, dorsaux et latéraux (figure I.2). C'est au niveau de la prostate que se rejoignent l'urètre, le canal déférent et les vésicules séminales (Jesik et al., 1982).



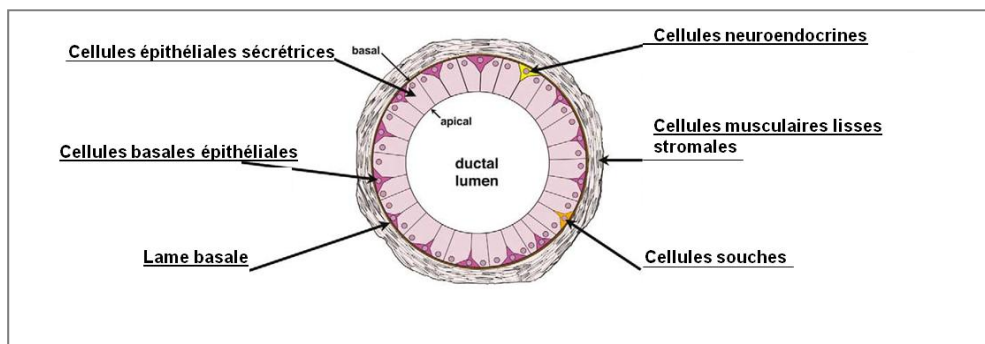
**Figure I.2. Vue de face et de 3/4 profil gauche de l'appareil vésico-séminal du rat** (d'après P. Bonnet, Thèse de doctorat en sciences biomédicales expérimentales, Université de Liège, 1994). 1 : Lobe antérieur ou prostate ventrale; 2 : Lobe latéral; 3 : Lobe postérieur; 4 : Vésicules séminales; 5 : Glandes de coagulation; 6 : Vessie; 7 : Urètre; 8 : Canal déférent gauche; 9 : Urètre gauche.

## 1.2. HISTOLOGIE PROSTATIQUE

Du point de vue histologique, la prostate est constituée de deux types tissulaires : Un tissu glandulaire (le compartiment épithélial) et un tissu fibromusculaire (le compartiment stromal).

### 1.2.1. LE COMPARTIMENT ÉPITHÉLIAL

Chez l'homme la prostate est formée d'une cinquantaine de glandes tubulo-alvéolaires ou acini entourés de stroma musculaire lisse (figure I.3) (Marker et al., 2003; McNeal, 1988). Tandis que l'architecture glandulaire prostatique du rat se présente sous la forme d'un système de canaux sans véritable formation acinaire (Sugimura et al., 1986). Ces canaux ou acini sont tapissés par un épithélium glandulaire pseudostratifié. On distingue deux types cellulaires majeurs : Les cellules sécrétoires et les cellules basales.



**Figure I.3. Représentation schématique de tous les types cellulaires composant un acinus prostatique.** Les cellules épithéliales en contact avec la lumière de l'acinus au niveau apicale et au niveau basale, sont entourées de la membrane basale et le stroma fibromusculaire (d'après (Marker et al., 2003)).

**Les cellules luminales** (*cellules épithéliales sécrétrices*) sont organisées en monocouche continue et sont responsables de l'activité exocrine de la prostate. Elles sécrètent le PSA (*Prostate Specific Antigen*) et le KLK2 (*kallikrein-related peptidase 2*) dont la synthèse est sous le contrôle du récepteur aux androgènes (RA). Ces cellules sont différenciées et ne prolifèrent pas (English et al., 1987). Elles représentent le type cellulaire majeur de la prostate normale et de l'épithélium hyperplasique. Elles expriment des marqueurs spécifiques comme la cytokératine 8 et 18 ainsi que le RA (*Récepteur aux androgènes*) et nécessitent une exposition continue des androgènes pour leur survie (Buttayan et al., 1999; Collins and Maitland, 2006).

**Les cellules basales**, non sécrétrices, étalées sur la membrane basale des cellules épithéliales luminales formant ainsi une couche continue entre les cellules sécrétrices et la lame basale. Ces cellules n'expriment pas ou faiblement le RA (Bonkhoff, 1996) et leur survie est indépendante des androgènes. Elles expriment la p63 (homologue du gène supresseur tumoral p53), les cytokératines 5 et 14 et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Bonkhoff and Remberger, 1996).



Parmi ces cellules on note la présence des cellules épithéliales basales particulières, les *cellules souches épithéliales* capables de régénérer l'épithélium sécrétoire suite à l'apport d'androgènes chez les animaux castrés (English et al., 1987).

**Les cellules souches** : Elles ont été mises en évidence dans la prostate pour la première fois par Isaacs et Coffey, en raison de la capacité qu'à cet organe d'entreprendre plusieurs cycles de regression après castration et de régénérescence complète par supplémentation en androgènes chez le rat (Isaacs and Coffey, 1989). Leur présence a été exclusivement limitée au compartiment basal du fait que celui-ci reste intacte après castration, tandis que 90% des cellules épithéliales meurent par apoptose (English et al., 1987). De plus, les cellules du compartiment basal ont un index prolifératif plus élevé que celui des cellules luminales (Bonkhoff and Remberger, 1996). Ces résultats ont été confirmés récemment par Leong et ses collaborateurs qui ont démontrés que ces cellules souches expriment un marqueur de différenciation des cellules basales et sont capables de donner naissance à des structures prostatiques fonctionnelles lorsqu'elles sont transplantées *in vivo* chez la souris après castration (Leong et al., 2008). Cependant des cellules souches ont aussi été retrouvées dans le compartiment luminal (Liu et al., 2011; Wang et al., 2009).

D'autres types cellulaires rares sont dispersés dans l'épithélium glandulaire: les **cellules neuroendocrines** dont la fonction n'est actuellement pas encore clairement définie. Ces cellules sont différenciées, négatives au RA et insensibles aux androgènes. Elles sont le siège de différentes synthèses de facteurs endocrines tels que la sérotonine, la somatostatine, la chromogranine A et la TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) (Berry et al., 2008).

Cet ensemble cellulaire est entouré d'une lame basale qui marque la délimitation avec le stroma.

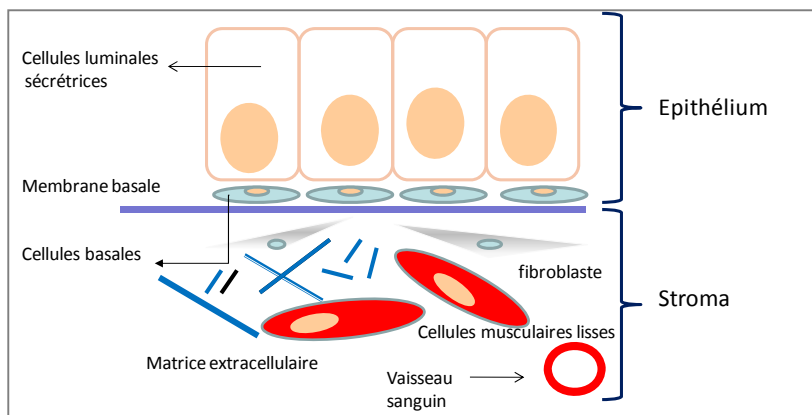
---

### 1.2.2. LE COMPARTIMENT STROMAL

Le stroma est un tissu conjonctif qui entoure les canaux glandulaires chez le rat ou les acini glandulaires chez l'homme. Il est composé des myofibroblastes, des fibroblastes, de fibres de collagène et des cellules musculaires lisses disposées sans ordre apparent, une matrice extracellulaire, de vaisseaux sanguins ainsi que de terminaisons nerveuses et lymphatiques (figure I.4) (Aumuller, 1989).

Les fibroblastes et les cellules musculaires lisses expriment le RA, le RE $\alpha$  et la 5 $\alpha$ -réductase enzyme nécessaire pour la conversion de la testostérone en 5 $\alpha$ -DHT (5 $\alpha$ -Dihydrotestostérone).





**Figure I.4. Représentation schématique de l'épithélium et du stroma.** Le stroma conjonctif est composé de fibroblastes, d'une matrice extracellulaire riche en fibre de collagène et fibres élastiques, de cellules musculaires lisses, de nerfs et de vaisseaux sanguins et lymphatiques.

En plus de son rôle de maintien des structures glandulaires, le stroma assure l'expulsion vers l'urètre du contenu des glandes prostatiques suite à la contraction des cellules musculaires lisses. Les interactions stroma/épithélium jouent un rôle important dans le contrôle du développement et la fonction prostatique, cette régulation sera décrite plus en détail dans un paragraphe ultérieur (voir chapitre 1 La Prostate, paragraphe 1.4.2). Dans le cancer prostatique le stroma est caractérisé par une augmentation de myofibroblastes et de fibroblastes, avec une perte significative des cellules musculaires lisses (Ayala et al., 2003).

### 1.3. LA FONCTION PROSTATIQUE

La prostate est une glande exocrine dont les produits de sécrétion prostatique sont déversés dans l'urètre peu avant l'éjaculation et rejoignent ainsi le liquide séminal.

Le liquide prostatique contient des ions comme le zinc et les ions citrates. Le zinc joue un rôle anti-bactérien et il module aussi l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase. Les ions citrate interviennent dans le maintien du pH et de l'équilibre osmotique. Le liquide prostatique contient également des protéines, principalement l'antigène prostatique spécifique (PSA), qui est une sérine protéase et les phosphatases acides qui interviennent dans la liquéfaction du sperme. Le liquide prostatique n'est pas indispensable à la fécondité, mais il augmente la fertilité. Ce liquide est important pour la vitalité, la mobilité des spermatozoïdes et facilite leur pénétration à travers le col utérin (Purvis et al., 1988).

### 1.4. LE CONTRÔLE DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA FONCTION PROSTATIQUE

Les androgènes jouent un rôle principal dans le contrôle de l'ontogenèse, la croissance et le fonctionnement de la prostate. Toutefois, plusieurs études ont montré que d'autres facteurs comme les hormones hypophysaires, des stéroïdes non-androgéniques et des facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation de la croissance et le maintien de la glande.

---

### 1.4.1. LES ANDROGÈNES

La testostérone est le principal androgène circulant. Chez le rat, elle est produite exclusivement par les cellules de Leydig du testicule. Chez l'homme par contre, près de 5 à 30% de la testostérone est produite par les glandes surrénales.

En plus de leur action sur la prostate, les androgènes sont aussi responsables du développement de l'appareil reproducteur mâle et stimulent le développement des caractères sexuels secondaires. Les androgènes jouent également un rôle important dans le métabolisme de différents tissus tels que les os, les muscles et le tissu adipeux ainsi que le comportement (Li and Al-Azzawi, 2009).

#### 1.4.1.1 BIOSYNTHESE DES ANDROGENES

---

La biosynthèse de la testostérone se déroule en partie dans la mitochondrie et le cytoplasme des cellules de Leydig à partir d'un précurseur commun à tous les stéroïdes, le cholestérol (Saez, 1994). Ce dernier est converti en pregnénolone par l'action d'une desmolase située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. La pregnénolone est ensuite transformée par différentes enzymes à cytochrome P450 en testostérone. Ces réactions, réalisées notamment par des desmolases et des hydroxylases, se déroulent dans le réticulum endoplasmique (Tostain et al., 2004).

Chez l'homme, les glandes surrénales produisent l'androstènedione et la déhydroépiandrosterone (DHEA) qui seront convertis par la suite en testostérone dans les tissus périphériques. Chez le rat par contre, il n'existe pas de production d'androgènes d'origine surrénalienne (Labrie et al., 2005).

#### 1.4.1.2 CONTROLE DE LA SYNTHÈSE DES ANDROGENES

---

La synthèse de testostérone est sous le contrôle majeur de la LH. Elle agit via son récepteur situé à la surface des cellules de Leydig et induit la transcription des gènes codant pour de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse de testostérone. La LH agit aussi sur la prolifération des cellules de Leydig. Quant à la prolactine, elle exerce une action indirecte sur la prostate via une stimulation de la stéroïdogénèse testiculaire. Elle exerce aussi une action directe sur la prostate via des récepteurs spécifiques (Reiter et al., 1992; Reiter et al., 1999). La FSH quant à elle, exerce une action plus limitée indirecte sur la stéroïdogénèse via la cellule de sertoli et en induisant la synthèse du récepteur à LH par les cellules de Leydig principalement à la puberté (Scher et al., 2004; Tostain et al., 2004).

La stéroïdogénèse peut être régulée par rétrocontrôle, la LH par exemple peut exercer un effet négatif sur la synthèse de son récepteur et sur sa propre production par l'hypophyse. La FSH



pour sa part limite la synthèse de la *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) hypothalamique et réduit ainsi sa propre production hypophysaire. Les androgènes aussi peuvent exercer un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotrophines au niveau hypothalamique et hypophysaire. En effet, l'ablation des androgènes par castration chirurgicale supprime le rétrocontrôle négatif et entraîne une augmentation de FSH et de LH (Denmeade and Isaacs, 2002; Scher et al., 2004).

#### 1.4.1.3 METABOLISME ET ROLES DES ANDROGENES DANS LA PROSTATE

Au niveau de la prostate la testostérone diffuse librement à travers la membrane cytoplasmique. 10% se lie directement au récepteur androgénique et 90% sont réduits en métabolite plus actif la DHT, par la 5  $\alpha$ -réductase de type 2 qui prédomine dans le compartiment stromal de la prostate (figure I.5). La DHT a cinq fois plus d'affinité pour le RA que la testostérone et joue un rôle d'amplificateur.

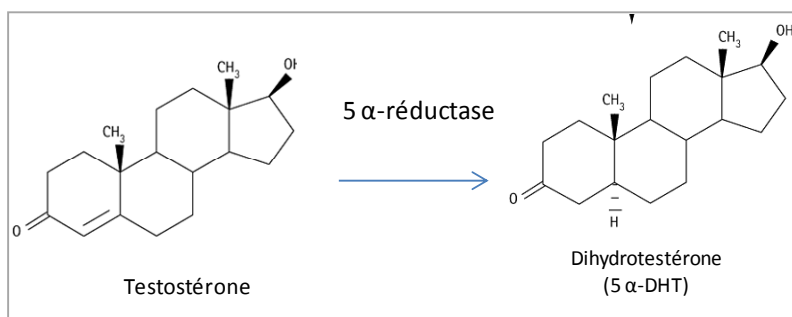


Figure I.5. Réaction de transformation de la testostérone. La en 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (5  $\alpha$ -DHT) par la 5  $\alpha$ -réductase (Tostain et al., 2004).

La DHT joue un rôle important dans le développement de la prostate, en effet les patients atteints d'une déficience en 5 $\alpha$ -réductase présentent une prostate rudimentaire et un très faible niveau plasmatique de PSA (Imperato-McGinley et al., 1992). L'analyse histologique de biopsies de la prostate chez ces patients montre la présence de tissu conjonctif et de muscle lisse mais pas de tissu épithélial. L'administration de DHT à ces patients entraîne un élargissement de la prostate et une élévation du taux de PSA (Imperato-McGinley and Zhu, 2002).

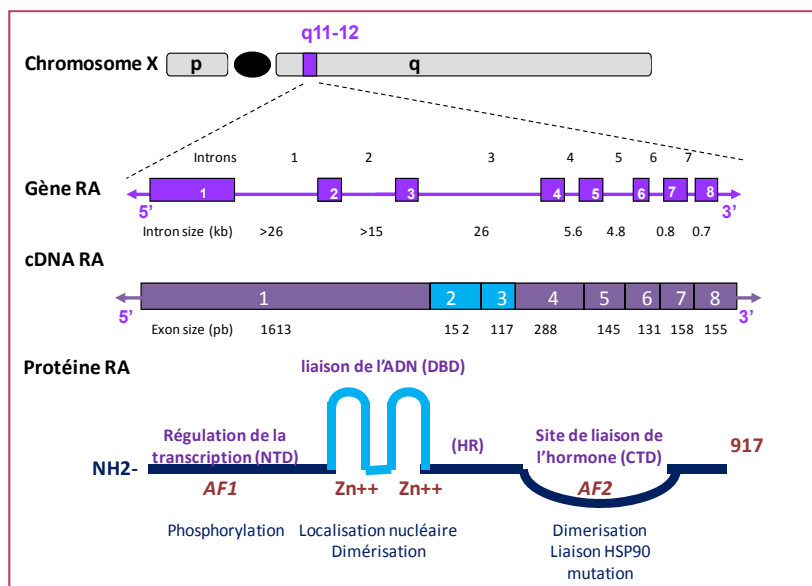
L'ablation des testicules chez le fœtus durant la période d'ambiguïté sexuelle inhibe le développement des glandes sexuelles mâles internes dont la prostate. Les mâles déficients en RA présentent aussi les mêmes effets malgré que leurs testicules continuent à produire des quantités normales de testostérone (Jost et al., 1973).

#### 1.4.1.4 MODE D'ACTION DES ANDROGÈNES

Les androgènes agissent via deux voies. La voie classique la plus connue, passe par le RA et est appelée 'voie génomique'. La voie non classique appelée 'voie non génomique' fait entre autre intervenir un récepteur membranaire et des voies de signalisation intracellulaires complexes et interconnectées.

## La voie classique, dite génomique

Le RA appartient à la famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes. Ces récepteurs ont été décrits comme des facteurs transcriptionnels dépendants du ligand. Le gène est localisé sur le bras long du chromosome X (Xq11-12) (Lubahn et al., 1988). Il contient 8 exons et code pour une protéine de 110-114 kDa. Des analyses structure/fonction de ces récepteurs nucléaires ont montré une grande homologie avec une organisation structurale commune comprenant quatre domaines différents (Laudet, 1997).



**Figure 1.6. Récepteur aux androgènes :** Structure du gène RA, de l'ADNc et de la protéine correspondants. Le gène du RA est situé sur le bras long du chromosome X (au locus Xq11-12) et contient 8 exons représentés par les rectangles, séparés par les introns. L'ADNc comprend une région codante de 2760 pb, traduite en une protéine de ~ 917 acides aminés. L'exon 1, code pour le domaine N-terminal de la régulation de la transcription (NTD), comprenant le domaine de trans-activation AF-1. Les exons 2 et 3 codent pour le domaine de liaison à l'ADN, contenant deux structures en doigt de Zinc. La région 5' de l'exon 4 code pour la

région charnière (HR) (signal de localisation nucléaire). La région 3' de l'exon 4 et les exons 5 à 8 codent pour le domaine de liaison du ligand (CTD) comprenant le domaine de trans-activation AF-2. Figure adaptée d'après Quigley et al., 1995.

Comme décrit dans la figure 1.6 adaptée d'après (Quigley et al., 1995), de l'extrémité amino terminale à l'extrémité carboxy terminale le RA comprend :

**-Le domaine N-terminal (NTD)** contenant la région d'activation de la transcription **AF1** (*Activating function-1*), intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles. La totalité de ce domaine est nécessaire pour la fonction du récepteur. Son interaction avec le domaine de liaison du ligand est requise pour une conformation tridimensionnelle stable du récepteur. Ce domaine est porteur d'une séquence polymorphique de résidus glutamine, le nombre de résidus varie de 9 à 38 chez la population normale.

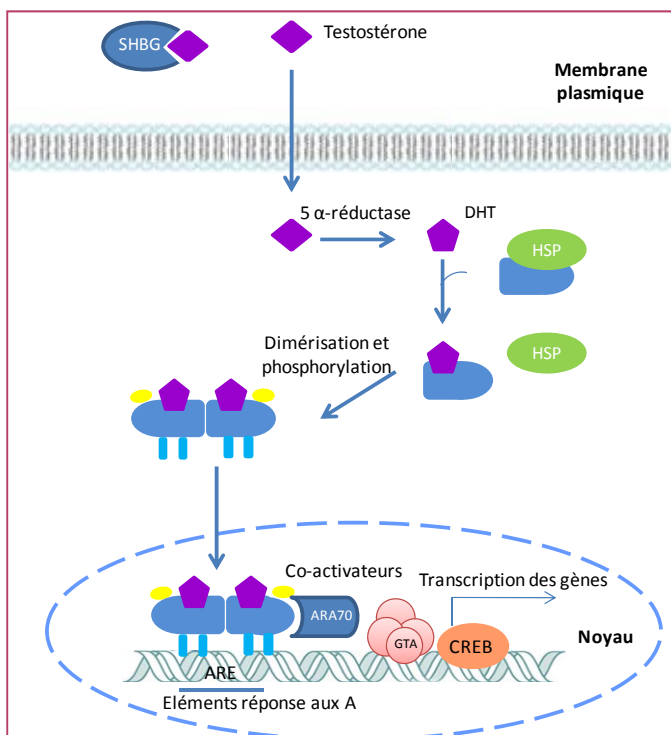
**-Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)** composé de deux structures en doigt de zinc dont le premier est responsable de la reconnaissance de la séquence de l'ADN et le second favorise la formation de l'homodimère et stabilise l'interaction RA-ADN. Il est porteur d'un site de phosphorylation nécessaire pour une activité transcriptionnelle optimale.



-**La région charnière (HR)** contient un site de localisation nucléaire (NLS) et un motif de dégradation par le système d'ubiquitination par le protéasome.

-**Le domaine C-terminal** contient le domaine de liaison du ligand, une deuxième région régulatrice **AF2 (Activating function-2)** qui a une haute affinité spécifique de liaison aux androgènes, une séquence NLS et le domaine de liaison aux Hsp 90. Cette affinité est favorisée par les protéines chaperonnes du choc thermique qui le maintiennent dans une conformation favorable à la liaison des androgènes tout en empêchant sa fixation à l'ADN.

Le RA est cytoplasmique, d'abord localisé dans le cytoplasme et stabilisé par un complexe de protéines chaperonnes du choc thermique Hsp90, 70, 56 et 23. La fixation du ligand entraîne la dissociation des protéines chaperonnes et est suivie de la phosphorylation du récepteur et d'un changement de conformation lui permettant de se lier à une autre molécule et de former un dimère. Après translocation dans le noyau, l'homodimère se fixe sur l'ADN au niveau de l'élément réponse aux androgènes l'ARE, situé dans le promoteur ou la région enhancer des gènes cibles et induit le recrutement des cofacteurs de type co-activateurs ou co-répresseurs, des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II. Ce complexe protéique permettra ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles (figure I.7) (Dehm and Tindall, 2005; Feldman and Feldman, 2001; Li and Al-Azzawi, 2009).



**Figure I.7. Mode d'action des androgènes :** La voie génomique (adaptée d'après Feldman and Feldman, 2001). La liaison des androgènes au RA active le récepteur et régule la synthèse de nouvelles protéines suite à l'activation de la transcription de gènes contenant des ARE dans leur voisinage. La testosterone circule dans le sang liée à l'albumine ou la *Steroid-Hormone-Binding Globulin* (SHBG). La testosterone libre pénètre dans la cellule prostatique où elle sera convertie en dihydrotestostérone (DHT) par la 5- $\alpha$  réductase. La liaison de la DHT au RA induit la dissociation des protéines *heat-shock* (Hsp), la phosphorylation et la dimérisation du récepteur. Le dimère pénètre dans le noyau et active la transcription des gènes contenant dans leur voisinage des éléments réponse aux androgènes (ARE). La fixation des coactivateurs (comme ARA70 *Androgen Receptor Associated Protein 70*) ou des corépresseurs (non illustré) au complexe, active ou inhibe, respectivement, son interaction avec l'appareil transcriptionnel (GTA) *General Transcription apparatus* (ou *G-Protein activation transcription*).

### Régulation de l'activité du récepteur androgénique

L'activité du récepteur est modulée par la présence des molécules modulatrices spécifiques. La fixation d'un ligand agoniste dans le site de liaison induit un changement de conformation du récepteur qui interagit avec les molécules coactivatrices et active la transcription des gènes spécifiques androgéno-régulés. Par contre la fixation d'un ligand antagoniste (anti-androgène) dans le site de liaison, confère au récepteur une conformation spatiale qui interagit préférentiellement avec les molécules corépresseurs et réprime la transcription. L'action des RA dépend donc de l'expression tissulaire et environnementale des coactivateurs ou corépresseurs (Dehm and Tindall, 2005; Yeh et al., 1999a).

La phosphorylation, l'ubiquitinylation, l'acétylation et la sumoylation du RA influencent son activité transcriptionnelle, sa stabilité ou sa localisation subcellulaire (Chang et al., 2012). En effet la phosphorylation des résidus séryles du NTD augmente l'activité du RA en favorisant le recrutement de co-activateurs (Yeh et al., 1999b) pendant que la phosphorylation de la serine au niveau de la région charnière est impliquée dans la translocation du RA vers le cytoplasme (Gioeli et al., 2006). La phosphorylation des sérines 210 et 790 favorise son ubiquitinylation par l'ubiquitine ligase MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*) et permet ainsi sa dégradation au niveau du protéasome (Lin et al., 2002).

### Gènes régulés par les androgènes

Le RA module l'expression de nombreux gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires. Il peut réguler l'expression des gènes de manière directe (par interaction directe au voisinage du gène) ou indirecte, où les produits de gènes cibles peuvent aussi influencer l'expression d'autres gènes par des mécanismes transcriptionnels ou post-transcriptionnels.

Le RA module la transcription des gènes impliqués dans la synthèse, la maturation, le transport et la dégradation des protéines sécrétées dans le liquide séminale comme la PSA (KLK3, une sérine protéase qui intervient dans la liquéfaction du sperme et constitue un biomarqueur du cancer prostatique), KLK2 (une sérine protéase qui active la proPSA). Il régule aussi l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et de la glycolyse. De plus, il module l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire par induction des cyclines D1 et D3, la *cycline-dependent kinase* (CDK8), RAB4A (membre de la famille de l'ocogène Ras) ou par inhibition d'inhibiteurs du cycle comme la protéine Rb ; de l'apoptose : caspase-2, c-FLIP, les facteurs de croissance (IGF et EGF) et leur voie de signalisation, la voie PI3-kinase, les MAP Kinases et les facteurs de transcription. Le tableau I.1 reprend les gènes cibles directs du RA d'après Kaarbo *et al.* (Kaarbo et al., 2007).



Gènes	Protéines	Fonctions
<b>CDKN1A</b>	<i>p21</i>	Régulateur des complexes cyclines/CDK
<b>c-FLIP</b>	<i>Fas/FasL-associated death domain protein-like inhibitory protein</i>	Inhibiteur de l'apoptose médié par les récepteurs de mort
<b>CYP3A5</b>	<i>Aryl hydrocarbure decarboxylase</i>	Transforme testostérone en un métabolite inactif
<b>FGF8</b>	<i>Fibroblast growth factor 8</i>	Facteur de croissance impliqué dans la carcinogenèse prostatique
<b>hPAR1</b>	<i>Human protease-activated receptor-1</i>	Impliqué dans la transformation maligne, l'invasion
<b>IGFBP3</b>	<i>IGF binding protein 3</i>	Inhibe la prolifération cellulaire, induit l'apoptose
<b>KLK2</b>	<i>Kallikreine 2</i>	Sérine protéase, active la pro-PSA
<b>KLK3</b>	<i>PSA</i>	Sérine protéase impliquée dans la liquéfaction du sperme
<b>MMP 2</b>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	Associé à la formation de métastases
<b>NEP</b>	<i>Neutral endopeptidase</i>	Métallopeptidase zinc-dépendante présente à la surface membranaire
<b>ODC</b>	<i>Ornithine décarboxylase</i>	Catalyseur de la synthèse de polyamines
<b>SCAP</b>	<i>SREBP cleavage activating protein</i>	Régule l'activation de SREBP (Serpin mRNA binding protein), stimule la lipogenèse
<b>TMPRSS2</b>	<i>Transmembrane protease serine 2</i>	Active PAR2, région promotrice fusionnée à des facteurs ETS dans les cancers prostatiques
<b>TMEPAI</b>	<i>Transmembrane prostate androgen inducer</i>	Régulateur négatif de la croissance cellulaire et de la stabilité du RA

**Tableau I.1 Principaux gènes cibles directs du RA.** Tableau adaptée d'après Kaarbo et al. (2007).

Le récepteur peut aussi réguler la transcription de certains gènes par la régulation de facteur de transcription comme le facteur trans ETV1 (*ETS translocation variant 1*) responsable de la transcription de différentes métalloprotéases impliquées dans les métastases des cellules du cancer prostatique (Cai et al., 2007). Il est aussi capable de moduler l'expression de p27 et des cyclines D sans modifier le taux de leurs transcrits (Wang et al., 2008a; Xu et al., 2006). Il peut également moduler l'expression des miRNA qui régulent l'expression des gènes cibles par augmentation de la dégradation de leur transcrits ou par inhibition de la traduction (Shi et al., 2007).

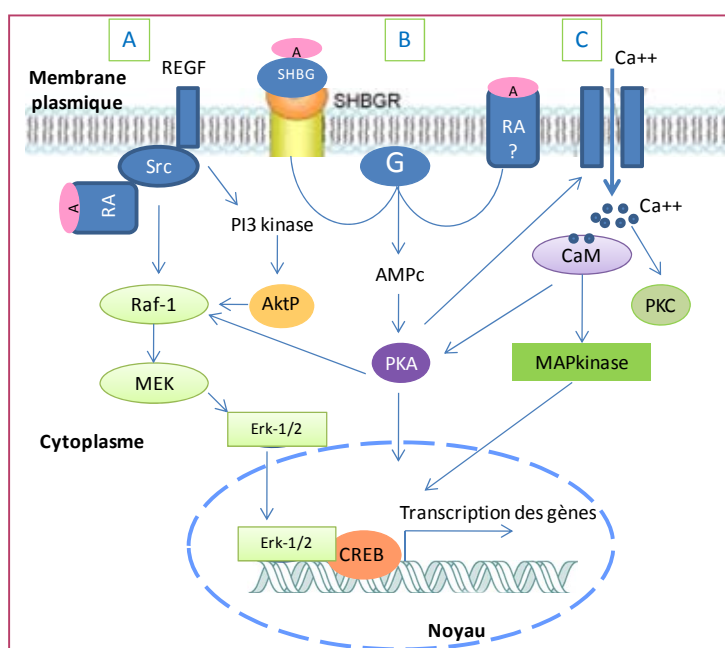
### *La voie non génomique ou voie non classique*

Le mécanisme d'action non génomique des stéroïdes se distingue de celui de la voie classique par la rapidité avec laquelle il médie les effets hormonaux en absence d'interaction RA/ADN. Il implique l'activation ou la répression des voies de signalisations intracellulaires calcium dépendantes ou couplées aux protéines G ou aux MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinases. Des modes d'action des stéroïdes non génomiques ont été mis en évidence dans différents cancer comme celui du sein ou de la prostate. La présence et la fonction des récepteurs membranaires aux androgènes ont été décrites dans les lignées cellulaires prostatiques humaines androgéno-



sensibles LNCaP (Kampa et al., 2002; Stathopoulos et al., 2003). On a montré en utilisant la testostérone couplée à la BSA, l'existence des récepteurs membranaires qui seraient présents dans les carcinomes et faiblement présents ou absent dans le tissu normal ou tissu avec hyperplasie bénigne (BPH) (*Benign prostatic hyperplasia*). Ils pourraient être ainsi impliqués dans la transition de cellules vers l'androgéno-indépendance. Cependant, récemment il a été montré que l'activation de ces récepteurs induit l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro* et *in vivo* (Hatzoglou et al., 2005; Kallergi et al., 2007; Papadopoulou et al., 2009).

L'effet non génomique des stéroïdes pourrait aussi potentiellement être médié (i) par le biais de récepteur intracellulaire RA et activation de la Src-kinase, (ii) par une liaison directe à un site de liaison spécifique de la molécule cible, en l'absence du RA, (iii) par un récepteur transmembranaire RA, couplé à la protéine G transmembranaire ou (iv) par le biais de changements dans la fluidité de la membrane (Michels and Hoppe, 2008). Cette voie non génomique est insensible aux inhibiteurs de la transcription et de la traduction. Un autre mécanisme proposé impliquerait le récepteur de la *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG). Cette dernière liée aux stéroïdes, se lie à son récepteur et transduit son signal via une protéine G, qui induit l'activation de l'adénylcyclase et la génération rapide de l'AMPc. Ce processus se déroule en quelques minutes (Cheng et al., 2007). Ces actions de messenger secondaire affectent l'activité transcriptionnelle de récepteurs classiques, intracellulaires des hormones stéroïdes. L'activation de la voie initiée par la SHBG entraîne aussi l'élévation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, qui active la PKA, la PKC ou les MAPKs, et module ainsi l'activité des facteurs de transcription. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les interrelations entre ces voies complexes et leur impact sur la voie génomique (figure I.8).

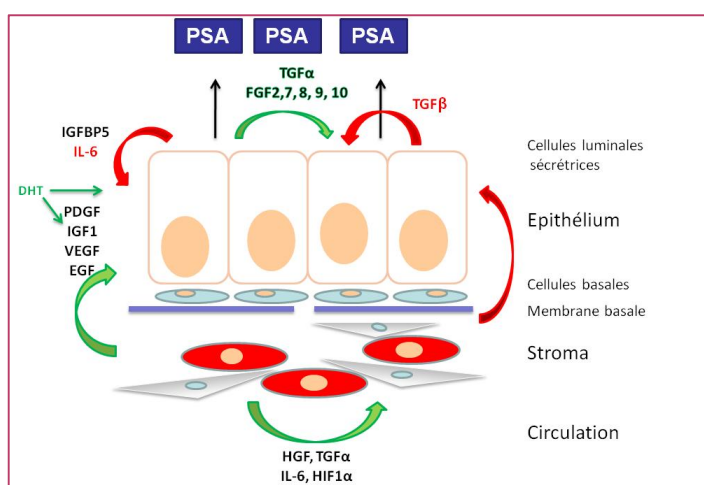


**Figure I.8. Mode d'action des androgènes :** La voie non génomique. Les androgènes sont capables d'activer rapidement diverses cascades de signalisation. (A) : Le RA peut former un complexe avec Src au niveau du cytoplasme et activer la voie MAP kinase. (B) : L'A peut se lier au récepteur de la SHBG couplé à la protéine G ou à un récepteur membranaire hypo-thétique couplé à la protéine G et activer l'AMPc et la protéine kinase A. (C) Ils peuvent aussi médier leurs effets par l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et activerait la voie des MAP kinase ou la PKA ou la PKC. Figure adaptée d'après Michels et Hoppe (2008).

### 1.4.2. INTERACTIONS ÉPITHÉLIUM-STROMA

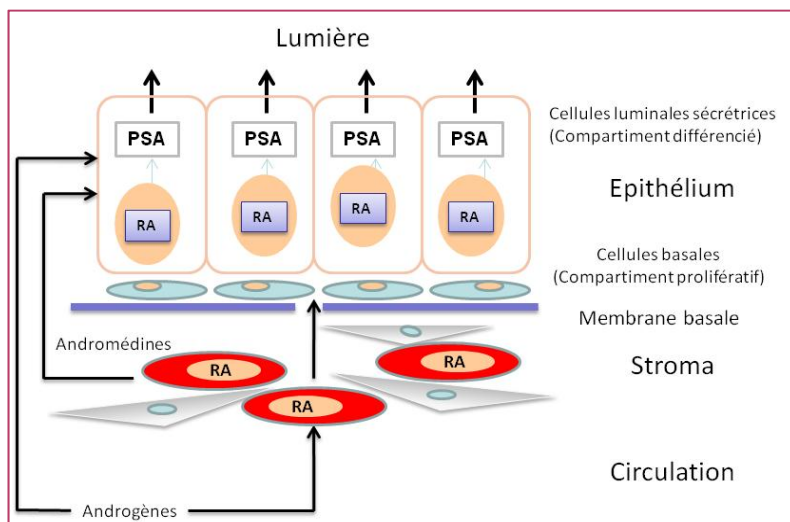
Les interactions entre les cellules stromales et épithéliales sont essentielles à la différenciation et la croissance prostatique de la période fœtale jusqu'au vieillissement (Chung et al., 1991; Long et al., 2005).

La base moléculaire de cette interdépendance résulte dans la distribution particulière de différentes enzymes (5  $\alpha$ -réductase, aromatasase) impliquées dans les régulations paracrine au sein de la prostate. Ainsi on a montré que la 5  $\alpha$ -réductase de type 2, présente seulement dans l'épithélium prostatique, n'est plus exprimée par celui-ci lorsque le stroma et l'épithélium sont cultivés séparément (Delos et al., 1995). Cette interdépendance entre les deux compartiments résulte aussi de la production par l'un de ces types cellulaires de facteurs de croissance pouvant agir via leurs récepteurs spécifiques situés sur l'autre type cellulaire. Des nombreux travaux ont en effet montré que sous stimulation par la DHT le stroma produit différents facteurs de croissance tels que le KGF1 (*Keratinocyte growth factor 1*), les FGF ou les IGFs et leurs protéines vectrices (figure I.9). Ces différents facteurs agissent sur les cellules épithéliales pour permettre leur différenciation et /ou leur croissance et contrôler ainsi l'homéostasie cellulaire au sein de la glande (Berry et al., 2008; Long et al., 2005).



**Figure I.9. Interaction stroma/épithélium dans la prostate :** Les cellules stromales sécrètent différents facteurs de croissance importants pour la maintenance de la prostate. Certains facteurs ont des effets de stimulation positive (en vert) ou d'inhibition (en rouge). Certains sont régulés par la DHT. Les cellules épithéliales sécrétoires et les cellules stromales expriment le RA. Les cellules luminales sécrètent le PSA en réponse au DHT (D'après Berry et al. 2008).

Au sein de la prostate, l'expression du RA (et son mRNA correspondant) est préférentiellement au niveau nucléaire des cellules épithéliales sécrétrices et des cellules stromales. Par contre elle est complètement absente dans les cellules basales (Quarmby et al., 1990). Dans la prostate saine, la croissance et le développement des cellules épithéliales dépendent également (indirectement) du compartiment stromal (Arnold and Isaacs, 2002; Cunha et al., 1987). La liaison de l'androgène au RA des différentes cellules du compartiment stromal induit la production de peptides solubles (les andromédines, facteurs de croissance et de survie), qui peuvent diffuser à travers la membrane basale pour atteindre le compartiment épithélial (la voie paracrine) (Litvinov et al., 2003) (Figure I.10).



**Figure 1.10. Signalisation des récepteurs aux androgènes dans la prostate normale : Voie paracrine :** En réponse aux androgènes les cellules stromales (musculaires et fibroblastes) produisent des facteurs de croissance et de survie qui vont diffuser à travers la membrane basale et agir sur les cellules basales et sécrétoires du compartiment épithélial. Les androgènes sont nécessaires à la différenciation des cellules luminales sécrétoires et à la production du PSA. (D'après Vis and Schröder, 2009).

La relation Stroma/épithélium a été mise en évidence par les travaux de Gao et ses collaborateurs (Gao et al., 2001). Ils ont démontré que lorsque du tissu épithélial issu d'hyperplasie bénigne de la prostate a été transplanté dans le stroma mésenchymateux de souris, la différenciation épithéliale de la prostate a été observée dans le tissu transplanté en présence des androgènes avec une expression du RA dans les deux compartiments. Par contre en absence d'androgène, le tissu prostatique humain transplanté ne peut ni proliférer ni se différencier avec absence d'expression du RA. Cependant, les cellules malignes de la prostate peuvent se développer dans des conditions appauvries en androgènes, indépendamment de la disponibilité de facteurs de croissance paracrines. Apparemment, ces cellules cancéreuses peuvent détourner le contrôle stromal et employer un mode autocrine pour synthétiser et sécréter des facteurs de croissance et de survie (la voie autocrine). Le cancer à ce stade ne s'appuie ni sur les androgènes externes ni sur les facteurs produits par le stroma pour sa croissance et sa survie (Vis and Schroder, 2009).

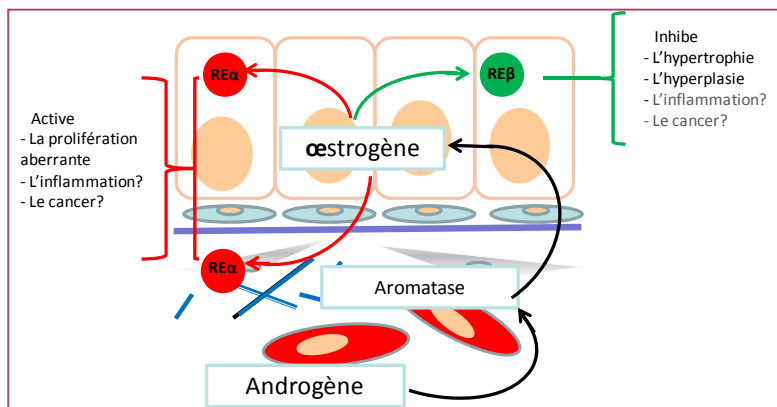
### 1.4.3. LES ŒSTROGÈNES

Les androgènes et les œstrogènes agissent de concert pour assurer le développement, la croissance et l'entretien de la prostate. Chez le mâle les œstrogènes sont essentiellement l'œstradiol et l'œstrone, qui résulte de l'aromatization de la testostérone et de l'androstènedione (Fishman and Goto, 1981).

Comme les androgènes, les œstrogènes, agissent via leurs récepteurs les RE. Ces récepteurs nucléaires après fixation du ligand vont se lier à l'ADN au niveau des éléments de réponse aux œstrogènes et moduler la transcription de gènes cibles (Zhu, 2005). Il existe deux isoformes de RE codés par deux gènes distincts, RE $\alpha$  et RE $\beta$ . Dans la prostate normale, les cellules stromales expriment le RE $\alpha$  alors que les cellules épithéliales expriment les deux isoformes (Ellem and Risbridger, 2007; Makela et al., 2000).

L'aromatase, enzyme responsable de la métabolisation des androgènes en œstrogènes est majoritairement exprimée dans le stroma de la prostate normale (Ellem et al., 2004). Les œstrogènes agissent donc de manière paracrine sur l'épithélium prostatique. Dans le cancer prostatique on observe une induction de l'expression de l'aromatase par les cellules épithéliales. Il en résulte une perte de régulation paracrine et le développement d'une signalisation autocrine des œstrogènes. En effet des souris surexprimant l'aromatase ont des prostates faiblement développées, alors que des souris knockout pour cette enzyme ont des prostates hypertrophiées dues à une forte concentration en androgène et en RA (McPherson et al., 2001).

Les œstrogènes peuvent agir soit directement via les récepteurs RE $\alpha$  localisés dans le stroma ou via les récepteurs RE $\beta$  localisés dans l'épithélium. Le récepteur  $\alpha$  médie des effets prolifératifs de l'épithélium alors que le récepteur  $\beta$  est impliqué dans une réponse antiproliférative des œstrogènes (Figure I.11) (Risbridger et al., 2007).



**Figure I.11. Résumé des mécanismes de signalisation des œstrogènes dans la prostate.** La testostérone est métabolisée en œstrogène par l'aromatase. Les œstrogènes agissent par l'intermédiaire de RE $\alpha$  ou RE $\beta$ . Les effets indésirables via RE $\alpha$  dans le stroma et l'épithélium sont la prolifération, l'inflammation et éventuellement, le cancer. En revanche, les œstrogènes exercent des effets bénéfiques via les RE $\beta$  dans l'épithélium, tels que la prévention de l'hyperplasie et l'hypertrophie, une

action anti-proliférative et potentiellement, anti-cancérigène (Adaptée d'après Risbridger et al. 2007).

Les œstrogènes peuvent aussi avoir des effets indirectes sur le fonctionnement prostatique en agissant sur les sécrétions de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Le relargage de LH est en effet réduit par les œstrogènes, ce qui entraîne la réduction du niveau des androgènes et induit l'apoptose des cellules épithéliales et l'atrophie de la glande (McPherson et al., 2007).

Les phyto-œstrogènes d'origine alimentaire et les xœstrogènes environnementaux peuvent avoir aussi un impact sur le développement, le fonctionnement et les pathologies de la prostate en interagissant non seulement avec les récepteurs œstrogéniques mais aussi avec différentes enzymes de leur métabolisme ou en agissant indirectement par voie systémique sur les sécrétions hypophysaires (Vitale et al., 2013). Dans le contexte des pathologies prostatiques, il a été suggéré que le faible taux de cancer prostatique dans les populations asiatiques et plus particulièrement japonaise était dû à une alimentation riche en soja. Celui-ci étant une source majeure de phytoœstrogènes (Parkin et al., 1999).

## 2. LE CANCER DE LA PROSTATE

Le cancer de la prostate est le cancer le plus diagnostiqué chez l'homme dans les pays industrialisés et correspond à la deuxième cause du décès par cancer (Hsing et al., 2000). Du fait d'un dépistage plus précoce, son incidence augmente, 899,000 cas de cancer prostatique diagnostiqués dans le monde en 2008 (Hsing et al., 2008). Un des mécanismes dès lors mis en cause est le vieillissement de la population. En effet, plus de 80% de cas sont diagnostiqués après 65 ans.

Le cancer de la prostate comme les autres cancers semble débiter par la transformation des cellules normales épithéliales en cellules tumorales à travers l'accumulation de modifications génétiques somatiques et épigénétiques des gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes suite à l'action de facteurs tumorigènes (prédisposition génétique, facteurs environnementaux,...). Ces modifications se traduisent notamment par l'immortalisation cellulaire et une dysrégulation du cycle cellulaire.

### 2.1. MODÈLE DE LA TUMORIGÈNE DE LA PROSTATE

Le développement du cancer de la prostate est précédé de deux stades précurseurs appelés atrophie inflammatoire proliférative (AIP) et néoplasie intraépithéliale prostatique (NIP). L'initiation de la tumorigenèse prostatique résulte d'une accumulation de dommages oxydatifs due à une inflammation chronique. Les gènes RNASEL (*Ribonuclease L*), ELAC2 (*ELAC homologue 2*) et MSR1 (*Macrophage scavenger receptor 1*), dont certaines mutations sont associées à un risque élevé de développer un cancer de la prostate, sont impliqués dans le processus inflammatoire et une atténuation de leur fonction pourrait promouvoir le développement de l'AIP. Par la suite, d'autres changements comme l'hyperméthylation du gène GSTP1 (*Glutathione S-transférase pi 1*) et la diminution de l'inhibiteur de cycline p27 (inhibiteur de la prolifération cellulaire) favorisent l'apparition de NIP (De Marzo et al., 2007; Shen and Abate-Shen, 2010).

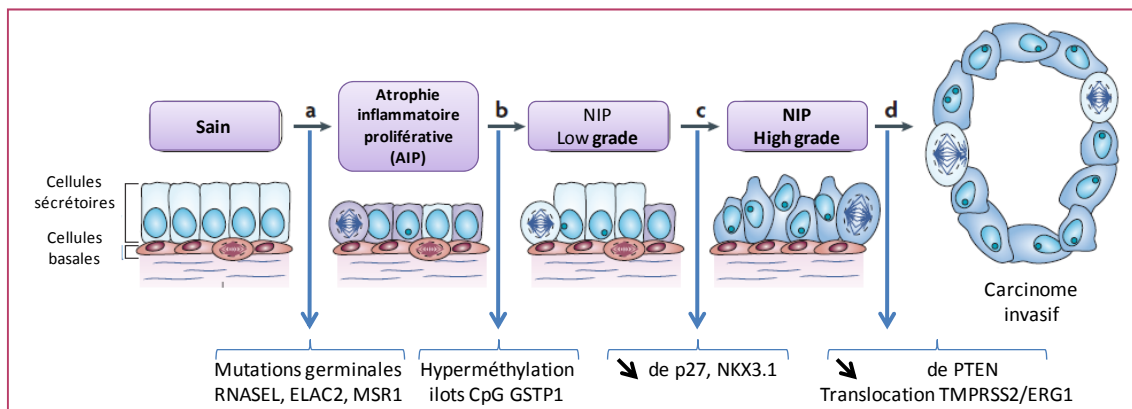
La NIP est définie comme le stade préinvasif du cancer de la prostate et sa présence dans les biopsies prostatiques est un marqueur hautement prédictif de cancer. Elle est caractérisée d'une prolifération anormale de cellules épithéliales à l'intérieur des acini prostatiques. D'un point de vue diagnostique, l'AIP et la NIP sont cliniquement indétectables et ne s'accompagnent pas d'un niveau sanguin élevé du PSA. Seul le cancer de la prostate module le PSA à la hausse.

Le changement majeure entre la NIP et le cancer est la perte des cellules basales (Humphrey, 2007). L'adénocarcinome de la prostate est caractérisé par une panoplie de changements moléculaires dont une absence fréquente des gènes suppresseurs comme NKX3.1 (*NK3 homeobox 1*) et PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) (De Marzo et al., 2007) ou une expression de proto-oncogènes comme MYC (*Myelocytomatosis oncogene*) et NOTCH-1 (*Notch*



*homolog 1*) (Shen and Abate-Shen, 2010). La plus grande accumulation de changements génomiques est la fusion de TMPRSS2-ERG (*Transmembrane protease serine 2-ETS related gene*) (Tomlins et al., 2005), conduit à la progression du cancer prostatique vers un cancer plus invasif. Cette fusion est présente dans 40% des tumeurs prostatiques primaires. D'autres facteurs transcriptionnels de la famille ETS (*Erythroblast transformation specific*) sont aussi impliqués dans cette fusion dans le cancer de la prostate, mais avec une plus faible fréquence (Camparo and Vieillefond, 2007; Clark and Cooper, 2009)

Les cellules subissent donc des modifications précancéreuses aboutissant à la formation d'un carcinome devenant de plus en plus agressif avec perte de différenciation. Bien que généralement localisé, le cancer de la prostate peut parfois devenir invasif, s'étendre dans les tissus adjacents et devenir métastatique (figure I.12).



**Figure I.12. Modèle cellulaire et moléculaire de la carcinogenèse prostatique.** Figure adaptée d'après (De Marzo et al., 2007). AIP : atrophie inflammatoire proliférative, NIP : néoplasie intraépithéliale de la prostate.

99% des tumeurs malignes prostatiques sont des adénocarcinomes. L'adénocarcinome est polymorphe et présente un large spectre de lésions allant de carcinome très différencié à des carcinomes très peu différenciés où les cellules tumorales ne forment plus une glande organisée et forment une organisation aléatoire. Le système de classification tissulaire le plus couramment utilisé pour le cancer de la prostate est la classification de Gleason (Gleason and Mellinger, 1974). Elle sert à déterminer le degré d'agressivité de la tumeur et, elle définit 5 grades allant de grade 1, le plus différencié, au grade 5 le moins différencié (le plus agressif). Le score de Gleason est défini par la somme des deux grades les plus représentés dans la tumeur (le premier et le deuxième grade). Il va donc de grade 2 (tumeurs bien différenciées) à 10 (tumeurs indifférenciées).

Dans un premier temps, la croissance de la tumeur est androgéno-dépendante et répond aux traitements anti-androgéniques comme la castration chirurgicale, ou le blocage androgénique (Huggins and Hodges, 2002). Les stratégies de blocage des androgènes utilisent les agonistes et antagonistes de la LHRH et les antagonistes des RA pour inhiber respectivement la production

d'androgènes testiculaires et la liaison des androgènes résiduelles au RA (Labrie et al., 1983). Les traitements par la LHRH sont devenus périodiques afin de limiter la pression de sélection et l'émergence de clones tumoraux androgéno-résistants. Des inhibiteurs des enzymes responsables de la synthèse des androgènes surrénaliens ou de la 5 $\alpha$  réductase sont utilisés. La caractéristique commune de ces approches est qu'ils ciblent l'action du récepteur (RA), par (i) la réduction des concentrations du ligand circulant indigène de manière médicale ou chirurgicale, ou par (ii) diminution de la capacité des androgènes à se lier au RA à l'aide des antagonistes des récepteurs (Denmeade and Isaacs, 2002; Vis and Schroder, 2009).

Indépendamment de la nature du traitement utilisé, 80 à 90% des patients atteints de métastases répondent initialement à l'ablation androgénique. Malheureusement, le cancer finit par échapper au traitement et devient résistant à la castration. L'abréviation CR (*Castration resistant*) utilisée aujourd'hui en clinique remplace justement le terme indépendant des androgènes ou (*androgen independent*) puisque le cancer prostatique à ce stade avancé reste dépendant des androgènes. A ce stade, la survie des patients est alors limitée puisqu'il n'existe à ce jour aucune thérapie totalement efficace (Drake et al., 2013; Petrylak et al., 2004; Tannock et al., 2004).

La progression du cancer prostatique vers des stades réfractaires aux traitements anti-androgéniques est un processus évolutif. Il comporte au niveau moléculaire plusieurs événements qui se produisent selon une séquence mal comprise. De nombreux gènes et voies intracellulaires sont impliqués dans la progression tumorale (Closset et al., 2004; Harris et al., 2009; Shen and Abate-Shen, 2010). Leur expression ou leur inhibition confère aux cellules cancéreuses des avantages sélectifs vis-à-vis des cellules saines. Ceux-ci permettent ainsi un développement plus ou moins rapide de la tumeur.

Cette progression vers des stades de résistance à la castration (ablation hormonale) du cancer prostatique requiert différents mécanismes qui peuvent agir séparément ou selon un mode combinatoire difficile à mettre en évidence. La compréhension de ses mécanismes est une étape obligatoire afin de développer un traitement efficace pour vaincre la tumeur.

## 2.2. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE À LA CASTRATION

Ces mécanismes aboutissent à une modification de la réponse cellulaire aux androgènes, à la production par les cellules tumorales de facteurs de survie permettant de résister à l'apoptose. On a aussi évoqué récemment une prolifération sélective de cellules souches androgéno-indépendantes qui sont rares mais néanmoins présentes au sein des cancers prostatiques pour expliquer l'évolution de ce type de cancer (Collins and Maitland, 2006; Maitland et al., 2006).

### 2.2.1. MÉCANISMES DÉPENDANTS DU RA

La plupart des lignées cancéreuses prostatiques résistantes à l'ablation androgéniques montrent une expression du RA et le PSA (gène cible de RA), ce qui indique que la voie de signalisation via le RA reste intacte (Bentel and Tilley, 1996; Gregory et al., 1998). Ceci a été confirmé *in vivo* par l'expression dans le modèle de xénogreffe prostatique chez la souris lors de la progression vers un stade résistant à la castration (Chen et al., 2004). L'activité du RA est maintenue par différents mécanismes :

**Mutation du RA** : La réponse androgénique des cellules cancéreuses peut être modulée par le changement de spécificité du récepteur aux androgènes suite à des mutations ou à des modifications post traductionnelles de celui-ci, pour différents analogues stéroïdiens (Culig et al., 1993; Taplin et al., 2003; Tilley et al., 1996).

**Expression de RA alternatif constitutivement actif** : La découverte des isoformes du RA produits par splicing alternatif dans des cancers prostatiques a mis en évidence un mécanisme par lequel les cellules prostatiques cancéreuses développent une forme d'indépendance aux androgènes avec un RA fonctionnel garantissant la croissance et la survie des cellules cancéreuses prostatiques résistantes à la castration (CRPC) (*Castration resistant prostate cancer*) (Dehm et al., 2008; Guo et al., 2009; Hu et al., 2009a).

**Surexpression du RA et augmentation de la sensibilité du RA** : La cellule cancéreuse peut échapper à l'action des thérapies anti-androgéniques par la mise en place d'un mode d'action produisant une réponse androgénique en présence de faibles concentrations en androgènes. Cette réponse peut être modulée par la surexpression des RA suite à la castration (Wikstrom et al., 2007). En effet, une amplification du RA dans 30% des cancers hormono-réfractaires a été observé (Linja et al., 2001; Mohler et al., 2004). Cette intensité peut être aussi influencée par l'augmentation de la stabilité du RA (Gregory et al., 2001) ou par la localisation des récepteurs androgéniques eux-mêmes privilégiant ainsi une stimulation des voies de signalisation cytoplasmique ou nucléaire. La sensibilité aux androgènes peut être aussi influencée par des changements de conformation subtile du RA lui-même ou de modulateurs cytoplasmiques activés par l'un ou l'autre mode d'action hormonal.

**Changement de l'expression des corégulateurs du RA** : L'altération de l'expression des cofacteurs du RA représente un mécanisme de résistance à la castration. Des mutations au niveau des gènes des coactivateurs ou une surexpression au niveau des protéines régulatrices en associations avec des mutations au niveau du RA (ou sans) ont été rapportés dans les cellules résistantes à la privation d'androgènes (Gregory et al., 2001; Rocchi et al., 2005; Rocchi et al., 2004).

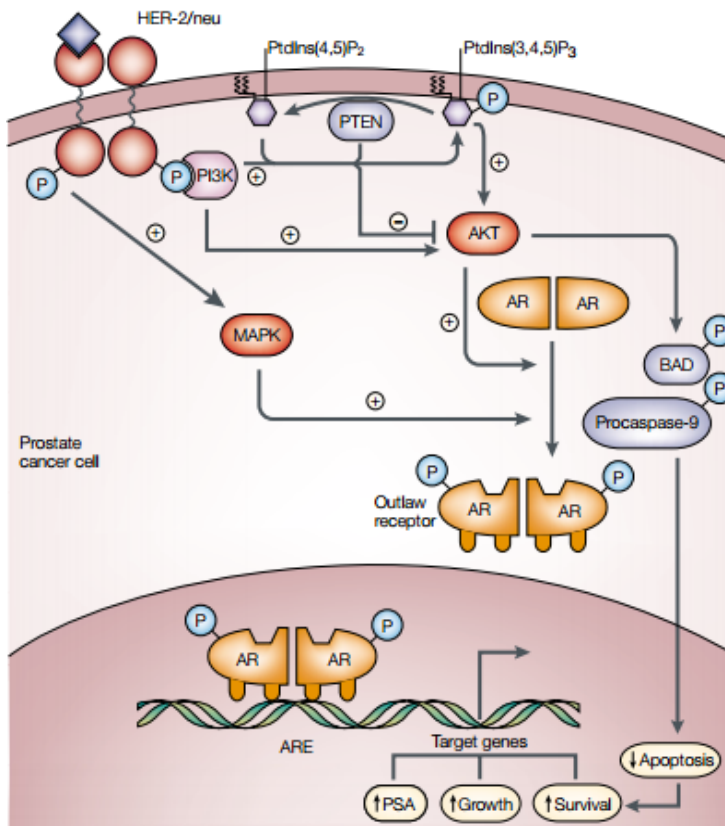


**Production intracrine d'androgènes par les cellules tumorales:** L'hypersensibilité du RA peut être également associée à une production intracrine des androgènes. Les cellules tumorales auraient la possibilité de synthétiser les androgènes à partir des stéroïdes surrénaliens ou directement à partir du cholestérol ou de ces précurseurs. Il a été démontré que le taux de testostérone était augmenté dans les métastases hormono-réfractaires par rapport aux tumeurs localisées non traitées (Montgomery et al., 2008). De plus, différentes études ont montré une surexpression de certains gènes codants pour les enzymes impliqués dans la conversion des stéroïdes surrénaliens en DHT dans les métastases des patients à un stade résistant à la castration (Locke et al., 2008; Montgomery et al., 2008; Stanbrough et al., 2006)

**Activation du RA par phosphorylation par les facteurs de croissances :** Le RA peut-être activé sans ligand par interaction avec d'autres voies de signalisation intracellulaires. Certains facteurs de croissance comme l'IGF1, le KGF ou l'EGF peuvent entraîner la phosphorylation et en conséquence l'activation du RA, activant ainsi les gènes cibles des androgènes en l'absence d'androgènes (Culig et al., 1994; Miyake et al., 2000d).

De la même manière, le récepteur des androgènes peut être activé en l'absence de testostérone ou de DHT suite à la surexpression de HER-2/neu et l'activation résultante de gènes androgéno-dépendants. HER-2/neu pourrait agir sur le récepteur par la voie des MAP kinases et la voie AKT ou par inactivation de la phosphatase PTEN, principal régulateur de la voie PI3K/AKT (Craft et al., 1999b; Wen et al., 2000). PTEN régule négativement la voie de survie Akt. C'est une phosphatase spécifique des phosphoinositides qui permet de transformer le phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3) en phosphatidylinositol 4,5 bi-phosphate (PIP2) (Figure I.13). La perte d'activité de PTEN permet une augmentation de (PIP3) nécessaire à l'activation de la voie Akt (Cantley and Neel, 1999). Akt phosphoryle et active ainsi le RA au niveau de la serine 213 et la serine 791 (Wen et al., 2000) ou active la survie par phosphorylation et inactivation des facteurs pro-apoptotiques comme BAD et la procaspase-9 (Kennedy et al., 1999; Zhou et al., 2000).

PTEN est un gène suppresseur de tumeur délété dans 23% des NIP de haut grade et dans 68% des cancers prostatiques primaires (Yoshimoto et al., 2006). Son invalidation chez la souris résulte en la formation des lésions cancéreuses prostatiques et métastatiques (Ma et al., 2005; Wang et al., 2003).



**Figure I.13. Activation des voies de transduction et activation des RA.** Chez les patients traités par ablation des androgènes, dans les cellules cancéreuses, HER-2/neu ainsi que d'autres récepteurs à tyrosine kinase sont surexprimées. La voie HER-2/neu active indirectement la voie MAPkinase qui phosphoryle le RA et active la survie. HER-2/neu active la voie de survie Akt par activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ou par inactivation de la phosphatase lipidique PTEN. Akt phosphoryle ainsi le RA ou active la survie par phosphorylation et inactivation des facteurs pro-apoptotiques comme BAD et la procaspase-9. D'après (Feldman and Feldman, 2001).

## 2.2.2. MÉCANISMES INDÉPENDANTS DU RA

### **Cellules souches androgéno-indépendantes :**

La progression vers l'androgéno-indépendance peut être expliquée par l'existence d'une sous-population de cellules tumorales androgéno-indépendantes parmi les cellules basales de la prostate, avant tout traitement. Cette hypothèse a pu être démontrée dans un modèle expérimental de xénogreffe tumorale étudiant, par des techniques de dilutions cellulaires, l'androgéno-indépendance et l'impact de la castration (English et al., 1987; Isaacs and Coffey, 1989).

Craft *et al* ont confirmé cette hypothèse et ont suggéré que les cancers prostatiques contiennent une population hétérogène de cellules dont l'androgéno-sensibilité varie. En effet la castration exerce une pression de sélection qui altère la composition en cellules des tumeurs et favorise *in fine* la prolifération des cellules androgéno-indépendantes (Craft et al., 1999a).

L'origine de ces cellules souches reste controversée. Il semblerait que les cellules androgéno-indépendantes présentes dans les cancers prostatiques soient en fait des cellules souches basales rares, responsables du maintien de la tumeur (Bonkhoff, 1996; Collins and Maitland, 2006). Ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de générer des populations cellulaires à phénotype hétérogène, dont le phénotype épithélial sécrétoire (exprimant le RA et la phosphatase acide prostatique). Elles pourraient donc correspondre à cette population de cellules souches cancéreuses qui sont présentes dans les tumeurs prostatiques (Maitland and Collins, 2005).

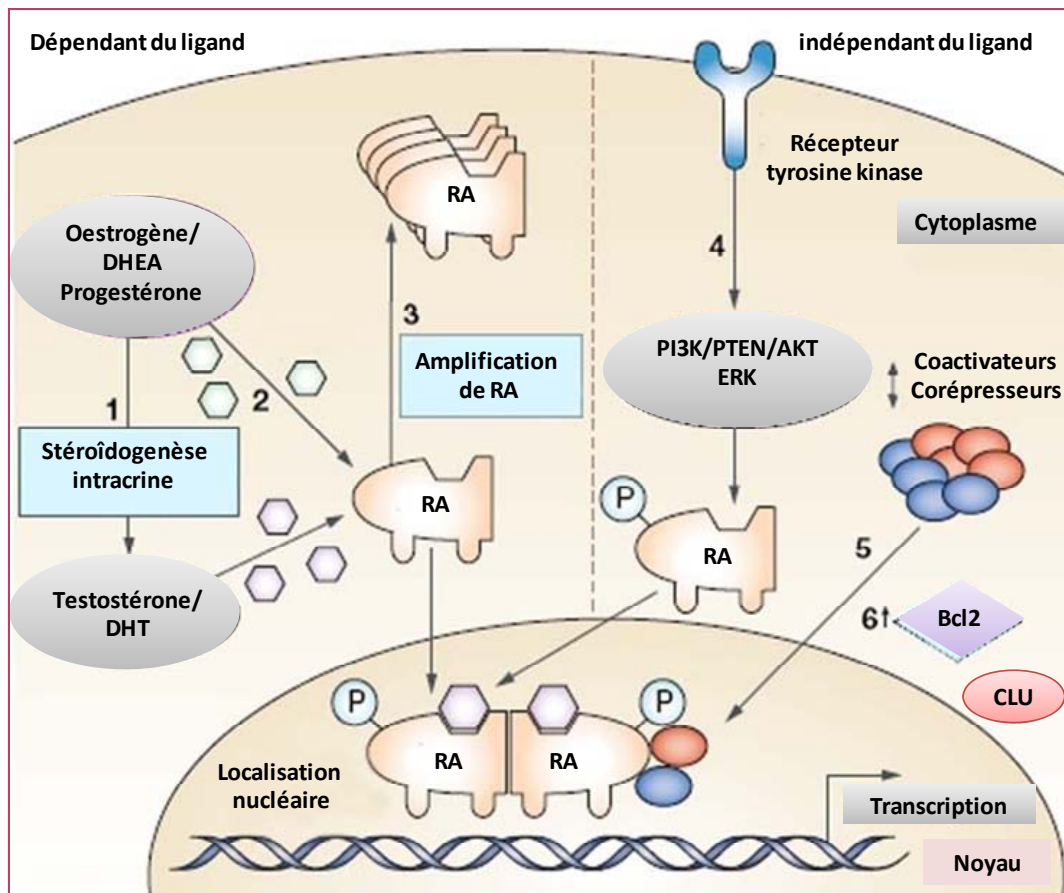
### ***Surexpression de facteurs anti-apoptotiques***

La progression du cancer prostatique peut aussi se produire via des voies qui ne nécessitent pas la présence du récepteur aux androgènes. Il est possible de contourner ce récepteur en activant la prolifération et en inhibant l'apoptose ; le gène *bcl-2*, qui bloque l'apoptose, est un des candidats car il n'est pas exprimé dans les cellules épithéliales prostatiques différenciées, mais il est fréquemment exprimé dans les NIPs ainsi que dans le cancer prostatique androgéno-indépendant (CPAI) (Colombel et al., 1993; Furuya et al., 1996). Les travaux expérimentaux explorant cette voie ont mis en évidence la complexité des partenaires moléculaires pouvant entraîner la survie cellulaire. Ainsi *Bcl-X<sub>L</sub>* (*B-cell lymphoma-extra large*), autre gène anti-apoptotique de la famille *Bcl-2*, présente une surexpression après castration et demeure élevé dans les tumeurs devenant hormono-indépendantes (Krajewska et al., 1996; Sun et al., 2008) . La clusterine/TRPM-2 (*Testosterone-repressed prostate messenger-2*) est également modulée par la castration (Montpetit et al., 1986). Dans les cancers prostatiques humains, le taux tissulaire de la clusterine est bas ou absent dans la plupart des cas avant toute thérapie. Il augmente de façon très significative dans les semaines qui suivent la mise en route d'un traitement de suppression androgénique (July et al., 2002; Miyake et al., 2005b).

Ces différents mécanismes de résistance dépendants ou indépendants du RA sont résumés dans la figure I.14.

Les cellules cancéreuses lors de leur évolution vers des stades avancés deviennent résistantes à la privation d'androgènes. Les cellules ne meurent plus par apoptose bien qu'elles continuent à exprimer la plupart des constituants nécessaires à l'exécution de cette voie. Les mécanismes moléculaires qui participent à l'émergence de cet avantage évolutif sont multiples. Ils peuvent impliquer les inducteurs ou des exécuteurs de l'apoptose, des inhibiteurs de la voie des caspases ou l'expression de facteurs de survie interagissant directement ou indirectement avec les voies d'apoptose (Igney and Krammer, 2002).





**Figure I.14. Mécanismes démontrés ou supposés être impliqués dans le développement de la résistance à l'ablation androgénique dans le cancer de la prostate.** On distingue à droite les mécanismes dépendants du ligand et à gauche les mécanismes indépendants du ligand. (1) La stéroïdogénèse intratumorale contribue à la synthèse de la testostérone et la DHT, et pourrait conduire à la persistance des androgènes au niveau des tissus, malgré la castration. (2) Des mutations dans le RA permettent son activation par d'autres ligands (autres stéroïdes) ou augmentent son affinité pour les androgènes résiduels. (3) Une amplification du RA permet la croissance des cellules cancéreuses prostatiques à de très faibles quantités d'androgènes surrenaliens. (4) L'activation indépendante du ligand du RA par des modifications indépendantes du ligand via des voies, y compris la phosphorylation de RA via la voie de tyrosine kinase conduisant à l'hypersensibilisation et augmente la translocation nucléaire du RA. (5) La variation de la balance des coactivateurs et corépresseurs augmente l'affinité du RA pour d'autres stéroïdes et son activité pour de faibles concentrations en androgènes. (6) D'autres voies de signalisation fonctionnent indépendamment du RA comme la surexpression des molécules anti-apoptotiques BCL-2 ou la CLU. Figure adaptée d'après (Harris et al., 2009).

# CHAPITRE 2. L'APOPTOSE

## 1. INTRODUCTION

La mort cellulaire a longtemps été considérée comme un phénomène passif inévitable qui survient suite à différentes agressions, ou parce que les cellules n'arrivent plus à assurer leur survie. L'étude de l'embryogénèse a révélé l'existence d'une nouvelle forme de mort cellulaire, une mort physiologique, active dans le développement de l'individu. Le développement normal d'un organe ne se fait pas par modelage mais par sculpture « La mort pour sculpter la vie ». Les cellules sont produites en grand excès, puis certaines meurent selon des critères particuliers requis pour l'organogénèse. Ce phénomène d'élimination sélective des cellules est médié par un processus appelé **APOPTOSE**. Ce terme a été introduit par Kerr et al., en 1972 et signifie en grecque « la chute programmée des feuilles ou des pétales » (Kerr et al., 1972).

L'apoptose est un phénomène hautement conservé et joue un rôle fondamental dans l'homéostasie tissulaire. En effet, dans un organisme adulte le taux de prolifération est contrebalancé par le taux des cellules en apoptose. Un déséquilibre entre ces deux processus est à l'origine de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires (Olanow, 2007; Zornig et al., 2001).

## 2. L'APOPTOSE ET LA NÉCROSE

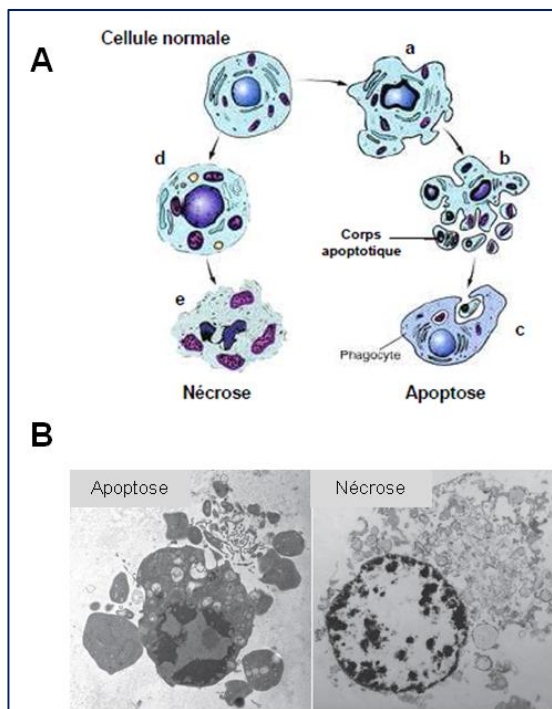
L'**apoptose** est un phénomène organisé biochimiquement, actif, et affecte les cellules individuellement en mettant en jeu des acteurs moléculaires qui lui sont spécifiques (Hengartner, 2000). Au cours de ce processus, la cellule subit des modifications biochimiques et morphologiques conduisant à sa disparition de manière complète et sans provoquer de phénomène inflammatoire. La première étape de l'apoptose consiste en la perte des liaisons intercellulaires et une condensation importante du noyau et du cytoplasme. Cela conduit à la diminution du volume cellulaire puis à la fragmentation de la chromatine entre les nucléosomes formant ainsi des fragments dont la taille est un multiple de 180 à 200 paires de bases, ce qui donne à l'ADN génomique l'aspect en échelle sur gel d'agarose, d'où le nom de « *DNA ladder* ». Le clivage de l'ADN internucléosomal s'effectue suite à l'activation d'endonucléases endogènes  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -dépendantes (Wyllie et al., 1980; Wyllie et al., 1984). La dernière étape du processus est caractérisée par le bourgeonnement de la membrane plasmique et la formation des corps apoptotiques qui seront rapidement phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines sans provoquer de réaction inflammatoire importante (Kerr et al., 1972). La reconnaissance de ces corps apoptotiques se fait grâce à l'inversion des phospholipides membranaires et à l'exportation des phosphatidylsérines (PS) dans la couche externe de la membrane cellulaire. Ce



phénomène d'externalisation de PS apparaît tôt dans l'apoptose et il est indépendant du type cellulaire (Fadok et al., 1992). Lorsque la phagocytose est inefficace, les corps apoptotiques perdent progressivement leur intégrité et libèrent leur contenu dans le milieu extracellulaire, il s'agit de la nécrose secondaire.

Contrairement à l'apoptose, la **nécrose** est une forme de mort accidentelle, involontaire et passive. Elle affecte des populations entières de cellules suite à une agression extérieure comme l'ischémie ou les brûlures. Elle se caractérise par une dilatation du cytoplasme et un gonflement de la cellule et de ses organites conduisant à son éclatement et à la libération du contenu

cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. L'ADN des cellules nécrotiques est dégradé de manière aléatoire (Bicknell and Cohen, 1995) par des endonucléases activées notamment par des protéases à sérines (Dong et al., 1997). La figure I.15 illustre les modifications morphologiques subies par une cellule lors des processus de l'apoptose et de la nécrose (Figure I.15).



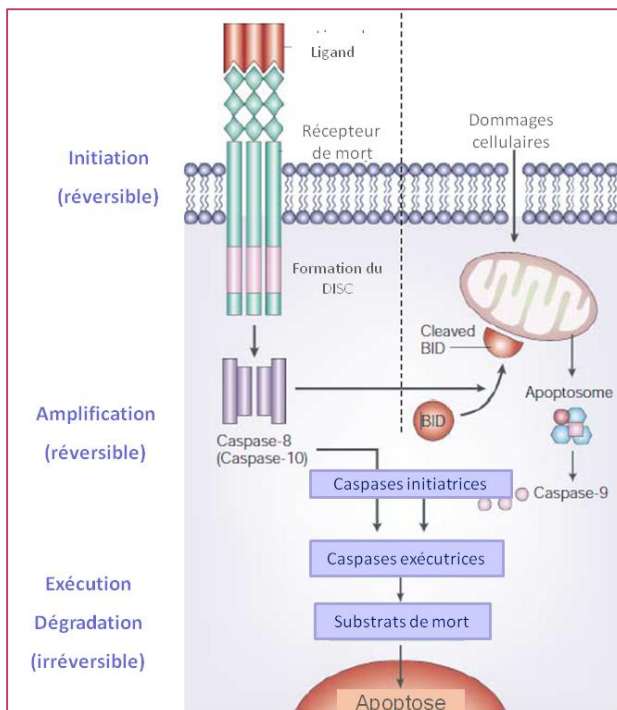
**Figure I.15. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.** A. Schéma comparatif entre le processus d'apoptose (a, condensation de l'ADN, dislocation des organites ; b, bourgeonnement de la membrane plasmique et formation des corps apoptotiques ; c, phagocytose des corps apoptotiques) et le processus de nécrose (d, dislocation de la membrane plasmique ; e, libération dans le milieu environnant du contenu cellulaire potentiellement inflammatoire). B ; Image au microscope électronique à balayage, d'après (Vandenabeele et al., 2010; Webb et al., 1997).

Une nouvelle forme de mort a été introduite très récemment, la necroptose. Il s'agit d'une explosion cellulaire ordonnée (ou nécrose ordonnée). Cette dernière, ainsi que la nécrose secondaire à un stade final s'accompagnent de phase de désintégrations et de dégradations cellulaires similaires à la nécrose. Ceci rend difficile de distinguer ces trois processus de mort sur le plan morphologique et biochimique même s'ils empruntent des voies de signalisations complètement différentes (Vanden Berghe et al., 2010; Vandenabeele et al., 2010; Webb et al., 1997).

### 3. SÉQUENCE SIGNALITIQUE DE L'APOPTOSE

L'apoptose est induite par différents facteurs chimiques ou physiques. Les principaux inducteurs sont le stress induit par l'hypoxygénation, l'augmentation ou la diminution des taux hormonaux (cortisol ou androgènes), l'atteinte à l'intégrité de l'ADN, la privation de facteurs de croissance ou la production de facteurs inducteurs d'apoptose ou ligand de mort comme TNF $\alpha$ . Malgré la

diversité des signaux inducteurs de mort, l'apoptose se déroule selon un processus commun composé de trois phases ; une phase d'initiation, une phase d'amplification et une phase d'exécution. Les deux premières phases sont réversibles et contrôlables. La phase d'exécution ou phase de dégradation est irréversible. C'est au cours de celle-ci que se manifestent les modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Lors de la phase d'initiation, la cellule va intégrer les signaux et orienter la réponse vers la vie ou la mort, suivant son état physique et son contexte environnemental. L'intégration des signaux apoptotiques se fait via des complexes protéiques spécialisés : soit via le DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) lorsque l'initiation du processus se fait par les récepteurs de mort, soit via l'apoptosome lorsque des dommages intracellulaires causés par des stress divers tels que le stress oxydatif, les radiations ionisantes, les agents cytotoxiques, le dommage à l'ADN,...



Ces complexes activent des caspases initiatrices qui vont à leur tour activer les caspases effectrices permettant l'amplification du signal. Ces dernières qui ont pour substrats des molécules vitales pour la cellule déclenchent la phase d'exécution de l'apoptose (Figure I.16). A nos jours, 400 substrats ont été identifiés pour les caspases des mammifères (Taylor et al., 2008).

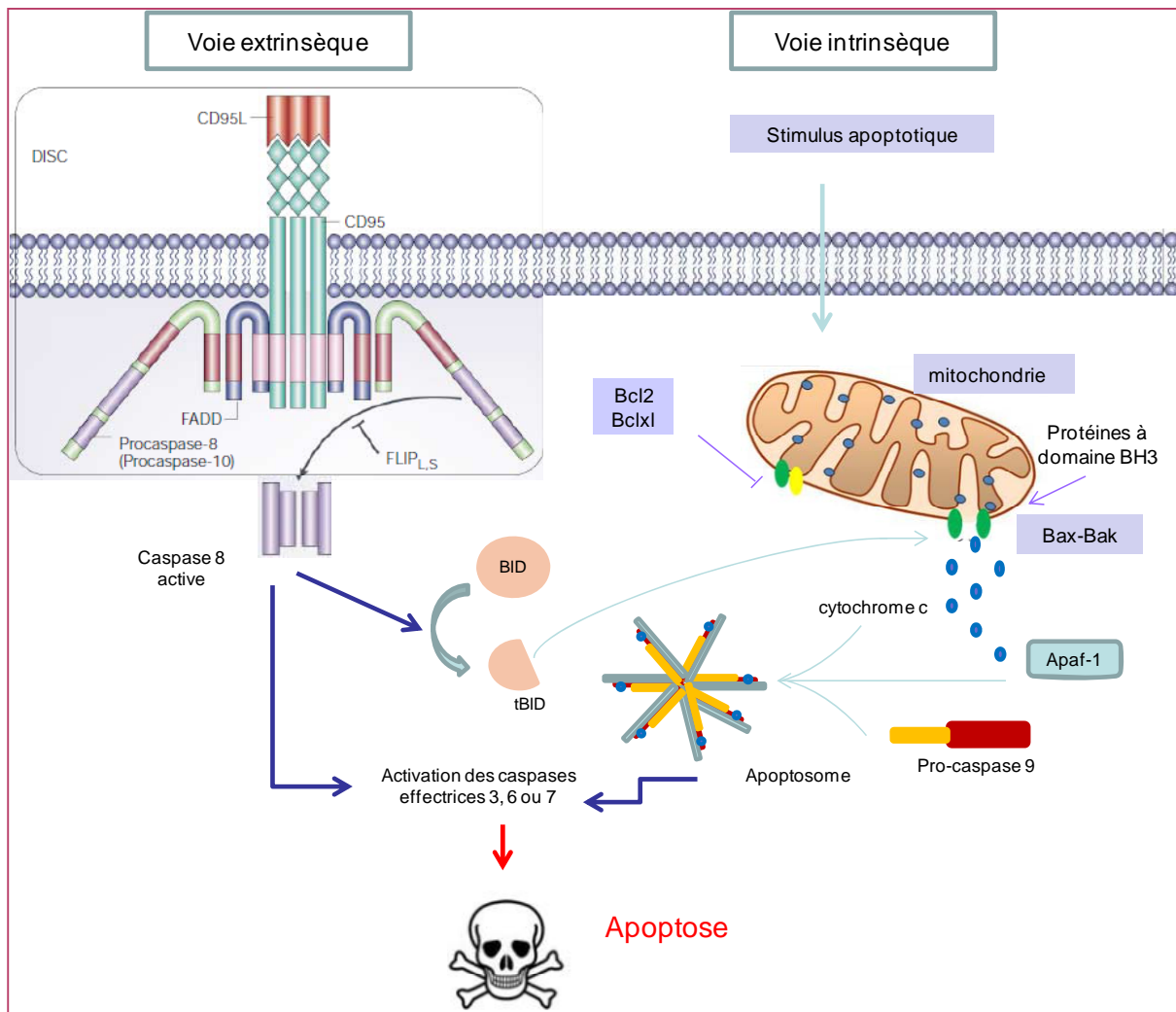
**Figure I.16. Représentation de différentes phases de l'apoptose.** (Figure adaptée d'après Igney and Kramer, 2002) (Igney and Kramer, 2002).

#### 4. LES VOIES D'INDUCTION DE L'APOPTOSE

Les voies de signalisation d'apoptose sont multiples et dépendent principalement du facteur initiateur de l'induction. Deux voies principales ont été décrites :

- La voie intrinsèque ou la voie mitochondriale, activée en réponse à des signaux affectant la mitochondrie. Cette voie active un ou plusieurs membres de la famille Bcl-2 à domaine BH3.

- La voie induite par les récepteurs membranaires de mort (les récepteurs de la famille TNF, TNFR1 ou le récepteur au ligand Fas nommé Fas/Apo-1/CD95 ou TRAIL,) aussi appelée voie extrinsèque.  
Ces deux voies convergent vers une voie commune qui implique l'activation des caspases effectrices.



**Figure I.17. Représentation schématique des deux voies apoptotiques.** La Voie extrinsèque : La liaison de ligands de mort (CD95L est utilisé ici à titre d'exemple) à leur récepteur conduit à la formation du complexe de mort le (DISC). Dans le DISC, la procaspase-8 est recrutée par FADD et est activée par clivage auto-catalytique. A ce niveau, FLIP, une protéine inhibitrice de la caspase-8 peut bloquer l'apoptose en se fixant au DISC. La voie intrinsèque : Des stimuli de chimiothérapie, d'irradiation ou autres, peuvent initier l'apoptose par la mitochondrie. Les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 par exemple, Bax, Bid, BAD et BIM sont des médiateurs importants de ces signaux. L'activation de cette voie se manifeste par la libération de cytochrome c dans le cytosol, où il se lie à la protéine (Apaf-1), ce qui permet le recrutement de la procaspase-9 pour former l'apoptosome. A ce niveau la caspase-9 est activée, qui va à son tour activer d'autres caspases tels que la caspase 3, 6 ou 7. Ces deux voies sont interconnectées. En effet, le clivage de la protéine BID membre de la famille BCL-2 par la caspase-8, active la voie mitochondriale après induction de l'apoptose par les récepteurs de mort, et peut être utilisé pour amplifier le signal apoptotique. (Figure adaptée d'après (Igney and Krammer, 2002)).



#### 4.1. LA VOIE MITOCHONDRIALE OU LA VOIE INTRINSÈQUE

La mitochondrie n'est pas seulement le centre énergétique de la cellule, elle est aussi le siège d'une voie apoptotique importante pour la survie de l'organisme. Cette voie est activée lorsque la cellule est soumise à un stress causé par des signaux d'origine intracellulaire ou extracellulaire tels que l'hypoxie, les radiations gamma ou les UVs, les molécules cytotoxiques, les agents chimiothérapeutiques etc. Le signal apoptotique est transmis au niveau de la mitochondrie et se manifeste par une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\psi_m$ ) qui s'accompagne de l'ouverture de méga-pores mitochondriaux (Goldstein et al., 2000; Susin et al., 1998) permettant la libération dans le cytosol des molécules pro-apoptotiques, localisées normalement dans l'espace inter-membranaire mitochondrial comme le cytochrome *c*, le facteur AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et la protéine Smac-Diablo (*Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor apoptosis (IAP)- Binding protein Low Pi*) (Joza et al., 2001; Olson and Kornbluth, 2001; Schafer and Kornbluth, 2006).

Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome *c* se fixe à une protéine adaptatrice cytoplasmique Apaf-1 (*Apoptosis activating factor-1*), induisant ainsi un changement conformationnel permettant de démasquer alors la région CARD (*Caspase Recruitment Domain*) ce qui permet le recrutement de la procaspase-9. Il se forme alors un complexe appelé « Apoptosome » constitué par le cytochrome *c*/Apaf-1/ATP/procaspase-9 (Cain et al., 2002; Liu et al., 1996). La procaspase 9 s'autoactive et active à son tour d'autres caspases et notamment la caspase-3 (Green and Kroemer, 2004; Schafer and Kornbluth, 2006; Taylor et al., 2008) (figure I.17).

Cette voie peut être utilisée comme une voie d'amplification du signal induit par les récepteurs de mort. Ainsi la caspase-8 clive Bid, un membre de la famille de Bcl-2 qui sera transféré au niveau de la mitochondrie et permettra d'activer l'apoptose. Les molécules de la famille Bcl-2 (*B-cell Lymphoma-2*) sont particulièrement impliquées dans cette voie intrinsèque de l'apoptose (Cory and Adams, 2002).

Les deux voies principales d'activation des caspases sont organisées selon un même schéma, avec premièrement l'activation d'une caspase initiatrice (caspase-8 ou 10, caspase-9) nécessitant la participation d'une molécule adaptatrice (FADD ou Apaf-1), conduisant dans un second temps à l'activation des caspases effectrices (surtout la caspase-3), au sein d'une cascade protéolytique.

Bien que l'activation des caspases soit probablement le mécanisme prédominant dans l'induction de l'apoptose, ce processus de mort peut également être induit de manière indépendante des caspases, par la libération des facteurs inducteurs d'apoptose tel que le facteur AIF. AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) est une flavoprotéine, localisée au niveau de l'espace intermembranaire de la mitochondrie et peut être relarguée dans le cytosol suite à un stimulus



apoptotique. Ensuite elle sera transloquée dans le noyau pour induire la fragmentation de l'ADN (Cande et al., 2002; Joza et al., 2001; Penninger and Kroemer, 2003).

#### 4.2. LA VOIE EXTRINSÈQUE OU VOIE INDUITE PAR LES RÉCEPTEURS DE MORT

Ces récepteurs sont des récepteurs membranaires appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF. Elle compte 29 membres activés via 20 ligands différents. Ces récepteurs peuvent être classés en 3 groupes : le premier groupe est caractérisé par la présence au niveau de la portion cytoplasmique des récepteurs d'une région protéique bien conservée, appelée domaine de mort DD (*Death Domain*), d'où le nom récepteurs de mort. Le deuxième groupe est caractérisé par la présence d'une ou plusieurs séquences TIM (*TRAF-interacting motifs*) au niveau de la partie cytoplasmique. L'activation de ce domaine permet le recrutement des membres de la famille TRAF (*TNFR-associated factor*) permettant l'activation des médiateurs clés de transduction du signal comme ; MAPK, JNK, ERK, NF kappa B, IKK et PI-3 kinase. Le troisième groupe compte les récepteurs dépourvus de domaine de signalisation intracellulaire fonctionnel appelés récepteurs Décoy (récepteur leurre) dont le rôle majeur semble être de moduler la concentration en ligand disponible (Mocellin et al., 2005).

TNFR1/TNFR2, CD95/Apo-1/Fas, DR4/Trail-R1, et DR5/Trail-R2 sont des récepteurs de mort, responsables de la transduction du signal apoptotique grâce à leur domaine de mort DD, d'environ 80 résidus d'acides aminés (Itoh and Nagata, 1993). La fixation du ligand, qui est un homotrimer, entraîne une trimérisation du récepteur et provoque une modification de conformation du domaine DD. Ce changement de conformation permet alors le recrutement des protéines adaptatrices pourvues de domaines DD similaires à ces derniers. La protéine FADD/Mort-1 (*Fas associated death domain protein*) pour FAS, la protéine TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*) et la kinase, RIP (*Receptor interacting protein*) s'associent à TNFR1 (Hsu et al., 1996). Une fois les protéines adaptatrices liées au récepteur, elles vont à leur tour s'associer aux caspases initiatrices (principalement la procaspase-8 et la 10) et induire leur activation par auto-clivage (Martin et al., 1998). Ce complexe multiprotéique intracellulaire a été appelé DISC pour (*Death inducing signaling complex*) (voir figure I.17). Pour le TNFR1, il a été récemment démontré que son activation implique la formation de différents complexes protéiques homologues au DISC. Une fois le DISC formé, les caspases initiatrices sont activées et déclenchent l'activation en cascade d'autres caspases effectrices, dont la caspase-3, 6 ou 9 et l'activation des endonucléases dont résultent la fragmentation du DNA et la dégradation des protéines intracellulaires caractérisant l'apoptose. Celles-ci cliveront alors d'autres protéines nécessaires à la vie (Igney and Krammer, 2002; Taylor et al., 2008).

#### 4.2.1. TNF ET LA VOIE DE SIGNALISATION TNF

TNF $\alpha$  est une protéine de 17 kDa (157 résidus d'acides aminés) qui agit comme un homotrimère. Comme tous les ligands de la famille, il est synthétisé sous forme d'un pro-peptide (pro-TNF) de 26 kDa (233 résidus d'acides aminés) lié à la membrane et relargué après un clivage par le TACE (*TNF-converting enzyme*), une métalloprotéinase, membre de la famille ADAM (*A-disintegrin-and-metalloproteinase*) (Bemelmans et al., 1996).

TNF $\alpha$  agit via deux récepteurs différents ; TNFR1 ou TNFR2. Bien que l'affinité du TNF $\alpha$  pour le TNFR2 soit cinq fois supérieure à celle pour le TNFR1, la majorité des activités biologiques du TNF $\alpha$  sont initiées via le TNFR1 (Tartaglia and Goeddel, 1992). Cette différence majeure de comportement résulte sans doute de l'absence de DD dans la structure du récepteur TNFR2. La voie de transduction du signal apoptotique médiée par TNFR1 est beaucoup plus complexe que celle de FAS ou TRAIL. En effet, en plus de son activité apoptotique, il peut aussi induire la survie (Devin et al., 2000; Natoli et al., 1997; Rath and Aggarwal, 1999).

Comme nous l'avons dit plus haut la fixation de l'homotrimère TNF à son récepteur TNFR1 induit la trimérisation de ce dernier et provoque la dissociation de la protéine inhibitrice du DD (SODD) *Silencer of death domain* (Takada et al., 2003). Cette dissociation va démasquer le domaine de mort et permettre l'association dans un premier temps de la protéine adaptatrice TRADD au récepteur TNFR1 et le recrutement des deux ubiquitines ligases TRAF2 et cIAP (*Cytoplasmic inhibitor apoptosis protein*) et de RIPK-1 (*Receptor interacting protein kinase-1*) (appelée aussi RIP1) formant ainsi le premier complexe. Le complexe I est modifié par une série d'ubiquitination par les cIAPs permettant ainsi le recrutement de la protéine IKK (*I $\kappa$ B kinase*) via NEMO/IKK $\gamma$  (*NF $\kappa$ B essential modulator*) conduisant à l'activation de NF $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*) pour promouvoir la prolifération et la survie.

Dans un délai plus long, RIPK-1 est déubiquitinée par les enzymes Cézanne et CYLD (*RIPK1K63 deubiquitinating enzyme*) (Enesa et al., 2008; Wang et al., 2008b) et le complexe TRADD RIPK-1 se détache et se retrouve dans le cytosol formant ainsi le complexe IIa. FADD est recrutée au niveau du complexe par TRADD, se lie à la procaspase-8, qui va s'auto-activer et initier une activation en cascade des caspases. Cette cascade se terminera par l'activation des endonucléases comme l'Endo G dont résultera la fragmentation du DNA, l'étape ultime de l'apoptose.

Un troisième complexe, le complexe IIb, peut être formé par une oligomérisation directe de RIPK-1 avec FADD via une interaction de domaine DD pour recruter la caspase-8 et activer ainsi la voie apoptotique (Nastiuk and Krolewski, 2008; Wang et al., 2008b) (Figure I.18).



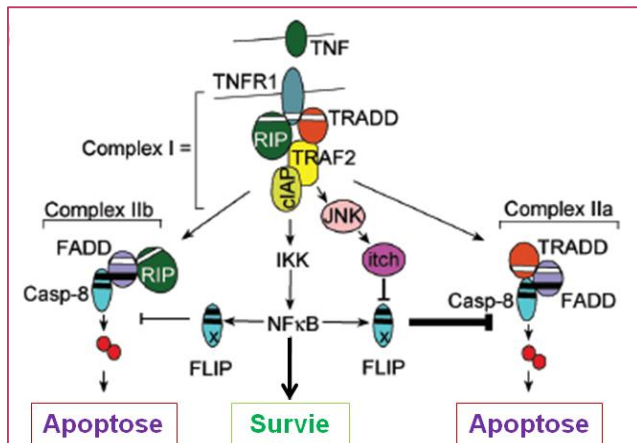


Figure 1.18. Schéma représentant la voie de signalisation par TNF $\alpha$ . Formation du complexe I, qui médie la survie via la voie NF $\kappa$ B, les complexes IIa et IIb médient l'apoptose. (Figure adaptée d'après (Nastiuk and Krolewski, 2008).

L'orientation de la voie de TNF vers une signalisation proapoptotique ou anti-apoptotique est sous le contrôle de NF $\kappa$ B et FLIP (*FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-like inhibitory protein*). Cette dernière est une protéine homologue de la caspase-8 qui est inactive et fonctionne comme un inhibiteur dominant de cette caspase. De plus, cette protéine est régulée positivement par NF $\kappa$ B (Micheau et al., 2001). Lorsque cette voie est induite, l'expression de FLIP est induite et elle maintient cette voie de survie activée en inhibant le recrutement de la caspase-8.

Il existe deux isoformes de la protéine FLIP, une forme longue FLIP<sub>L</sub> et une forme courte FLIP<sub>S</sub>, qui protègent de l'apoptose induite par plusieurs récepteurs de mort comme Fas, TNFR1, DR4 et DR5 en orientant la cellule vers une voie de survie. Ces deux isoformes contiennent deux DED qui permettent leur liaison aux caspases 8 ou 10, empêchant ainsi leur activation au niveau du DISC. La forme longue, FLIP<sub>L</sub>, possède, en plus des deux DEDs, l'équivalent d'un domaine caspase inactif. Il peut ainsi former un hétérodimère avec la caspase-8 et induire son activation partielle. L'hétérodimère peut ainsi recruter les protéines adaptatrices TRAF-2 et RIPK-1 et induire l'activation de NF $\kappa$ B (Budd et al., 2006).

## 5. LA FAMILLE DES CASPASES

Les caspases sont des protéases activées de manière spécifique au cours de l'apoptose. Ces protéases sont responsables de la plupart des modifications biochimiques et morphologiques communes à toutes les voies apoptotiques et dans tous les types cellulaires. Ces protéines ne sont pas seulement des enzymes protéolytiques mais également des molécules de signalisation importantes.

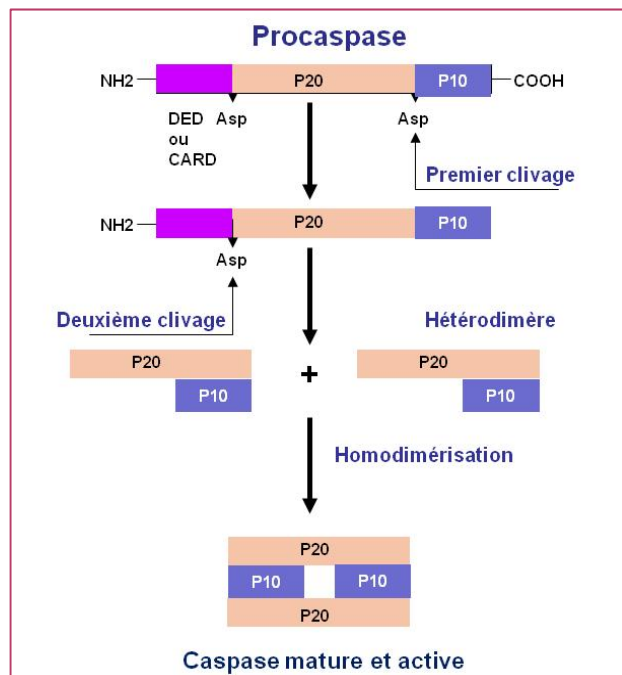
Ces protéases dont le site actif comporte un résidu cystéinyle clivent leurs substrats de manière spécifique après un résidu aspartique, d'où le nom caspases pour "*CysteinyI aspartate specific protease*". Les caspases sont présentes dans le cytoplasme sous forme de procaspases inactives ou zymogènes et elles sont activées par clivage (Alnemri et al., 1996; Thornberry, 1998).

Les caspases sont toutes constituées d'un domaine N-terminal de longueur variable de 23 à 219 résidus, suivi d'un domaine de 17 à 21 kDa (P20) qui après clivage formera la grande sous unité, et d'un domaine C-terminale de 10 à 14 kDa (P10) qui constituera la petite sous unité (Amarante-Mendes and Green, 1999).

La première protéase à cystéine identifiée chez les mammifères ICE (*Interleukin-1 $\beta$  processing enzyme*), caspase-1 est homologue à CED-3 de *C.elegans* (Miura et al., 1993). A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Elles sont classées en deux familles: les caspases apparentées à la caspase-1 (caspases 1, 4, 5 et 13) intervenant dans le processus inflammatoire et les caspases apparentées à la caspase-3 (caspases 3, 6-10) jouent un rôle essentiel dans l'apoptose (Taylor et al., 2008). Parmi ces dernières, on trouve les caspases initiatrices et effectrices qui sont caractérisées par la présence de domaines DED et CRAD impliqués dans l'activation des caspases par interactions protéine-protéine. La caspase-12, quant à elle, appartient à la famille des caspases inflammatoires. Elle a été impliquée dans l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique (Nhan et al., 2006).

### 5.1. ACTIVATION DES CASPASES

L'activation des pro-caspases en caspases actives passe par un clivage protéolytique au niveau de deux sites consensus contenant un résidu Aspartyle. Le clivage entre les deux sous-unités et le clivage du pro-domaine N-terminal permet de libérer les deux sous-unités. Ensuite, il se forme un tétramère (homodimère d'hétérodimères) par auto-association de deux grandes et deux petites sous-unités provenant de deux procaspases (Amarante-Mendes and Green, 1999). Le pro-domaine NH<sub>2</sub>-terminale de longueur variable à ses extrémités joue un rôle dans l'interaction protéine protéine et est impliquée dans la régulation de l'activité des caspases (Figure I.19).



**Figure I.19. Mécanisme d'activation des caspases.** Les structures des procaspases initiatrices et effectrices sont représentées, le pro-domaine en mauve, la petite sous-unité en bleu et la grande sous-unité en rose. La caspase active est un tétramère de deux petites et deux grandes sous-unités (d'après Amarante-Mendes and Green, 1999).

Les caspases initiatrices constituées de pro-domaines longs (caspases 2, 8, 9, et 10) contiennent des séquences spécifiques d'interaction protéine-protéine tel que le domaine CARD (*caspase recruitment domain*) ou le domaine DED (*Death effector domain*).



Ces domaines permettent leur recrutement par des protéines adaptatrices au niveau de complexes d'initiation de l'apoptose. Une propriété importante de ces pro-caspases initiatrices est leur capacité de s'autoactiver et/ou d'être activées par d'autres caspases, ce qui permet d'enclencher une cascade d'activation.

Les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) possèdent un pro-domaine plus court (10 à 40 résidus), incapable d'initier leur oligomérisation et leur activation. Elles sont activées par clivage protéolytique par les caspases initiatrices, ce qui aboutit à une activation en cascade permettant la régulation et l'amplification du signal apoptotique. Une fois activées, les caspases effectrices clivent à leur tour des protéines substrats à l'origine de la plupart des événements biochimiques, ou morphologiques de l'apoptose (Thornberry, 1998).

Cette cascade d'activation en chaîne est à la base du processus conduisant à la mort cellulaire qui peut-être initiée de par le DISC, impliquant les caspases 8 et 10 pour la voie des récepteurs de mort ou par l'apoptosome impliquant la caspase-9 pour la voie mitochondriale.

## 6. RÉGULATION DE L'APOPTOSE

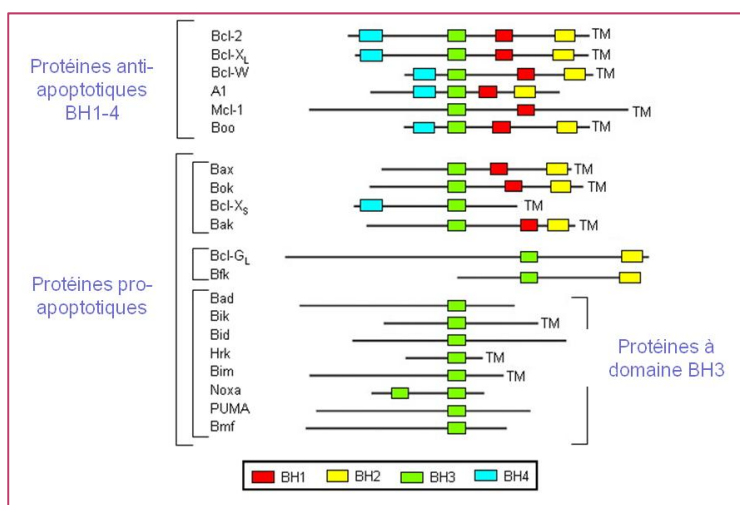
Les caspases sont au cœur des régulations exercées sur les mécanismes apoptotiques. Les caspases ne sont pas seulement des enzymes mais aussi des phosphoprotéines dont l'activité enzymatique est régulée par différentes protéines kinases et phosphatases (Alvarado-Kristensson and Andersson, 2005). Il a bien été démontré que la phosphorylation des caspases ou de leurs zymogènes était un mécanisme clé de leur activité enzymatique (Brady et al., 2005; Kurokawa and Kornbluth, 2009; Martin et al., 2005).

Les caspases peuvent aussi être régulées par des mécanismes intracellulaires comme l'activité redox de la cellule ou par des interactions protéine-protéine, comme nous l'avons déjà évoqué pour les interactions entre les domaines DED et CARD et les protéines adaptatrices FADD lors de l'activation de certaines procaspases.

Enfin, les changements de localisation cellulaire de différentes caspases constituent aussi un mode important de régulation de l'activité de ces enzymes. Les caspases 2, 9, 3 et 8 sont localisées dans l'espace intermembranaire mitochondrial et ne sont libérées dans le cytoplasme et transformées en caspases actives qu'en présence d'un signal de mort.

Au final, l'ensemble de ces régulations contribuent à un contrôle strict de l'apoptose. Pour plus de détails concernant celles-ci, nous renverrons le lecteur à quelques revues dont celles de (Hengartner, 2000), (Kurokawa and Kornbluth, 2009) et (Chang and Yang, 2000).

Les protéines de la famille Bcl-2 (plus de 20 membres) jouent des rôles importants dans la régulation de l'apoptose en contrôlant la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie et l'activation de la caspase-9 (Chipuk et al., 2008; Chipuk and Green, 2008; Gross, 2001). Certaines protéines sont pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-Xs, Krk, Mtd, Nip3, Nix, Bcl-B) alors que d'autres (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1/Bfl-1, Bcl-W et Bcl-G) sont anti-apoptotiques. Leurs rôles régulateurs semblent se focaliser principalement sur la formation de l'apoptosome (Gross et al., 1999; Iannolo et al., 2008). Les membres de la famille Bcl-2 présentent des faibles homologies dans leurs séquences de base. Par contre, elles se caractérisent par la répartition des domaines de forte homologie (domaine BH) BH1 à BH4, essentielles pour les interactions entre les protéines (Yin et al., 1994) (voir figure I.20).



**Figure I.20. Structure des protéines de la famille Bcl-2.** La famille Bcl-2 comprend trois sous-familles qui contiennent entre un et quatre domaines d'homologie (BH). La sous-famille anti-apoptotique comprend des protéines qui contiennent les quatre domaines BH1 à BH4. La plupart des membres de cette sous-famille contiennent également des domaines transmembranaires (TM) et ils sont donc généralement associés aux membranes. Les membres de la sous-famille pro-apoptotique apparentées à BAX n'ont pas de domaines BH4 et ils favorisent l'apoptose en formant des pores dans les membranes mitochondriales externes. La sous-famille à domaine BH3 est un groupe

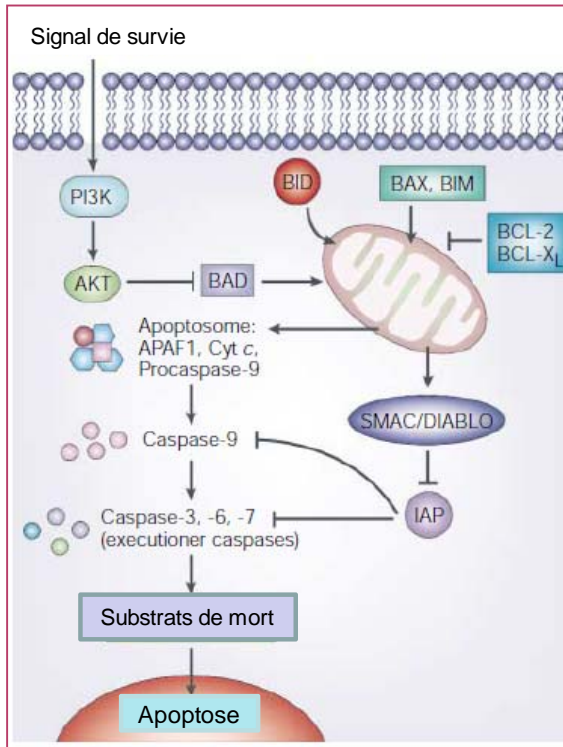
de protéines qui affiche uniquement le motif d'homologie BH3. Cette dernière comprend actuellement huit membres (BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA et HRK), qui activent toutes, l'apoptose lorsqu'elles sont surexprimées.

Ces protéines agissent sur l'apoptose de différentes manières ; par interaction protéine protéine, par dimérisation ou par interaction avec des caspases, par translocation, par clivage comme pour Bid ou par phosphorylation comme pour Bad (Datta et al., 2000; Gross et al., 1999; Hengartner, 2000; Zha et al., 1996).

D'autres protéines sont inhibitrices de l'apoptose comme celles de la famille IAP (*Inhibitor Apoptosis Protein*) (Liston et al., 2003). Elles agissent en interagissant avec certaines pro-caspases en les maintenant à l'état inactif (Goyal, 2001). Leur présence dans les cellules cancéreuses prostatiques semble être corrélée à l'émergence dans ces tumeurs de phénotypes résistants à la castration. Les protéines IAPs sont régulées par les protéines SMAC/DIABOLO (Du et al., 2000). L'apoptose peut être inhibée par divers signaux de survie via des facteurs de croissance ou des cytokines qui activent la voie Akt, via la phosphorylation de la PI3-kinase. Akt, à son tour phosphoryle et inactive Bad, un facteur apoptotique, membre de la famille Bcl-2 (Zhou et al., 2000) (figure I.21).



Cette voie est une voie de résistance majeure impliquée dans la progression du cancer prostatique à des stades réfractaires, résistants à la castration (voir paragraphe 2.2 dans le chapitre 1. La prostate).



**Figure 1.21. La voie mitochondriale et régulation de l'apoptose.** BAX, BIM, BID, BAD sont des protéines apoptotiques de la famille BCL-2, sont des médiateurs importants de cette voie. L'apoptose peut être inhibée à différents niveaux ; Les protéines anti-apoptotiques tels que les membres de la famille BCL-2 comme BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub>, ou les protéines inhibitrices de l'apoptose, les IAPs, régulées par SMAC/DIABOLO. L'apoptose peut être aussi bloquée par des signaux de survie via des facteurs de croissance ou des cytokines qui activent la voie Akt. Le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) active AKT, qui phosphoryle et inactive la protéine pro-apoptotique BAD, membre de la famille BCL-2. (D'après (Igney and Krammer, 2002)).

La voie Akt peut également médier la survie par l'induction transcriptionnelle des gènes impliqués dans la survie cellulaire, via l'activation de NFκB par la phosphorylation d'IKK (Kane et al., 1999), et l'inactivation de GSK3 (*Glycogen synthase kinase-3*) (Cross et al., 1995) ou par l'inhibition de la transcription des facteurs pro-apoptotiques comme Fas-L via la phosphorylation et la séquestration de facteurs de transcription comme Forkhead, membre de la famille FOXO (FKHRL1/FOXO3a) (*Forkhead box, group O*) (Cantley, 2002).

NFκB est un facteur de transcription séquestré dans le cytoplasme par IκB. La phosphorylation de ce dernier par IKK (activée par Akt), permet son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, ce qui permet la libération de NFκB. Celui-ci transloqué ensuite dans le noyau, active la transcription des gènes de survie tels que BCL-X<sub>L</sub>, des inhibiteurs des caspases (IAPs) et des facteurs TRAFs (Chu et al., 1997; Wang et al., 1998).

D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de l'apoptose ; le système d'ubiquitination par le protéasome et la protéine p53. Ce dernier est un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation du DNA et l'apoptose. Pour plus d'informations on renvoie le lecteur aux revues suivantes (Ghobrial et al., 2005; Igney and Krammer, 2002).



## 7. L'APOPTOSE PROSTATIQUE

L'homéostasie cellulaire de la glande prostatique est maintenue grâce à un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Celui-ci est principalement assuré par l'action des androgènes sur l'épithélium glandulaire (Berges et al., 1995). La privation d'androgènes par castration chimique ou chirurgicale, induit une régression rapide et importante de la prostate. Chez le rat, la glande perd près de 80% de son poids initial dans les sept jours qui suivent l'opération (Kyprianou and Isaacs, 1988a). Cette régression spectaculaire résulte d'un arrêt de la prolifération cellulaire conjugué à l'activation du processus d'apoptose. Si les trois lobes de l'organe semblent indistinctement touchés par cette atrophie, celle-ci est cependant plus rapide dans la prostate ventrale que dans les lobes dorsaux et latéraux (Banerjee et al., 1995). L'apoptose touche principalement les cellules épithéliales sécrétoires et intermédiaires et à moindre degré les cellules du stroma fibromusculaire (Rouleau et al., 1990).

L'apoptose prostatique est caractérisée par une diminution de production de polyamines et une augmentation de la concentration des ions calcium intracellulaire. Celles-ci s'accompagnent d'un accroissement de l'activité d'endonucléase  $Ca^{2+}$ -dépendante responsable de l'hydrolyse de l'ADN dans la prostate (English et al., 1989; Isaacs et al., 1992; Kyprianou et al., 1988). La surexpression et l'activation de plusieurs protéases extracellulaires responsables de la dégradation de différents composants de la matrice extracellulaire ont été observés (Guenette et al., 1994).

Le modèle de la prostate de rat castré est un modèle qui a permis d'identifier certaines voies de signalisation qui contrôlent la prolifération et l'apoptose de la prostate normale ou néoplasique. En effet, le rôle paracrine de TGF $\beta$  et l'importance des interactions stroma/épithélium dans le contrôle de ce processus ont été mis en évidence grâce à ce modèle. Suite à la castration, une surexpression des récepteurs pour le TGF $\beta$  de type I et II par les cellules épithéliales ainsi qu'une sécrétion accrue du TGF $\beta$ 1, par les cellules stromales qui sont quant à elles totalement dépourvues de récepteurs pour ce facteur, ont été observées (Desai and Kondaiah, 2000; Kim et al., 1996a; Nemeth et al., 1997). Il a aussi été démontré que le TGF $\beta$ 1 induit l'apoptose de cellules épithéliales prostatiques quand il est présent dans le milieu de ces cellules mises en culture (Ilio et al., 1995).

TGF $\beta$  a été considéré comme un régulateur de la croissance de la prostate normale grâce à sa capacité simultanée d'inhiber la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules prostatiques à des concentrations physiologiques en androgènes (Kyprianou and Isaacs, 1988a, b). Parallèlement, lors de la progression du cancer prostatique, une perte d'expression des récepteurs RI et II de TGF $\beta$  a été observée, ce qui suggère qu'une perte de signal proapoptotique facilite la progression tumorale (Kim et al., 1998; Kim et al., 1996b; Williams et al., 1996).



TGF $\beta$  inhibe la prolifération par inhibition de la transcription du proto-oncogène *cmyc* et par le maintien de la protéine Rb (*Retinoblastoma*) à son état non phosphorylé. Dans la prostate, elle médie ses effets de manière Smad dépendante. En effet, le niveau d'expression de ces protéines est en corrélation avec l'apoptose induite par castration et il est réduit dans les cellules cancéreuses prostatiques qui sont résistantes à l'apoptose (Brodin et al., 1999). TGF $\beta$  active l'apoptose en permettant le recrutement et l'activation au niveau des récepteurs, de plusieurs médiateurs intracellulaires appelés Smad (*SMAD anchor for receptor activation*) (Landstrom et al., 2000). La liaison de TGF $\beta$  aux récepteurs TGFRI et RII, active le domaine serine thréonine kinase qui activera la phosphorylation de Smad 2 et 3, pour former un complexe avec Smad4. Une fois activées, ces protéines migrent dans le noyau où elles se fixent sur les éléments de réponses spécifiques présents sur différents promoteurs de gènes cibles, dont elles contribuent à réguler la transcription.

Différentes études ont montré l'implication de la cascade des caspases dans l'exécution de l'apoptose prostatique en réponse à divers stimulus (Bowen et al., 1999; Guo and Kyprianou, 1999; Marcelli et al., 1999). Dans ce contexte, il a été notamment démontré que TGF $\beta$  induit l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate par la surexpression de la caspase-1 (Bello-DeOcampo and Tindall, 2003; Guo and Kyprianou, 1999; Zhu and Kyprianou, 2005).

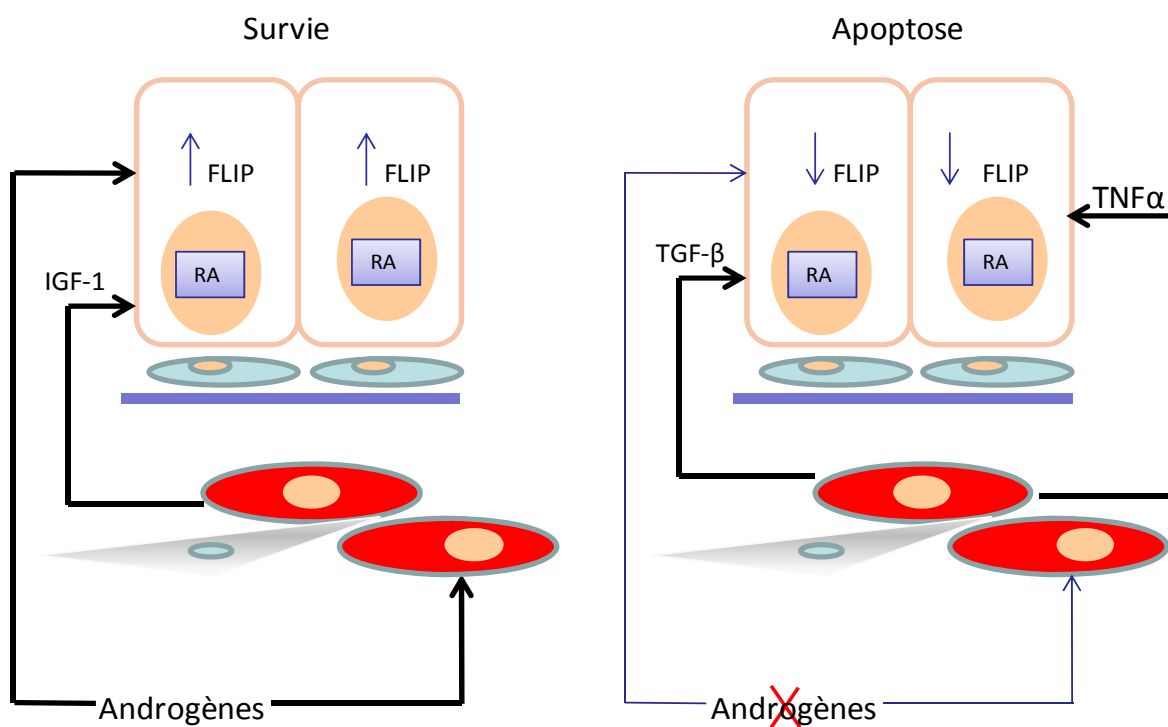
Un autre facteur stromal impliqué dans la croissance et l'homéostasie de la prostate, IGF1, voit son niveau d'expression diminué après castration. Cette diminution est accompagnée d'une surexpression des protéines vectrices des IGFs (*insulin-like growth factor*) (IGFBP-3 et IGFBP-5) (Ohlson et al., 2006). Ces protéines de liaison sont connues pour limiter la disponibilité des IGFs vis-à-vis des cellules épithéliales et inhiber ainsi leur prolifération. Ces protéines vectrices, en se liant à des molécules associées à la membrane plasmique, pourraient induire l'apoptose, et ce indépendamment de la présence de l'IGF et de leurs récepteurs. L'IGF-1, produit par cellules stromales en réponse aux androgènes, potentialise la survie des cellules épithéliales de la prostate par l'intermédiaire de la voie de signalisation Akt. L'ablation des androgènes entraîne une réduction de l'IGF-1, favorisant ainsi l'apoptose (Ohlson et al., 2007).

La castration provoque aussi l'activation des voies extrinsèques de l'apoptose impliquant les récepteurs de mort. Ces voies sont également activées au cours de l'acquisition de l'androgéno-indépendance des cellules prostatiques privées d'androgènes (de la Taille et al., 1999). Ces récepteurs de mort (TNF, Fas, TRAIL) peuvent induire l'apoptose dans les cellules épithéliales prostatiques (Chopra et al., 2004; Hedlund et al., 1998; Nesterov et al., 2002). Ces derniers agissent par formation de complexes contenant FADD qui active la caspase-8 qui par la suite active et clive la caspase-3, 6 ou 7 (Martin et al., 1998). Quant à la protéine FLIP, un dominant négatif de la caspase-8, ses taux de mRNA et de protéines diminuent dans la prostate ventrale suite à la castration (Cornforth et al., 2008; Nastiuk et al., 2003). Ceci suggère l'implication des

récepteurs de mort dans ce processus. Tout comme l'observation récente qui démontre que TGF $\beta$  médie son action paracrine lors de l'apoptose induite par privation d'androgène, par la diminution de la production de FLIP, dans les cellules épithéliales de la lignée cellulaire prostatique DU145 (Yoo et al., 2009).

Très récemment, il a été démontré que TNF $\alpha$  est nécessaire pour induire l'apoptose par castration dans la prostate de souris. En effet, chez les souris KO pour le TNF $\alpha$  ou pour son récepteur TNFR1 montre une réduction significative de la régression de l'organe par castration, contrairement aux souris KO pour TRAIL ou pour FAS. De plus, le blocage des récepteurs TNF par injection de TNF $\alpha$  inhibe l'induction de la mort cellulaire programmée par castration chez la souris normale (Davis et al., 2011).

Au vue de l'ensemble des résultats récents, il paraît légitime de conclure que le TGF $\beta$  agit en bloquant l'expression de FLIP, ce qui permettra l'activation de la voie apoptotique de TNF $\alpha$  (figure I.22).



**Figure I.22. Résumé de l'apoptose prostatique induite par privation d'androgènes.** Dans les cellules sécrétrices, les androgènes maintiennent des niveaux relativement élevés de FLIP garantissant la survie des cellules à des faibles concentrations de facteur de croissance tel que l'IGF1 (à gauche). Lorsque les androgènes sont supprimés (à droite), les niveaux de FLIP sont régulés à la baisse à la fois par l'action paracrine de TGF $\beta$  (qui augmente dans la prostate castrée) et le manque des androgènes. Le retrait des androgènes peut également induire une augmentation des ligands de mort, par voie autocrine ou paracrine (Fas, TRAIL ou TNF). Un niveau faible de FLIP et une surexpression de ligands et des récepteurs de mort vont ainsi induire l'apoptose des cellules épithéliales sécrétrices.

La castration induit également l'expression des protéines régulatrices de l'apoptose tels que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, régulées par les androgènes. Le rapport Bax/Bcl-2 augmente et atteint un maximum au troisième jour après castration, ce qui correspond avec une apoptose maximale au sein de la prostate. Ce rapport détermine le potentiel apoptotique de la cellule (Perlman et al., 1999). L'expression de la protéine Bcl-2 diminue après le deuxième jour de la castration au sein de la prostate ventrale de rat mais elle augmente de manière significative dès le septième jour. Par contre l'expression de Bax augmente au premier jour puis elle diminue progressivement à partir du 2-4<sup>ème</sup> jour jusqu'à atteindre un niveau indétectable au 7-10<sup>ème</sup> jour après castration. Les niveaux relativement élevés de Bcl-2 dans la prostate dorsale et latérale des rats intacts et dans la prostate ventrale 7 à 10 jours après castration servent à protéger les cellules de l'apoptose comme l'a proposé Banerjee (Banerjee et al., 2002).

Après castration, les protéines du choc thermique hsp 70, 90 et 27 voient également leur niveau d'expression augmenté (Buttyn et al., 1988; Colombel et al., 1992; Montpetit et al., 1986). Ces molécules chaperonnes ont parfois été considérées comme des protéines anti-apoptotiques. Leur action anti-apoptotique se situe au niveau de l'apoptosome. La Hsp70 et la Hsp90 peuvent interagir avec Apaf-1 et empêcher le recrutement de la procaspase-9 par Apaf-1 et bloquer ainsi l'apoptose (Beere et al., 2000; Pandey et al., 2000). La Hsp 27, quant à elle, bloque la formation de l'apoptosome par son interaction avec le cytochrome c cytoplasmique, prévenant ainsi la fixation de celui-ci au niveau d'Apaf-1, ce qui empêche l'activation de la procaspase-9 (Bruey et al., 2000).

Comme l'apoptose est le principal mécanisme de mort cellulaire impliqué dans la réponse au traitement anti-androgénique appliqué dans le cancer de la prostate, de nombreux travaux ont été réalisés dans la prostate normale en régression. L'objectif principal de ces travaux était d'identifier les molécules responsables de l'apoptose massive des cellules différenciées de l'épithélium prostatique et d'en définir les voies de régulation. En effet, une meilleure compréhension de l'apoptose prostatique dans le tissu sain doit permettre le développement des thérapies mieux ciblées et plus efficaces du cancer.

La clusterine a été identifiée pour la première fois dans la prostate ventrale de rat après castration et appelée TRPM-2 (*Testosterone-repressed prostate message-2*) (Montpetit et al., 1986). Elle constitue la protéine dont le niveau d'expression est le plus augmenté dans la prostate après privation d'androgènes (Lee and Sensibar, 1987; Sensibar et al., 1990). Outre la prostate, cette protéine ubiquiste est aussi surexprimée dans plusieurs modèles de régression d'organe tels que la glande mammaire, le cerveau, la rétine, l'utérus et le rein (Ahuja et al., 1994; Iwata et al., 2005; Tenniswood et al., 1992). Le chapitre suivant lui est consacré.

# CHAPITRE 3. LA CLUSTERINE

## 1. INTRODUCTION

La clusterine est une glycoprotéine hautement conservée, exprimée de manière ubiquiste et sécrétée dans la plupart des fluides physiologiques : le plasma, l'urine, la salive, le lait, le liquide séminal et le liquide cébrospinal (Aronow et al., 1993).

La clusterine a été isolée pour la première fois en 1983, par Fritz, à partir du fluide testiculaire de bélier. Elle a été décrite comme une glycoprotéine de masse moléculaire de 80 kDa et de point isoélectrique de 3.6 (Blaschuk et al., 1983; Fritz et al., 1983). Dans des conditions réductrices, elle se dissocie en deux sous unités de 40 kDa. Comme cette glycoprotéine favorisait l'agrégation cellulaire des cellules de sertoli et des globules rouges *in vitro*, on lui a donné le nom de clusterine (Blaschuk et al., 1983; Blaschuk and Fritz, 1984). Depuis lors, plusieurs formes homologues de la protéine ont été purifiées et les gènes correspondants ont été clonés. De ce fait, elle a été baptisée par des noms multiples, ce qui reflète la complexité de cette protéine (voir tableau I.2, d'après (Rosenberg and Silkensen, 1995)).

Nom	Source	Espèce	Fonction	Références
Clusterine	Fluide testiculaire	Bélier	Reproduction	(Blaschuk et al., 1983)
GpIII	Médullosurrénale	Bovin	Granules de chromaffines	(Fischer-Colbrie et al., 1984)
TRPM-2	Prostate	Rat	Apoptose	(Leger et al., 1987)
Gp80	Rein	Chien	Sécrétion	(Hartmann et al., 1991)
SGP2	Testicules	Rat	Reproduction	(Bettuzzi et al., 1989)
T64	Cellules neurorétinales	Caille	Transformation	(Michel et al., 1989)
SP-40, 40	Sérum	Homme	Régulation du complément	(Kirszbaum et al., 1989)
CLI	Sérum	Homme	Régulation du complément	(Jenne and Tschopp, 1989)
ApoJ	Sang	Homme	Transport des lipides	(de Silva et al., 1990)
pADHC-9	Cerveau	Homme	Maladie d'Alzheimer	(May et al., 1989)
pTB-16	Cerveau	Homme	Gliome et foyer épileptiques	(Danik et al., 1991)

**Tableau I.2. Liste des protéines homologues à la clusterine.** Homologues de la clusterine isolés par différents groupes et dans différents tissus d'après (Rosenberg and Silkensen, 1995), différents noms ont été attribués au même gène et protéine.



Chez l'homme, la CLU a été identifiée pour la première fois par Jenne et Tschopp sous le nom de *Cytolysis Inhibitor* (CLI) (Jenne and Tschopp, 1989), une protéine qui à l'époque avait une grande homologie de séquence d'acides aminés avec la *Sulfated glycoprotein 2* (SGP-2) de rat. Cette dernière constitue la glycoprotéine la plus abondante produite par les cellules de Sertoli de rat et joue un rôle important dans la maturation des spermatozoïdes (Collard and Griswold, 1987). Dans la prostate ventrale de rat, l'ARNm de la CLU a été identifié comme le produit d'un gène réprimé par la testostérone (TRPM-2) (Montpetit et al., 1986). Après clonage du cDNA complet et séquençage par Bettuzzi (Bettuzzi et al., 1989), la comparaison des séquences a permis de confirmer que le TRPM-2 est identique à la SGP2, qui elle-même est identique à la clusterine comme l'avait montré Cheng *et al.* (Cheng et al., 1988).

La clusterine a été associée à des phénomènes physiologiques tels que les interactions cellule-cellule ou cellule-substrat, la sécrétion, la maturation du sperme, la régulation du complément, la survie ou la mort cellulaire et le transport des lipides. Elle est aussi impliquée dans différents processus pathologiques comme la neurodégénérescence (la maladie d'Alzheimer), dans l'inflammation, les maladies auto-immunes, dans la plupart des cancers comme le cancer de la prostate (Miyake et al., 2004; Miyake et al., 2000c; Zellweger et al., 2002), du colon (Pucci et al., 2004), de la vessie (Miyake et al., 2001), du sein (Leskov et al., 2003) et des poumons (July et al., 2004), et dans différents modèles d'apoptose de tissus en régression comme la prostate après privation d'androgènes (Lee and Sensibar, 1987; Sensibar et al., 1993).

## 2. FONCTIONS DE LA CLUSTERINE

Bien que la clusterine ait été clonée depuis 30 ans, sa fonction exacte est encore une énigme. Elle a été impliquée dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques. Cependant, l'inactivation génique de la clusterine chez la souris est bien tolérée. Les souris (CLUKO) se développent et vivent normalement (McLaughlin et al., 2000).

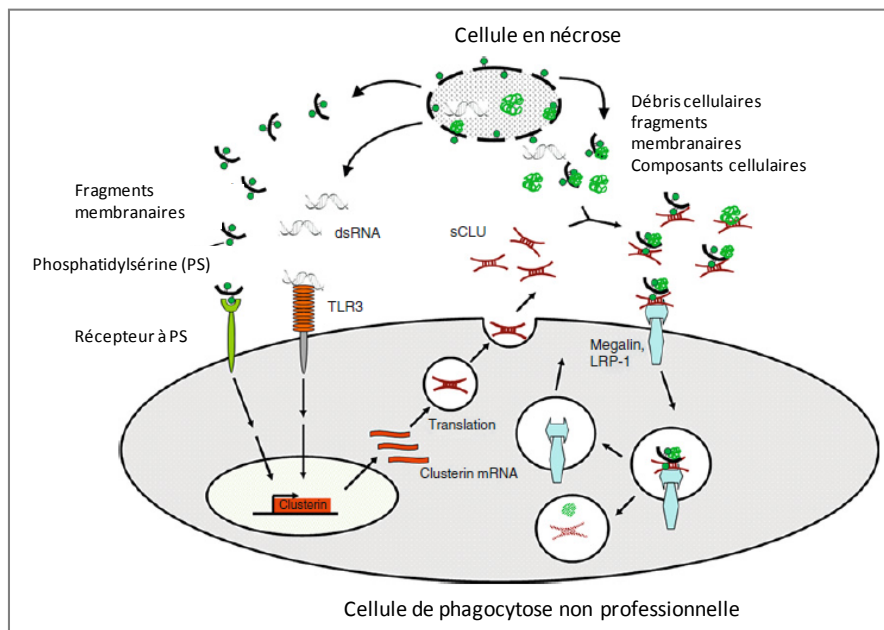
### 2.1. LA CLUSTERINE EST UNE CHAPERONNE EXTRACELLULAIRE

Du fait de sa capacité d'interagir avec différentes protéines, la clusterine a été considérée comme une protéine chaperonne (Humphreys et al., 1999; Poon et al., 2000; Wilson and Easterbrook-Smith, 2000). Elle est induite dans des conditions de stress comme le choc thermique. Cette régulation est sous le contrôle du facteur transcriptionnel HSF1 (Heat shock factor 1), qui reconnaît spécifiquement une région hautement conservée dans le promoteur de la clusterine. Dans les cellules où on a introduit un anti-sens pour la clusterine, celles-ci sont moins résistantes aux chocs thermiques ou oxydants (Viard et al., 1999). Dans des conditions physiologiques, la clusterine permettrait donc de stabiliser les protéines mal repliées sans pour autant participer à leur repliement, comme les protéines chaperonnes classiques (Wilson and

Easterbrook-Smith, 2000). Il a été démontré que dans des conditions de stress, la clusterine peut interagir avec des protéines mal foldées en formant des agrégats hétérogènes et en évitant leurs précipitations. Au niveau des sites d'inflammation la clusterine inhibe l'agrégation et l'accumulation de dépôts protéiques toxiques insolubles (Humphreys et al., 1999).

Cette fonction est d'une grande importance physiopathologique, elle permet en effet de diminuer la progression et la sévérité des pathologies où il y a formation d'agrégats protéiques, comme dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'ischémie cardiaque ou l'infarctus cérébrale (Krijnen et al., 2005; McLaughlin et al., 2000). Dans la maladie d'Alzheimer, La clusterine contribue à la protection des neurones vis-à-vis de la toxicité des dépôts amyloïdes en interagissant avec ceux-ci et en permettant leurs endocytose via la mégaline (Wilson et al., 2008). La forme sécrétée de la clusterine inhibe *in vitro* l'agrégation des peptides amyloïdes  $\beta$  (A $\beta$ ) (Matsubara et al., 1995; Oda et al., 1995). Il a été également démontré que la clusterine à une concentration de 100 $\mu$ g/ml, équivalente à celle du plasma, est capable de diminuer de 90% la formation de complexes neurotoxiques avec le prion responsable de l'encéphalopathie spongiforme (BSE) (*Bovine spongiform encephalopathy*) (McHattie and Edington, 1999).

La clusterine se lie à la mégaline ou gp330, avec une grande affinité. Une fois fixée, l'ensemble est internalisé par endocytose. Il s'en suit la dégradation de la clusterine et des molécules auxquelles celle-ci est fixée (protéine mal foldée, complexe d'attaque du complément, etc.). Ce mécanisme pourrait expliquer l'action anti-inflammatoire citée par certains auteurs qui n'excluent pas que le couple gp330-clusterine ait une action intracellulaire propre (Kounnas et al., 1995a). De manière intéressante il a été démontré que les débris cellulaires d'origine nécrotique ou apoptotique peuvent induire l'expression de la CLU (Bach et al., 2001). La clusterine joue un rôle important dans l'homéostasie en permettant à des cellules non immunitaires, comme les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les fibroblastes, la phagocytose des cellules mortes et les débris cellulaires (figure I.23) (Klock et al., 2009). En effet, l'inactivation du gène de la CLU chez la souris KO résulte en l'altération de l'élimination des cellules mortes du système reproducteur (Bailey et al., 2002).



**Figure I.23. Représentation schématique d'un modèle qui montre le rôle de sCLU face à l'apoptose et à la nécrose.** Les corps apoptotiques, les cellules nécrotiques les phosphatidyl sérines (PS) et les doubles brins d'ARN (dsARN) induisent l'expression de la sCLU, qui lie les débris cellulaires et les dirige vers la mégaline qui permet l'internalisation du complexe suivie par sa dégradation et le recyclage du récepteur (d'après (Klock et al., 2009)).

## 2.2. LA REPRODUCTION

La clusterine a été isolée à partir du liquide testiculaire et elle a été décrite comme une protéine qui permet l'agrégation des cellules de Sertoli (Blaschuk et al., 1983; Fritz et al., 1983). Elle a été trouvée dans le plasma humain, où sa concentration moyenne est de 50 à 100 µg/ml mais elle est 10 fois supérieure dans le liquide séminal humain (Jenne et al., 1991; Murphy et al., 1988). C'est d'ailleurs en raison de son abondance dans le fluide séminal et de son association à l'acrosome et au niveau de la queue des spermatozoïdes matures qu'on lui a attribué un rôle important dans la spermatogenèse et la fertilité masculine (Sylvester et al., 1991; Sylvester et al., 1984). Cependant, les souris invalidées pour la clusterine (CluKO) présentent une fertilité normale mais une spermatogenèse perturbée dans ses stades terminaux (McLaughlin et al., 2000).

## 2.3. L'INHIBITION DU COMPLEXE D'ATTAQUE DU SYSTÈME DU COMPLÉMENT

Le complément se compose de ± 30 protéines sériques et membranaires, impliquées dans la défense cellulaire, mais aussi dans les maladies auto-immunes. Le complément est impliqué dans l'élimination des complexes immuns, dans l'activation de la présentation d'antigène, dans l'activation des cellules B, dans la génération des peptides qui sont impliqués dans la vasodilatation, dans la phagocytose, l'adhésion et le chémotaxisme, dans la régulation de sa propre action et dans la signalisation de la réponse immunitaire (Carroll, 2004).



C'est un système complexe d'activation de protéines en cascade. Cette cascade est contrôlée par des inhibiteurs enzymatiques qui sont présents à chaque étape. La clusterine (sCLU) fait partie de ces inhibiteurs. Elle a été considérée comme une composante du système du complément humain du fait de sa présence dans le complexe de la protéine S avec la variante soluble de C5b-9 (Murphy et al., 1988). La clusterine dénommée à cette occasion *Complement Lysis Inhibitor* (CLI), agit comme un point de contrôle dans la cascade du complément. Elle peut se lier spécifiquement à C5b-8 et C5b-9 ainsi que sur C5b-7 et peut inhiber la formation du complexe C9 afin de prévenir l'attachement du complexe à la membrane et inhiber l'activité cytolytique du complexe membranaire d'attaque (CAM) du complément (Choi et al., 1989; McDonald and Nelsestuen, 1997; Tschopp et al., 1993).

#### 2.4. LE TRANSPORT DES LIPIDES

La clusterine a été considérée comme une apolipoprotéine par Stuart et al (Stuart et al., 1992), bien que rien dans les structures génomiques et protéiques ne justifie son appartenance à cette famille de lipoprotéine. La clusterine a été classée dans celle-ci en raison des caractéristiques suivantes : (1) elle est associée aux lipides dans le plasma et dans le liquide cébrospinal (de Silva et al., 1990), (2) elle est sécrétée par les hépatocytes et les astrocytes (Burkey et al., 1992; LaDu et al., 1998) et (3) elle se lie à la protéine gp330 (mégaline) ou LRP2 (*Lipoprotein receptor 2*) qui appartient à la famille de récepteurs aux lipoprotéines de faible densité *LDL (Low density Lipoprotein) receptor* (Kounnas et al., 1995a).

Dans le plasma, la clusterine peut être aussi associée aux HDLs (*high density lipoprotein*) et forme une sous-classe de ces HDL en s'associant avec apoA-I, les ( $\beta$ -HDL). Ces  $\beta$ -HDLs sont responsables, au moins en partie, de l'efflux de cholestérol des cellules bordant les vaisseaux sanguins, ce qui diminue le risque d'accidents cardio-vasculaires (Gelissen et al., 1998).

#### 2.5. LA CLUSTERINE ENTRE APOPTOSE ET SURVIE

La clusterine a été initialement caractérisée comme un transcrite associé à l'apoptose lorsqu'elle a été identifiée dans les cellules épithéliales de la prostate ventrale du rat après castration (Buttyn et al., 1989; Lakins et al., 1998). L'augmentation de niveau d'expression de la clusterine (ARNm ou protéine) lors de la mort cellulaire dans différents tissus comme le cœur, le cerveau, les poumons, le foie, le rein, le pancréas, et la rétine *in vitro* et *in vivo*, a permis de définir la clusterine comme un marqueur apoptotique (Ahuja et al., 1994; Bursch et al., 1995; Leger et al., 1987; Montpetit et al., 1986; Wong et al., 1994a). Cependant, elle a été aussi observée dans les cellules en survie (Lakins et al., 1998; Viard et al., 1999). D'autre part, elle a été associée à la progression des nombreux cancers humains (Hara et al., 2001; July et al., 2004; Miyake et al., 2001; Miyake et al., 2000c; Pucci et al., 2004; Zellweger et al., 2001b). Cette ambiguïté a rendu

difficile la détermination de la contribution de cette protéine dans l'apoptose. La littérature a été submergée par de nombreux résultats contradictoires où la clusterine était une fois inducteur d'apoptose et autrefois un médiateur de survie cellulaire, comme le montre le tableau I.3.

Type cellulaire	Facteur inducteur de PCD	Fonction de la clusterine	Références
Prostate ventrale du rat	Castration	Pro-apoptotique	(Buttayan et al., 1989; Lakins et al., 1998)
Thymus	Glucocorticoïdes	Pro-apoptotique	(Bettuzzi et al., 1991)
Cellules épithéliales de la rétine	Signal développemental	Pro-apoptotique	(Agarwal et al., 1996)
A431 cellules de carcinomes épidermiques	Phtalocyanine 4	Pro-apoptotique	(Kalka et al., 2000)
Tumeur de la peau chez la souris	Phtalocyanine 4	Pro-apoptotique	(Kalka et al., 2000)
MCF-7	Radiations ionisantes	Pro-apoptotique	(Yang et al., 2000)
Neurones de souris ApoJ-/-	Lésion cérébrale hypoxique-ischémique néonatal	Pro-apoptotique	(Han et al., 2001)
Culture de neurones corticaux	Privation d'oxygène/glucose	Pro-apoptotique	(Han et al., 2001)
LNCaP, PC3	TNF $\alpha$	Anti-apoptotique	(Sensibar et al., 1995; Sintich et al., 1999)
Cultures mixtes primaires d'Hippocampe	Amyloïdes $\beta$ 1-40	Anti-apoptotique	(Boggs et al., 1996)
L929 cellules de fibrosarcome	TNF $\alpha$ , TGF $\beta$	Anti-apoptotique	(Humphreys et al., 1997)
Prostate ventrale du rat	Castration	Anti-apoptotique	(Lakins et al., 1998)
Lignée cellulaire tubulaire LLC-PK-1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Anti-apoptotique	(Schwochau et al., 1998)
Souris transgéniques/ Cellules photoréceptrices	Signaux de développement	Anti-apoptotique	(Jomary et al., 1999)
Cellules de carcinomes épidermiques A431	Choc thermique, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , anion superoxide, UVA	Anti-apoptotique	(Viard et al., 1999)
ApoJ-/- cœur de souris	Myocardites auto-immune	Anti-apoptotique	(McLaughlin et al., 2000)
LNCaP	Privation d'androgène	Anti-apoptotique	(Miyake et al., 2000c)
LNCaP	Chimiothérapie	Anti-apoptotique	(Miyake et al., 2000b)
Neurones de souris ApoJ-/-	Lésion cérébrale ischémique	Anti-apoptotique	(Wehrli et al., 2001)
Cellules rénales	Chimiothérapie	Anti-apoptotique	(Zellweger et al., 2001b)
Fibroblastes primaires W138	EtOH	Anti-apoptotique	(Dumont et al., 2002)
Fibroblastes primaires W138	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Neutre	(Petropoulou et al., 2001)

**Tableau I.3 La clusterine entre apoptose et survie.** Tableau d'après Trougakos et al. (2002).

La fonction anti-apoptotique a été généralement expliquée par sa fonction chaperonne et son rôle dans l'interaction cellulaire (Kang et al., 2000; Lakins et al., 2002; Poon et al., 2000).

Des observations récentes tenant compte des différentes formes de la protéine ont permis d'apporter quelques explications sur les rôles de la clusterine apparemment contradictoires dans différentes situations comme la survie, la progression tumorale, la résistance aux traitements *in vivo* ou l'apoptose (Bi et al., 2010; Trougakos et al., 2009a; Trougakos et al., 2009b; Wei et al., 2009). Ces comportements opposés seraient dus à l'existence d'au moins trois formes de la clusterine et à leurs localisations cellulaires différentes. Le mécanisme moléculaire de production de ces différentes formes n'est cependant pas complètement défini.

### 3. LE GÈNE DE LA CLUSTERINE : ORGNISATION, PROMOTEUR ET RÉGULATION

Le gène codant pour la clusterine est unique et hautement conservé à travers les espèces. Il partage 70 à 80% d'identité de séquence chez les mammifères (Jones and Jomary, 2002). Chez l'homme, il est situé sur le chromosome 8p21-12 et s'étale sur une région de 17,877 bp. Il est organisé en neuf exons de tailles variables de 47 bp (exon I) à 412 bp (exon V) séparés par huit introns de 207 bp (intron VIII) à 4377 bp (intron VI) (Wong et al., 1994b). Cette organisation est bien conservée chez le rat et la souris. Chez le rat, le gène s'étale sur une région de 13,750 bp au niveau du chromosome 15p12, tandis que son homologue chez la souris se localise sur le chromosome 14 et s'étend sur une région de 12,923 pb (Birkenmeier et al., 1993; Wong et al., 1993).

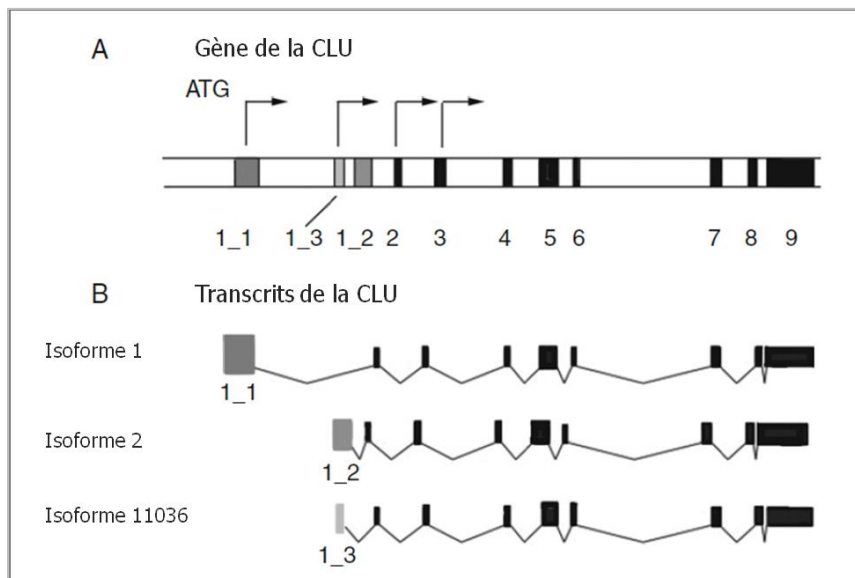
Le cDNA de la clusterine a été cloné à partir des cellules épithéliales entrant en apoptose lors de la régression prostatique induite par castration chez le rat (Leger et al., 1987). Par la suite le gène de la clusterine a été cloné chez différentes espèces : l'homme (Kirszbaum et al., 1989), le chien (Hartmann et al., 1991), le porc (Diemer et al., 1992), la souris (French et al., 1993), la poule (Mahon et al., 1999) et le lapin (Miyata et al., 2001). Les variations du niveau d'expression de la CLU dans différents tissus ont permis de suggérer que l'expression de ce gène est hautement régulée et tissu spécifique. La comparaison des séquences de la partie 5' du gène a permis de montrer une homologie au niveau du promoteur avec une divergence dans la partie située en amont du site de transcription (Michel et al., 1997b).

La divergence au niveau de la partie 5' UTR des ARNs chez le rat (Wong et al., 1993), chez l'homme (Jenne and Tschopp, 1989; Kirszbaum et al., 1989) et chez la souris (French et al., 1993) a été expliquée par la possibilité de transcription alternative de l'exon I. Cependant, jusqu'en 2006, un seul transcrit de 1,9kb de taille avait été décrit pour la clusterine. Il contenait 2 ATGs, le premier est situé dans l'exon 2 et le deuxième au niveau de l'exon 3 (séquence codante pour la clusterine humaine, classée dans la banque des gènes sous le no. M64722) (de Silva et al., 1990).

Actuellement, il est établi qu'il existe au moins deux variantes de transcrits qui diffèrent dans leur premier exon. Ceux-ci résulteraient d'une initiation alternative qui pourrait être contrôlée par deux promoteurs distincts. L'isoforme 1 et l'isoforme 2 dont les numéros d'accès dans la

banque de données sont respectivement NM\_001831.2 et NM\_203339.1 sont produits uniquement chez l'homme et le chimpanzé (Cochrane et al., 2007). Un troisième transcrit a été mis en évidence par l'*Alternative Splicing Annotation Project* database (Lee et al., 2003) et a été appelé l'isoforme 11036 (Andersen et al., 2007).

Ces trois transcrits contiennent 9 exons, 8 introns, et un 3'-UTR terminal. Ils ont tous la séquence de l'exon 2 à 9 en commun et se distinguent par leur premier exon. L'isoforme 1 contient un premier codon d'initiation ATG au niveau de l'exon 1, qui était méconnu avant 2006. Un deuxième ATG se trouve au niveau de l'exon 2 (le premier pour l'isoforme 2), localisé juste en amont de la séquence de localisation dans le RE. Les deux isoformes contiennent un dernier ATG situé au niveau de l'exon 3 (figure I.24). Par analyse de séquence et de prédiction de localisation cellulaire, il a été conclu que l'isoforme 1 code pour une protéine de 501 aa, qui est intracellulaire cytoplasmique ou nucléaire et l'isoforme 2 peut être traduit en une forme destinée à la sécrétion de 449 aa.



**Figure I.24. Clusterine : gène et transcrits.** A- Représentation schématique de l'organisation du gène humain de la CLU sur le chromosome 8. Les exons de 2 à 9 sont représentés par des blocs noirs, communs à tous les transcrits, les blocs gris représentent l'exon 1 de différents variants transcriptionnels de la CLU. L'isoforme 1 son exon 1 (1\_1) est indiqué par un bloc en gris foncé, l'isoforme 2, l'exon 1 (1\_2) en gris et l'isoforme 11036, l'exon 1 (1\_3) est en gris clair. Les flèches représentent les sites d'initiation de la transcription. B- Représentation des variants de l'ARNm (D'après Rizzi et al., 2009).

L'exon 1 de l'isoforme 11036 est localisé entre l'exon 1 de l'isoforme 1 et 2. Ce qui permet de déduire que ce transcrit résulte d'un splicing alternatif. L'isoforme 11036, comme l'isoforme 1 a un ATG fonctionnel dans le premier exon et peut produire une protéine de 460 acides aminés avec une localisation nucléaire. La translation à partir du troisième ATG permet aussi de produire une forme plus courte de la protéine qui est destinée à être localisée dans le noyau (figure I.25) (Scaltriti et al., 2004b).

```

M Q V C S Q P Q R G C V R E Q S A I N T A P P S A H N A A S P G G A R G H R V P L T E A C K D S R I G G M M K T L L L F V
G L L L T W E S G Q V L G D Q T V S D N E L Q E M S N Q G S K Y V N K E I Q N A V N G V K Q I K T L I E K T N E E R K T L
L S N L E E A K K K K E D A L N E T R E S E T K L K E L P G V C N E T M M A L W E E C K P C L K Q T C M K F Y A R V C R S
G S G L V G R Q L E E F L N Q S S P F Y F W M N G D R I D S L L E N D R Q Q T H M L D V M Q D H F S R A S S I I D E L F Q
D R F F T R E P Q D T Y H Y L P F S L P H R R P H F F F P K S R I V R S L M P F S P Y E P L N F H A M F Q P F L E M I H E
A Q Q A M D I H F H S P A F Q H P P T E F I R E G D D D R T V C R E I R H N S T G C L R M K D Q C D K C R E I L S V D C S
T N N P S Q A K L R R E L D E S L Q V A E R L T R K Y N E L L K S Y Q W K M L N T S S L L E Q L N E Q F N W V S R L A N L
T Q G E D Q Y Y L R V T T V A S H T S D S D V P S G V T E V V V K L F D S D P I T V T V P V E V S R K N P K F M E T V A E
K A L Q E Y R K K H R E * S T O P

```

**Figure 1.25. La clusterine : Séquence de la protéine :** Traduction de l'isoforme-1, de l'ORF le plus long. Séquence d'acides aminés traduite à partir de l'ATG présent dans l'exon 1 de l'isoforme-1. La séquence marquée en gris clair correspond à la séquence N-terminale composée de 52 AA spécifique de cet isoforme. La séquence marquée en gris foncé correspond au peptide signal. Les résidus méthionine codés par les trois ATG fonctionnels sont indiqués en gras. Le deuxième et le

troisième sont en communs avec l'isoforme-2. La forme extracellulaire sécrétée correspond à la séquence à partir de la seconde méthionine (D'après Rizzi et al., 2009).

L'existence de ces trois variants de transcrits de la CLU a été confirmée dans différents types de lignées cellulaires de la prostate et du sein (Andersen et al., 2007; Cochrane et al., 2007; Schepeler et al., 2007).

Un autre transcrit a été décrit par Leskov et son équipe dans les cellules MCF-7. Il ne contient pas d'exon 2 et où l'exon 1 de l'isoforme 1 est lié à l'exon 3. Il manque donc à ce transcrit un ATG de l'exon 2 et la séquence de localisation dans le RE. Ces auteurs ont aussi montré que ce transcrit code pour une protéine appelée pnCLU (produite par la translation à partir du dernier ATG contenu dans l'exon3), qui serait le précurseur de la forme nucléaire de la clusterine (Leskov et al., 2003). L'existence de cet isoforme n'a pas encore été confirmée dans d'autres lignées cellulaires (Andersen et al., 2007; Cochrane et al., 2007; Schepeler et al., 2007). Il s'agirait peut être d'un isoforme spécifique de la lignée cellulaire MCF7 (Rizzi et al., 2009).

### 3.1. PROMOTEUR ET RÉGULATION

Il a été démontré, depuis la caractérisation du gène de la clusterine par le groupe de Wong, que le gène de l'homme et du rat ont un promoteur classique, contenant une TATAA box et une GCATT box en position -26 et -93 respectivement. Le promoteur peut être divisé en trois régions :

- (i) de (-1 à -2140) qui contient des motifs de liaison à AP1 (*Activator protein 1*), AP2 (*Activator protein 2*), NFE2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2*), SP1 et SP2 (*Specificity protein*), (ii) de (-2940 à -340) qui contient deux éléments de réponse à l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc) et (iii) de -3540 à -5140, il y a plusieurs motifs pour le CCAAT facteur de liaison transcriptionnel, le *CCAAT recognition factor* ainsi que des motifs de liaison pour les facteurs

*heat shock* (HSF). Enfin, il y a dans le promoteur de ce gène plusieurs régions riches en GC qui sont susceptibles d'être méthylées et qui dès lors peuvent être impliquées dans le contrôle de l'expression de la protéine (Wong et al., 1993; Wong et al., 1994b).

L'analyse du promoteur a montré la présence d'une séquence de 14pb hautement conservée, CLE (*Clusterin element*) qui peut interagir avec le facteur transcriptionnel HSF1 et induire l'expression de la protéine en réponse au stress thermique (Michel et al., 1997a). Ce CLE peut aussi être lié à un hétéro-complexe HSF1-HSF2 formé suite à l'accumulation de protéines altérées résultant d'un traitement par un inhibiteur du protéasome, le MG132 (Loison et al., 2006).

L'existence d'un deuxième promoteur est soutenue par l'existence de ces différents isoformes et leur expression de manière variable avec une régulation cellule et tissu spécifique (Andersen et al., 2007; Cochrane et al., 2007; Scaltriti et al., 2004a; Schepeler et al., 2007). En effet, par analyse "*in silico*" de la région régulatrice du gène de la clusterine, Rizzi et al ont découvert un nouveau promoteur (P2) au niveau du premier intron juste en amont du site de transcription de l'isoforme 2 (Rizzi et al., 2009).

Ce promoteur P2, comme P1, contient une TATA box, une CAAT box, SP1 (G/C box). Il ne contient pas de (*SP2 binding site*) ni de site CLE mais il possède un site *c*-AMP *responsive element* (RE) et trois éléments E-box hautement conservés qui sont supposés lier MYCN (*N-myc proto-oncogene protein*). Ces auteurs ont aussi identifié des éléments STAT dans la région 5' de la séquence de P2 (Rizzi et al., 2009). Ceci ce n'étant cependant qu'une analyse théorique de la séquence, il reste à confirmer la fonctionnalité de ce promoteur.

La régulation transcriptionnelle de la clusterine est complexe, comme le montre la structure de son gène et de son promoteur. Celui-ci peut en effet répondre à différents signaux ubiquistes mais aussi à des facteurs spécifiques du tissu ou de la cellule. La clusterine est faiblement exprimée dans la plupart des cellules normales mais elle est fortement stimulée par différents stress comme le choc thermique (Viard et al., 1999), le stress oxydatif (Michel et al., 1997a) ou les radiations ionisantes (Criswell et al., 2005).

D'autres facteurs sont également impliqués dans la régulation de l'expression de la clusterine : les facteurs de croissance : TGF $\beta$ , NGF et EGF (Gutacker et al., 1999; Jin and Howe, 1997). Ces cytokines régulent l'expression de l'ARNm/protéine en modulant la transactivation du promoteur au niveau du site AP1 de la région 5' proximale du promoteur (Jin and Howe, 1997; Reddy et al., 1996a).

Des stéroïdes comme l'œstradiol modulent l'expression de la clusterine dans l'endomètre ou l'utérus (Heikaus et al., 2002; Waters et al., 2001; Wunsche et al., 1998). Les androgènes

régulent l'expression de la clusterine dans la prostate via le site ARE situé au niveau de l'intron 1 (Cochrane et al., 2007). La vitamine D stimule quant à elle l'expression de cette protéine au niveau des cellules MCF7 (James et al., 1996; Simboli-Campbell et al., 1996).

Différents éléments *cis* et des facteurs *trans* sont aussi responsables de la régulation de l'expression de la clusterine dans différentes conditions *in vitro*. Parmi ces facteurs *Trans*, citons : Egr-1 (*Early growth response protein 1*) (Criswell et al., 2005), AP-1 (Jin and Howe, 1999), HSF1/2 (Loison et al., 2006), Cdx1/2 (*caudal-type homeobox protein 1*) (Suh et al., 2001), et B-MYB (*Myb related protein B*) (Cervellera et al., 2000) interagissent avec le promoteur de la clusterine et modulent son activité.

La clusterine est donc une protéine multivalente et complexe, qui peut répondre à différents signaux systémiques ou produits localement de manières cellule et tissu spécifiques. Malgré l'identification de différentes cytokines ou facteurs de croissance à promouvoir ou à supprimer l'expression de la clusterine *in vitro*, le contrôle de l'expression de cette protéine n'est que très partiellement compris. La compréhension de ces régulations de l'expression est difficile car un même facteur de croissance ou une hormone induit des réponses différentes (même contradictoires) en fonction du type cellulaire étudié ou du type de culture réalisée (Trougakos and Gonos, 2002).

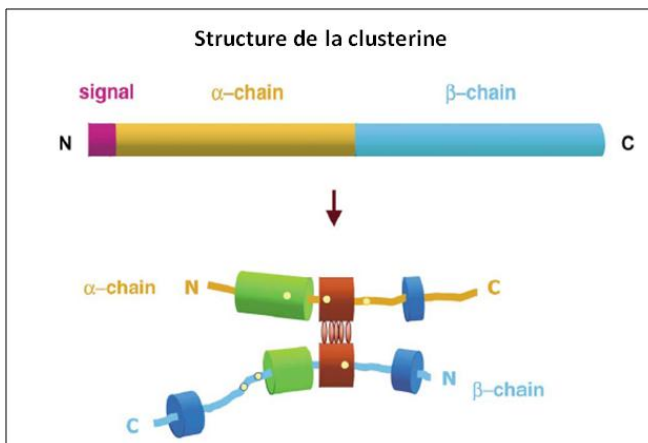
La mise en évidence de l'existence de différents isoformes codant pour la clusterine à partir du même gène et l'identification d'un deuxième promoteur permettront dans le futur une meilleure interprétation des résultats contradictoires observés lors des études de la régulation de l'expression de la clusterine.

#### 4. CLUSTERINE : LA PROTÉINE OU FORMES PROTÉIQUES

Si le gène de la clusterine s'est avéré être un exemple complexe qui incarne les différents systèmes de régulation possibles, la situation pour la protéine n'est pas plus simple. Plusieurs travaux ont montré l'existence de différentes formes protéiques de la clusterine. Elles dérivent toutes du même gène. Ces formes se distinguent par leur localisation cellulaire : Une forme extracellulaire (la forme sécrétée) et des formes intracellulaires (forme cytoplasmique, forme nucléaire) (Bettuzzi, 2009; Bettuzzi and Rizzi, 2009; Trougakos et al., 2009b). Malgré que l'existence de différents transcrits a été établie, le lien entre ces messagers et les différentes formes protéiques n'est pas totalement élucidé. Les différentes formes intermédiaires ne sont toujours pas bien caractérisées, ni purifiées. D'ailleurs, la compréhension de la clusterine souffre du manque de caractérisation structurale et les informations de structure secondaire dont nous disposons ne sont basées que sur des prédictions de structure à partir de la séquence d'acides aminés à l'aide de logiciels de bioinformatiques.

#### 4.1. LA FORME SECRÉTÉE (SCLU)

La clusterine est produite de manière prédominante sous la forme d'une glycoprotéine sécrétée. La forme sécrétée la mieux étudiée est celle qui résulte de la traduction initiée à partir du codon AUG situé au niveau de l'exon 2. Le produit de la traduction est une pré-protéine de 449 acides aminés. La protéine sCLU mature, résulte d'un clivage du peptide signal de 22 résidus d'AA et d'un clivage interne réalisé dans le réticulum endoplasmique au niveau de la liaison Arg227–Ser228 (entre Arg226 et Ser227 chez le rat). Ces clivages génèrent un hétérodimère composé d'une chaîne alpha (résidus de 228 à 449) et d'une chaîne beta (résidu 23 à 227) liées entre elles par 5 ponts disulfure (Choi-Miura et al., 1992). La figure I.26 montre une représentation schématique de la structure de la clusterine d'après Jones et Jomary (Jones and Jomary, 2002).



**Figure I.26. Représentation schématique de la clusterine humaine.** La chaîne de polypeptide précurseur (en haut) est clivée par protéolyse pour éliminer le peptide signal de 22 acides aminés (en rose) et par la suite entre les résidus 227/228 pour générer les chaînes  $\alpha$  (en orange) et  $\beta$  (en bleu clair). Ceux-ci sont assemblés en antiparallèle pour former un hétérodimère (en bas) où les centres riches en cystéines sont liés par 5 ponts disulfure. D'après Jones et Jomary (2002).

La maturation de la sCLU requière une glycosylation extensive des chaînes polypeptidiques. Il en résulte une glycoprotéine de 75-80kDa, où les sucres représentent 20 à 30% de son poids moléculaire. Les glycosylations complexes se retrouvent à chaque fois sur l'atome d'azote des groupements amides des asparagines, présentes dans les triplets de séquence Asn X Thr ou Ser. Six sites de glycosylation ont été identifiés : trois sont situés sur la sous-unité alpha et les trois autres sur la sous-unité bêta. Les chaînes polysaccharidiques sont complexes et composées de sept sucres simples différents. Elles sont aussi de tailles variables, ce qui contribue à l'hétérogénéité de masse moléculaire de la protéine (Kapron et al., 1997).

La CLU humaine contient dans sa structure 4 myosine-like, coiled domains et 3 hélices  $\alpha$  amphiphiles. La clusterine de rat quant à elle possède aussi deux hélices  $\alpha$  amphiphiles sur la chaîne  $\beta$  et une seule sur la chaîne  $\alpha$ . Elle comporte comme son homologue humain quatre structures *myosine tail like domain* synonyme de structure *coiled-coil*. Chez le rat, on trouve aussi deux hélices  $\alpha$  *coiled-coil*, à côté du nœud riche en cystéine (Trougakos and Gonos, 2002). Cette structure de trois régions amphiphiles et deux hélices *coiled-coil* est responsable de son



affinité relative et de sa faible spécificité de liaison à une grande variété de ligands ainsi que de son activité de chaperonne (Bailey et al., 2001; Humphreys et al., 1999).

La plupart des résultats expérimentaux confirment que sCLU agit comme une chaperonne moléculaire, qui est capable de fixer les protéines au repliement altérés et d'entraîner leur dégradation via des récepteurs endocytiques. La sCLU se lie aussi par des liaisons hydrophobes aux domaines hydrophobes de différentes protéines *in vitro* (tableau I.4) (Humphreys et al., 1999; Kirszbaum et al., 1989; Lakins et al., 2002; Poon et al., 2000; Wilson and Easterbrook-Smith, 2000).

Ligand	Localisation	Interaction	Références
Apolipoprotéine A-I	Extracellulaire	Co-CHR	(Jenne et al., 1991)
Immunoglobulines	Extracellulaire	Co-CHR	(Wilson et al., 1991)
Lipides	Extracellulaire/intracellulaire	Co-CHR, Co-IP	(Burkey et al., 1992)
Peptide $\beta$ -Amyloïde	Extracellulaire	Co-IP	(Ghiso et al., 1993)
gp330/mégaline	Extracellulaire (membrane plasmique)	Co-CHR	(Kounnas et al., 1995a)
Protéine extracellulaire (SIC) du <i>Streptocoques pyrogènes</i>	Extracellulaire	Co-CHR, EL	(Akesson et al., 1996)
Surface cellulaire du <i>Staphylocoques aureus</i>	Extracellulaire	EL	(Partridge et al., 1996)
Héparine	Extracellulaire	Co-CHR, EL	(Pankhurst et al., 1998)
Prion	Extracellulaire	Co-IP	(McHattie and Edington, 1999)
Glycoprotéines H, J et K	Cytoplasme (granules de sécrétion)	Co-IP	(Palmer and Christie, 1992)
Récepteurs TGF $\beta$	Intracellulaire (membrane plasmique)	TH, Co-IP	(Reddy et al., 1996b)
Glutathion-S-transférase	Cytoplasme		(Humphreys et al., 1997)
Ku70, Ku86	Noyau/ membrane plasmique/cytoplasme	TH, Co-IP, Co-IM	(Yang et al., 2000)

**Tableau I.4. Tableau représentant les molécules entrant en interaction avec la clusterine et leur localisation** (d'après Trougakos et al., 2002). Co-CHR: *co-purification by chromatography*; Co-IP: *co-immunoprecipitation*; EL: ELISA; TH: *two-hybrid system*; Co-IM: *co-immunolocalization*.

#### 4.2. FORMES INTRACELLULAIRES : FORME NUCLÉAIRE ET FORME CYTOPLASMIQUE

En plus de la forme sécrétée, la clusterine se retrouve dans différents types cellulaires sous différentes formes intracellulaires : une forme nucléaire (nCLU) et une forme cytoplasmique (cCLU).

La forme nucléaire a été découverte pour la première fois par Reddy et ses collaborateurs en 1996. Il ont montré que le TGF $\beta$  induit l'accumulation de la clusterine (de 43kDa de PM) dans le noyau des deux lignées épithéliales du poumon (HepG2 et CCL64) (Reddy et al., 1996a). Par la suite, elle a été identifiée comme une protéine de 55 kDa induite par les radiations ionisantes dans les cellules de la lignée cancéreuse du sein, MCF-7 (Yang et al., 2000).

D'autres auteurs ont confirmé qu'il s'agit d'une forme courte non clivée et non glycosylée de 45 à 55kDa détectée dans le noyau des cellules cancéreuses prostatiques PC3 par immunohistochimie (Caccamo et al., 2005; Leskov et al., 2003). Moretti *et al.*, ont montré que cette forme nucléaire peut être synthétisée par initiation alternative de la translation à partir du dernier ATG localisé au niveau de l'exon 3 (Moretti et al., 2007b). Cependant, Pajak *et al.*, ont observé qu'en plus de la forme protéique de 50kDa, une autre forme stable de 60 kDa, peut entrer dans le noyau. Cette dernière pourrait représenter le produit de translation de l'isoforme 1 à partir du premier ATG situé au niveau de l'exon 1 (Pajak and Orzechowski, 2007). L'origine exacte de ces formes intracellulaires n'est pas bien connue et fait l'objet de plusieurs recherches.

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la présence de la CLU dans le noyau et dans le cytosol: (1) par initiation alternative stimulée par TGF  $\beta$  (Reddy et al., 1996a) ; (2) par splicing alternatif dans les cellules MCF-7 exposées aux radiations ionisantes (Leskov et al., 2003) ; (3) par retranslocation de la clusterine via la voie ERAD like (*Endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation*), de l'appareil de golgie au cytosol (Nizard et al., 2007) ; (4) par reinternalisation de la forme sécrétée de la clusterine du milieu extracellulaire vers le cytosol (Kang et al., 2005). De plus, le cDNA de la CLU sans le peptide signal dans les cellules épithéliales prostatiques (PC3 et PNT1A) produit une forme de 49 kDa. Ce poids moléculaire correspond à la taille de la forme non glycosylée et non clivée de la CLU (Scaltriti et al., 2004b). Comme ces différentes formes intermédiaires de la protéine n'ont pas encore été purifiées ni séquencées, on ne sait pas réellement si ces formes résultent d'un splicing alternatif ou si elles sont simplement des formes intermédiaires à différents stades de maturation.

La forme nucléaire, composée de 501 résidus d'acides aminés, agit comme un signal pro-apoptotique inhibant la croissance cellulaire et la survie. Cette forme n'est pas glycosylée et n'a pas subi de clivages produisant la forme mature hétérodimérique propre à la forme sécrétée puisqu'elle est dépourvue de la séquence nécessaire pour sa translocation vers le réticulum endoplasmique qui est encodée par une séquence située au niveau de l'exon 2 et utilise le deuxième ATG contenu dans l'exon 3. Le produit de la traduction est de 49kDa correspondant à la pnCLU (la forme pro-nucléaire). Cette protéine contient trois sites de localisation NLS (*Nuclear localization signal*) et un site de liaison des dinucléotides DBS (*Dinucleotide-binding site*) qui permettent sa localisation nucléaire (Kirszbaum et al., 1989; Tsuruta et al., 1990). L'analyse structurale a révélé que la protéine nCLU possède aussi deux domaines *coiled-coil*. Le domaine situé dans la partie C-terminal est le seul qui s'associe à la protéine Ku70, impliquée dans la réparation de l'ADN (Yang et al., 2000). Ce domaine est nécessaire au déroulement de l'apoptose. Dans ce contexte, il a été démontré que seule la surexpression de protéines nCLU présentant des domaines C-terminal *coiled-coil* et un NLS fonctionnel peut entraîner la mort cellulaire puisque l'introduction des mutations spécifiques au niveau du domaine *coiled-coil* C-

terminal inhibe la liaison au Ku70 et prévient la mort des cellules MCF7 même si ses mutants s'accumulent au niveau du noyau de ces cellules (Leskov et al., 2003). Par contre la présence du domaine NLS, n'est pas nécessaire pour la translocation de la forme nucléaire dans le noyau des cellules épithéliales prostatiques PC3 (Scaltriti et al., 2004b).

Comme nous ne disposons pas encore de la structure à trois dimensions de la CLU, nous ne savons pas non plus quels sont les domaines spécifiques d'une forme ou d'une autre. Même s'il existe des prédictions de la structure de la forme sécrétée, les données actuelles ne sont pas suffisantes pour prédire la structure de ces formes intracellulaires. Ces différentes formes ne peuvent être distinguées que par leur localisation et leur fonction. Il est généralement admis que la forme nucléaire est associée à la mort cellulaire, comme il a été démontré dans les lignées cellulaires de la prostate (Caccamo et al., 2005; Caccamo et al., 2004; Caccamo et al., 2003; Moretti et al., 2007a; Scaltriti et al., 2004a; Scaltriti et al., 2004b; Zhang et al., 2006) et du sein (Yang et al., 2000) et une forme cytoplasmique de la clusterine de 60kDa inhibait l'apoptose des cellules de fibrosarcome en interagissant avec Bax (Zhang et al., 2005).

La clusterine est donc une protéine multifacette présente sous plusieurs formes. Celles-ci peuvent être exportées vers le milieu extracellulaire, soit dirigées vers le cytoplasme ou le noyau. Sa fonction dépendrait du niveau d'expression des différentes formes mais aussi de leur accumulation au sein des différents compartiments cellulaires. Au sein de la cellule, la clusterine peut dès lors être décrite comme une actrice de théâtre qui change de costume et d'action en fonction du scénario et du décor.

## 5. LA CLUSTERINE DANS LA PROSTATE

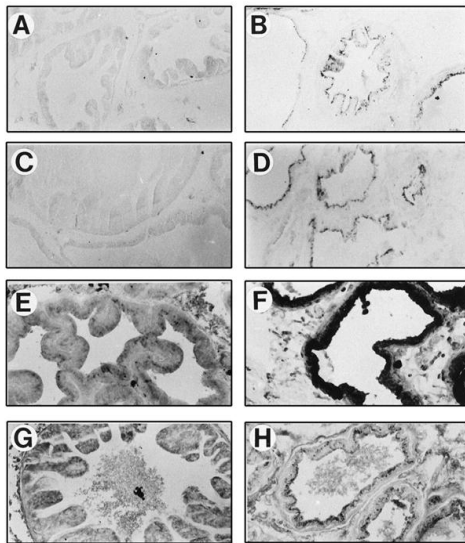
### 5.1. LA CLUSTERINE DANS L'APOPTOSE PROSTATIQUE

Dans la prostate normale, l'expression de la clusterine est faible. Par contre, elle est fortement surexprimée dans le modèle de l'apoptose induite dans la prostate du rat par castration chirurgicale ou chimique (Astancolle et al., 2000; Bettuzzi et al., 1989; Leger et al., 1988; Montpetit et al., 1986). Dans ce modèle, la clusterine a été caractérisée comme le produit d'un gène réprimé par les androgènes, ce qui explique son appellation de (*Testosterone-repressed prostatic message-2*), TRPM-2.

L'expression de la clusterine est induite juste après castration pour atteindre un maximum au 4ème jour, les protéines continuent à s'accumuler pendant 3-4 jours. Plus tard, le niveau de la clusterine commence à diminuer pour atteindre un niveau basal au 7-8 ème jour. Lakins et ses collaborateurs ont étudié la biogenèse de la clusterine dans la prostate normale et la prostate de rat castré depuis 4 jours. A l'aide des anticorps dirigés contre la chaîne  $\alpha$ , la chaîne  $\beta$  ou les deux chaînes ( $\alpha$  et  $\beta$ ), ou un anti-SGP2, par Western blotting et par immuno-histochimie, ils ont



montré que la forme surexprimée par les cellules épithéliales en apoptose est une forme de 42 kDa qui est différente de la forme longue mature (figure I.27).



**Figure I.27. Localisation de clusterine dans la prostate ventrale de rat normal et dans la prostate en régression par immunohistochimie.** Image de coupes de la prostate ventrale de rat normale (A, C, E et G) et de la prostate ventrale de rat castré depuis 4 jours (B, D, F et H), hybridées avec différents anticorps dirigés contre différents peptides ; située soit dans la chaîne  $\alpha$ , (A et B), soit dans la chaîne  $\beta$  (E et F), soit contre le mélange de ces peptides, (G et H), soit en utilisant un anticorps polyclonal (anti-SGP2) (d'après Lakins et al. 1998).

Ils ont également montré que dans ce modèle, la clusterine est surexprimée dans les cellules en survie. En effet, dans la prostate d'animaux castrés depuis trois jours, seuls 20% des cellules épithéliales persistent au sein de l'organe. Ces cellules sont majoritairement des cellules prostatiques rescapées, exprimant en majorité la clusterine, et un traitement de celles-ci par la testostérone est capable de reconduire leur multiplication jusqu'à ce que la prostate récupère son volume normal. La clusterine apparaît dès lors dans ce modèle comme une protéine impliquée dans la résistance à l'apoptose.

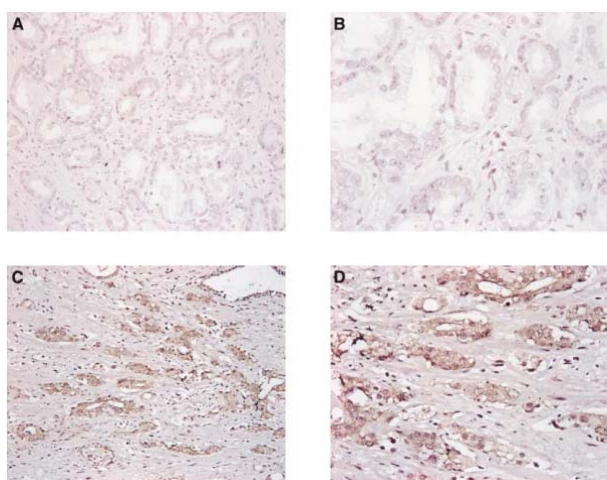
La clusterine augmente aussi dans le modèle de tumeur de Shionogi où l'ablation hormonale induit une apoptose massive (Rennie et al., 1994). Cependant, dans ce modèle, le traitement avec des bloqueurs des canaux de calcium, qui inhibent l'induction d'apoptose, la clusterine n'est pas induite en absence d'androgène. Ces résultats ont amené à conclure que la clusterine n'est pas régulée par les androgènes (Miyake et al., 2000b). Ce n'est que récemment, grâce à l'existence des isoformes de la clusterine, que Cochrane et al ont apporté une explication de l'effet des androgènes sur l'expression de la clusterine. En effet, le taux d'ARNm et de la protéine de la clusterine augmente dans les cellules androgéno-dépendante LNCaP en réponse aux traitements par les androgènes. Cet effet est bloqué par l'action des anti-androgènes. L'expression de la CLU augmente aussi dans la culture d'organe de prostate ventrale de rat castré suite aux traitements par la DHT. Cet effet est spécifique aux androgènes puisque l'incubation des cellules LNCaP ou des morceaux d'organes en culture en présence d'autres stéroïdes n'affecte pas le niveau d'expression de la CLU. Ils ont également montré que les androgènes activent la transcription de la forme cytoprotectrice de la clusterine (l'isoforme 2) et répriment celle de l'isoforme 1, qui code pour une forme cytoprotectrice et une forme apoptotique. Cette régulation se fait via le site ARE situé au niveau de l'intron 1 (Cochrane et al., 2007).

Le rôle apoptotique de la clusterine a été attribué à la forme nucléaire (Leskov et al., 2003). Une accumulation de cette forme dans le noyau des cellules prostatiques mourrantes a été observée par Caccamo et son équipe (Caccamo et al., 2006; Caccamo et al., 2004; Caccamo et al., 2003). La même équipe a démontré qu'une surexpression de la forme nucléaire induit l'arrêt du cycle cellulaire et une apoptose caspase 3 dépendante (Scaltriti et al., 2004a).

## 5.2. LA CLUSTERINE ET LE CANCER PROSTATIQUE

### 5.2.1. EXPRESSION DE LA CLUSTERINE DANS LE CANCER PROSTATIQUE

De nombreuses études expérimentales et cliniques ont montré que la surexpression de la clusterine est associée à la progression du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance et qu'elle exerce un rôle protecteur vis-à-vis de l'apoptose induite par différents agents thérapeutiques (July et al., 2002; Miyake et al., 2000b, c; Trougakos et al., 2004; Wu et al., 2002; Yamanaka et al., 2005). Il a été aussi montré qu'une surexpression de la clusterine est fortement corrélée à un score élevé de Gleason (Miyake et al., 2006; Steinberg et al., 1997) et à un mauvais pronostic pour le patient (Pins et al., 2004). De plus, l'inhibition de la clusterine à l'aide d'un antisens ASO favorise la mort des cellules cancéreuses *in vitro*, induite par blocage des androgènes ou par les agents thérapeutiques utilisés (Gleave et al., 2001).



**Figure 1.28. Analyse par immuno-histochimie de l'expression de la clusterine dans la prostate chez des patients ayant subi une prostatectomie radicale.** Faible marquage de la clusterine au niveau des adénocarcinomes chez les patients qui n'ont pas reçu de traitement hormonal avant la chirurgie (A 200x ; B 400x). Forte intensité de marquage de la CLU chez les patients qui ont subi la chirurgie après 8 mois de traitement (C 200x ; D 400x). (D'après July et al. 2002) (July et al., 2002)

En immuno-histochimie, l'expression de la clusterine est augmentée dans 80% des tumeurs prostatiques après traitement anti-androgénique, par contre elle est faible dans les tissus prostatiques non traités (figure 1.28) (July et al., 2002; Miyake et al., 2005b; Steinberg et al., 1997). L'expression de la forme sécrétée de la clusterine augmente chez les sujets traités. En effet, une étude récente vient de montrer que le niveau de la clusterine dans le sérum peut être utilisé comme un biomarqueur de la progression du cancer prostatique (Miyake et al., 2010).



L'étude du rôle de la clusterine dans la progression du cancer a été initiée depuis la fin des années quatre-vingt. Elle a cependant souffert de l'absence des bases moléculaires permettant d'expliquer les fonctions apparemment opposées de cette protéine dans l'apoptose et la survie des cellules cancéreuses. Ce n'est que très récemment, à la lumière de l'identification de la forme cytoplasmique et la forme sécrétée de la CLU en tant que facteurs de survie et, la forme nucléaire en tant que facteur apoptotique, que les niveaux élevés de la clusterine observés dans les hauts grades métastatiques ont pu être identifiés comme étant le résultat d'une synthèse accrue des deux formes anti-apoptotiques (sCLU et cCLU) mais aussi comme une altération de l'expression de la forme nucléaire (Moretti et al., 2007b; Pucci et al., 2004; Rizzi and Bettuzzi, 2010; Shannan et al., 2006).

Pour s'orienter vers l'apoptose ou vers la survie, la cellule doit favoriser l'expression de l'une ou l'autre isoforme de la clusterine. Cette régulation implique différents facteurs comme TGF $\beta$ , des suppresseurs de tumeurs comme p53, des oncogènes comme cMyc, des facteurs de croissance, des métaux lourds, les UVA, UVB, les RIs, le choc thermique, mais aussi d'autres facteurs intervenant dans des voies de signalisation complexes (Klokov et al., 2004; Trougakos and Gonos, 2002, 2006).

Cochrane et son équipe ont montré que les deux transcrits de la CLU sont exprimés et régulés différemment par les androgènes dans les lignées cancéreuses prostatiques. En effet, ils augmentent l'expression de l'isoforme 2 et diminuent celle de l'isoforme 1. De plus le niveau d'expression de l'isoforme 2 augmente de manière significative lors de la progression du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance *in vivo* dans le modèle de xénogreffe tumorale de la lignée LNCaP (Cochrane et al., 2007). Rappelons que ces deux isoformes codent pour des protéines distinctes au niveau N-terminal. Ces deux protéines sont cytoprotectrices, néanmoins l'isoforme 1 est seul capable de produire une forme nucléaire par splicing alternatif.

Très récemment, il a été démontré que la forme sécrétée de la CLU est régulée par mda-7/IL-24 (*Melanoma differentiation-associated gene-7/interleukin-24*). Ce facteur anti-tumoral stimule la réponse immunitaire anti-tumorale et inhibe la progression tumorale et l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Bhutia et al., 2011; Bhutia et al., 2010). Dans le cancer prostatique, il inhibe la translation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia sequence 1*) (Dash et al., 2010). Une étude récente, dans les cellules prostatiques DU145, a montré que ce facteur médie son action anti-tumorale via une diminution de l'expression de la sCLU et une augmentation de l'expression de la nCLU (Bhutia et al., 2012).

### 5.2.2. LA CLUSTERINE DANS LA RÉSISTANCE DU CANCER PROSTATIQUE

Il est admis que la résistance des cellules cancéreuses aux traitements médicamenteux et aux radiations ionisantes est notamment due à la surexpression de protéines de survie telles que Bcl-2, les protéines chaperonnes (Hsp27, Hsp70 et la Hsp90) et la clusterine (Mahon et al., 2011). Dans les lignées cancéreuses prostatiques, la surexpression de la clusterine augmente la résistance à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques tels que les taxanes, comme le docétaxel et le paclitaxel utilisés pour soigner des cancers prostatiques réfractaires (Petrylak et al., 2004; Tannock et al., 2004). Cependant la résistance à ses agents se développe très vite, le traitement échoue et la tumeur métastase au niveau des os. De plus, l'expression de la clusterine est induite par ces agents cytotoxiques, suggérant ainsi sa participation à un mécanisme cytoprotecteur (Miyake et al., 2000b; Mizutani et al., 2006; Patterson et al., 2006). Il a été démontré que dans les cellules de la lignée hormono-indépendante DU145, le docétaxel induit l'expression du facteur de transcription Stat1 qui active l'expression de la sCLU et permet ainsi à ces cellules d'acquérir une résistance à l'apoptose. A l'opposé l'inhibition de l'expression de la CLU dans les cellules résistantes au docétaxel DU145, restaure chez ces dernières l'apoptose induite par le docétaxel (Patterson et al., 2006). *In vivo*, il a été également démontré que les xénogreffes LNCaP qui surexpriment la clusterine sont moins sensibles au paclitaxel que les cellules non transformées (Miyake et al., 2000b). La sCLU augmente aussi chez les patients traités à l'aide de docétaxel par rapport à ceux qui n'avaient pas de traitement préopératoire (Sowery et al., 2008).

### 5.2.3. LA CLUSTERINE EST UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE : LE CUSTIRSEN OGX-011 UN ANTI-SENS CONTRE LA CLUSTERINE

La clusterine n'est qu'une cible parmi d'autres mais c'est une cible produite en grande quantité et de manière pratiquement ubiquiste par ces cellules ayant survécu à l'action de drogues anti-tumorales. L'utilisation d'anti-sens de la clusterine a déjà été utilisée expérimentalement pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes (Miyake et al., 2000a; Miyake et al., 2005a). Zellweger dès 2001 a ainsi montré que la castration associée à l'utilisation d'anti-sens sur un modèle de xénogreffe de cellule PC3 diminue de 70% le niveau d'expression de la clusterine et permet une régression tumorale par apoptose plus rapide et un délai de récurrence plus long (Zellweger et al., 2001a).

Logiquement, les nouvelles stratégies thérapeutiques s'adressent à l'utilisation d'anti-sens dirigé contre la forme sécrétée de la clusterine. L'inhibition de celle-ci devrait permettre de surmonter la résistance des cellules cancéreuses prostatiques aux médicaments anti-cancéreux *in vitro* comme *in vivo*, dans le modèle de xénogreffe et chez les patients atteints de cancer prostatique (Chi et al., 2005; Gleave et al., 2001; Miyake et al., 2005a; Sensibar et al., 1995; Sintich et al., 1999;

Trougakos et al., 2004; Zoubeidi et al., 2010). Plusieurs de ces molécules sont aujourd'hui en phase d'essai clinique. En effet (le custirsén) OGX-011 qui bloque la synthèse de la chaperonne, la CLU, est le plus avancé parmi ces agents (Chi et al., 2005; Chi et al., 2008). Il est actuellement testé en essais clinique phase III, en combinaison avec la chimiothérapie, chez des patients avec un cancer prostatique résistant à la castration. Les résultats sont attendus avec impatience (Zielinski et al., 2013).



## II. OBJECTIF ET STRATÉGIES DU TRAVAIL

La clusterine ou *testosterone-repressed message-2* (TRPM-2) augmente de manière importante dans la prostate de rat après castration par rapport au tissu normal (Leger et al., 1988; Montpetit et al., 1986). Cette protéine a dès lors été logiquement considérée comme un inducteur apoptotique. Ce n'est que bien plus tard que l'on a pu montrer qu'elle était aussi impliquée dans la survie des cellules prostatiques.

Dans le cancer prostatique, 80% des tumeurs surexpriment aussi la clusterine après traitement anti-hormonal (July et al., 2002; Miyake et al., 2005b). Des nombreuses études ont montré que cette surexpression protège les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par TNF $\alpha$  et favorise la progression vers l'androgéno-indépendance de la tumeur (Miyake et al., 2000c).

Longtemps, le rôle exact de la clusterine dans l'apoptose et la survie est resté un sujet de débat alimenté par de nombreux résultats contradictoires. L'ambiguïté de fonction de la clusterine n'a trouvé un début d'explication que récemment grâce à la mise en évidence des trois formes de la protéine (sCLU, cCLU et nCLU) et à l'attribution à chacune d'elles de rôles biologiques distincts. La synthèse de données la plus récente attribue à la protéine sécrétée (sCLU) et à la forme cytoplasmique (cCLU) des propriétés favorisant la survie et confère à sa forme nucléaire (nCLU), résultant d'un épissage alternatif ou une initiation alternative de la transcription, un rôle apoptotique (Caccamo et al., 2004; Moretti et al., 2007b; Rizzi et al., 2009; Shannan et al., 2006; Trougakos et al., 2009a).

En raison de son rôle protecteur sur l'apoptose et son implication dans la résistance de différents cancers aux agents thérapeutiques, la forme sécrétée de la clusterine suscite un grand intérêt puisqu'elle constitue une cible thérapeutique du cancer prostatique androgéno-indépendant (Gleave and Chi, 2005; Gleave and Miyake, 2005; Zellweger et al., 2001a). Dans ce contexte, la connaissance des mécanismes cellulaires qui médient l'action de survie de celle-ci pourrait s'avérer fort utile. Cependant les mécanismes moléculaires par lesquels la clusterine inhibe l'apoptose dans les cellules cancéreuses ne sont pas connus. Dès lors, nous nous sommes fixés comme objectif du travail, de confirmer, tout d'abord, l'effet de survie de la sCLU dans les cellules prostatiques androgéno-indépendantes et ensuite d'identifier les mécanismes par lesquels la clusterine exerce son rôle protecteur et interfère avec les voies d'apoptose.

Dans ce but, nous avons établi un modèle expérimental de lignée cellulaire inductible pour l'expression de la sCLU à partir des cellules épithéliales prostatiques androgéno-indépendantes MatLyLu. Ce modèle (MLLTet-On-sClu) nous a permis d'étudier les effets de la sCLU sur la



prolifération cellulaire et de confirmer le rôle protecteur de cette protéine sur l'apoptose induite par TNF $\alpha$  dans ces mêmes cellules.

Pour comprendre la fonction cytoprotectrice de la sCLU, nous nous sommes focalisés sur deux voies majeures de survie activées dans le cancer de la prostate, la voie NF kappa B et la voie Akt/PI 3-kinase (Ayala et al., 2004; Inoue et al., 2007; Jin et al., 2008; Shukla et al., 2005)

Nous avons aussi utilisé la clusterine exogène pour démontrer le mode d'action extracellulaire de cette protéine sur les cellules non induites. Nous avons ensuite étudié la mégaline, le récepteur endocytaire de la clusterine, pour établir son implication dans la transduction membranaire du signal de survie de sCLU.

Enfin nous avons réalisé une étude protéomique comparative des cellules induites pour la surexpression de la sCLU et les cellules non induites. Comme l'effet de survie de la clusterine est associé à la surexpression de la forme sécrétée, il nous est apparu utile de comparer le profil d'expression protéique dans les cellules prostatiques surexprimant la sCLU par rapport aux cellules non induites. Cette étude nous a permis d'identifier des protéines régulées par la sCLU dont les fonctions propres pourraient expliquer l'action globalement protectrice de sCLU lors de l'apoptose et son implication dans la progression du cancer prostatique vers des stades de résistance aux traitements.

### III. RÉSULTATS

La présentation de nos résultats est structurée en quatre parties :

Dans la première partie, nous décrivons, l'établissement, à partir des cellules prostatiques androgéno-indépendantes, de plusieurs clones stables surexprimant la forme secrétée de la clusterine de manière inductible. Dans cette partie nous analysons aussi les propriétés de différents clones obtenus.

Dans la seconde partie, nous présentons nos mesures concernant la survie des cellules épithéliales prostatiques surexprimant la sCLU lors de l'apoptose induite par TNF $\alpha$ /ActD.

Dans la troisième partie, nous exposons nos résultats sur l'action de sCLU sur les deux voies majeures de survie, la voie NF kappa B et la voie Akt ainsi que les effets de la surexpression de la sCLU sur l'expression et la phosphorylation de la mégaline, décrite comme récepteur endocytaire de la clusterine dans les cellules épithéliales de la thyroïde et du rein.

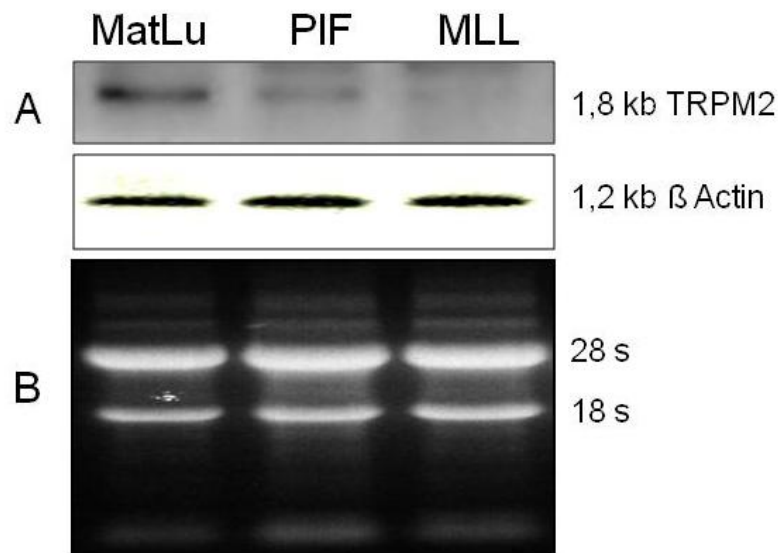
Dans la dernière partie du travail, nous présentons l'analyse protéomique réalisée dans le but d'identifier d'autres facteurs protéiques susceptibles de rendre compte de la totalité des effets protecteurs de sCLU sur l'apoptose.

Les travaux de signalétique cellulaire et de la protéomique ayant fait l'objet de publications séparées seront repris sous cette forme dans la présentation des résultats.

## 1. PARTIE 1 : ETABLISSEMENT DE LIGNÉES STABLES EXPRIMANT DE MANIÈRE INDUCTIBLE LA SCLU

### 1.1. ETABLISSEMENT DE LIGNÉES STABLES EXPRIMANT DE MANIÈRE INDUCTIBLE LA CLUSTERINE

Pour l'établissement de lignées stables, notre choix s'est porté sur la lignée de rat MATLyLu en raison de sa faible expression du gène. En effet, une étude du niveau de l'expression de la clusterine a été réalisée dans la lignée prostatique de rat MATLyLu (MLL) par la technique du "Northern Blotting" et comparée à celle des cellules MatLu et Pif (figure III.1).



**Figure III.1. Analyse de l'expression de la clusterine dans les lignées cellulaires de rat MLL, Mlu et Pif.** A Hybridation de "Northern Blot" chargé de 15  $\mu$ g de RNA totaux de lignées de rat MLL, Mlu et Pif à l'aide de sonde radioactive de la clusterine de rat. La standardisation des quantités des ARNs déposés a été confirmée à l'aide d'une sonde de  $\beta$  actine (B). L'intégrité des ARNs a été vérifiée comme le montre la photo de l'électrophorèse sur gel d'agarose (C).

Pour réaliser l'établissement des lignées stables et inductibles, nous avons choisi le système d'expression inductible: "Tet-On Gene Expression System" de chez Clontech.

Ce système nécessite le développement d'une double lignée stable. Le principe est détaillé dans la partie V « Matériels et Méthodes » dans le paragraphe 2.1.5.

### 1.1.1. ETABLISSEMENT DE LA LIGNÉE MLL-TET ON

Une première transfection des cellules MATLyLu a d'abord été effectuée avec le plasmide pTet-on. Ce vecteur, une fois transfecté dans un système eucaryote, va exprimer de façon constitutive le cDNA correspondant à la protéine régulatrice, qui en présence de doxycycline pourra induire l'expression du gène d'intérêt situé sur un autre plasmide, pTRE (figure III.2). Après sélection sur milieu sélectif, 60 clones résistants ont été isolés.

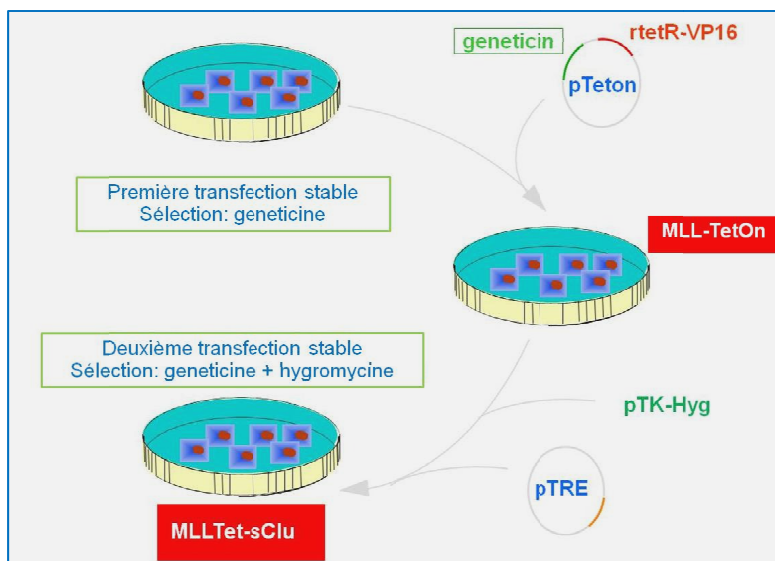
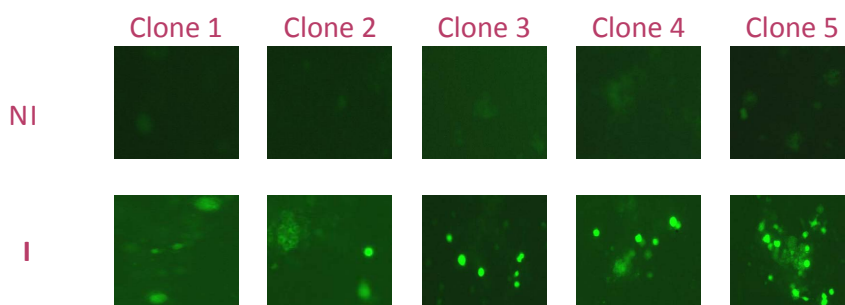


Figure III.2. Schéma représentant les étapes nécessaires à l'établissement de clones de double lignée stables inducibles pour l'expression de la clusterine.

Nous avons tout d'abord vérifié l'homogénéité de la population de cellules de chaque clone isolé, à l'aide du FACS. Ensuite, afin de sélectionner les lignées MLLTet-On les plus performantes, nous avons réalisé des transfusions transitoires avec le plasmide pTRE-EGFP codant pour la protéine (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) et nous avons étudié les niveaux d'expression de l'EGFP en l'absence et en présence de doxycycline au microscope à fluorescence. Parmi les 60 clones isolés, 20 clones se sont révélés positifs, seulement 5 d'entre eux induisaient l'expression de l'EGFP en présence de doxycycline et de manière inducible avec une expression basale faible (figure III.3). Nous avons également tenu compte de la mortalité cellulaire car l'intégration du plasmide est aléatoire au niveau du génome et pourrait perturber profondément la cellule.

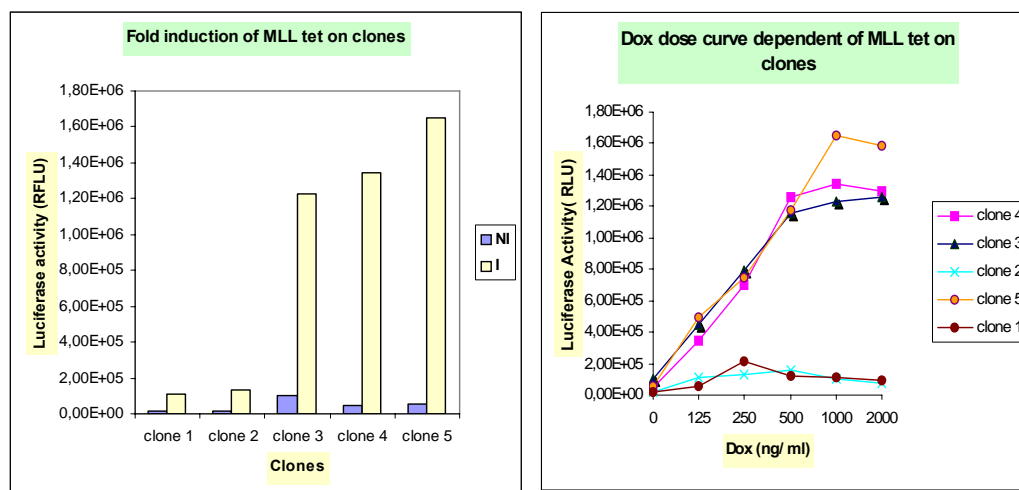




**Figure III.3. Criblage des clones MLLtetOn par microscopie à fluorescence.** Vues au microscope à fluorescence de différents clones positifs MLLtetOn à 48 h après transfactions transitoires du plasmide réponse pTRE-EGFP, en absence de doxycycline (NI) ou en présence de 2  $\mu$ M de doxycycline (I).

Pour comparer quantitativement le niveau d'induction de ces 5 clones, nous avons choisi le vecteur pTRE-Luc qui code pour la luciférase. Après transfection transitoires des différents clones et induction à l'aide de 2 $\mu$ M de doxycycline, les cellules ont été récupérées par trypsinisation après 48 heures. Après extraction et dosage des protéines, l'activité de la luciférase a été déterminée à l'aide de la trousse « *Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity* » (Roche).

De même que la dépendance de la production de luciférase en fonction de la dose de Dox a été vérifiée par la même procédure en induisant la synthèse de la luciférase à différentes concentrations de doxycycline (figure III.4).



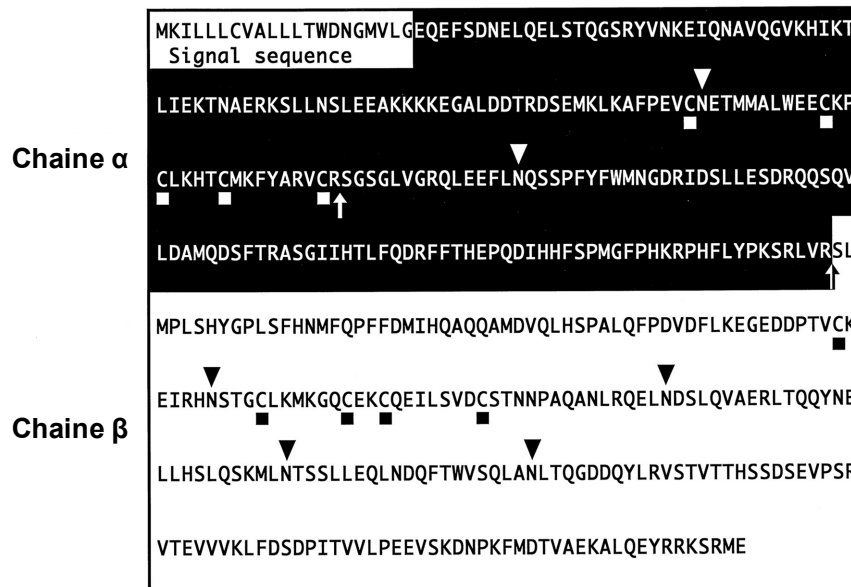
**Figure III.4. Etude de l'activité de la protéine régulatrice rtTA.** A : L'activité de la protéine régulatrice rtTA a été déterminée par mesure de l'activité de la luciférase dans les clones MLLTetOn (1, 2, 3,4 et 5), après 48 h de culture de ces clones, transfectés de manière transitoire avec le plasmide réponse pTRE-Luc, en absence (NI) ou en présence de 1 $\mu$ g/ml (2 $\mu$ M) Doxycycline (I). B : La dépendance de la dose de la doxycycline des clones MLLTetOn a été déterminée par mesure de l'activité de la luciférase de différents clones transfectés par pTRE-Luc et induites par 125ng, 250ng, 500ng et 1000ng/ml de doxycycline.

### 1.1.2. DÉVELOPPEMENT DES DOUBLES LIGNÉES STABLES PTET-ON PTRE

Afin de poursuivre l'établissement des doubles lignées stables, nous avons réalisé une deuxième transfection. Pour ce faire, nous avons ainsi choisi les cellules du clone 4 qui offre à la fois un niveau basal d'expression faible, un niveau d'induction élevé et une mortalité moindre.

Les cellules du clone 4 ont été co-transfectées à l'aide du plasmide de résistance à l'hygromycine B (pTK-hyg) avec les constructions suivantes: pTRE seul (pour le contrôle négatif) ou le pTRE-sClu dans un rapport 1/10, suivant le protocole habituel de lipofection déjà décrit dans la partie "V. Matériels et méthodes" paragraphe 2.5. Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été récupérées par trypsinisation et cultivées à raison de  $2 \times 10^5$  sur milieu sélectif (milieu complet + 400 µg/ml Hygromycine B) pendant un mois. 60 clones ont été isolés à l'aide de cylindres de clonage. L'homogénéité de la population de chaque clone a été vérifiée par cytométrie en flux.

Le cDNA codant pour la clusterine utilisé nous a été donné par le professeur Bettuzzi (Bettuzzi et al., 1989). Il code pour une protéine de séquence décrite par Lakins *et al.* (Lakins et al., 1998) représentée par la figure suivante :



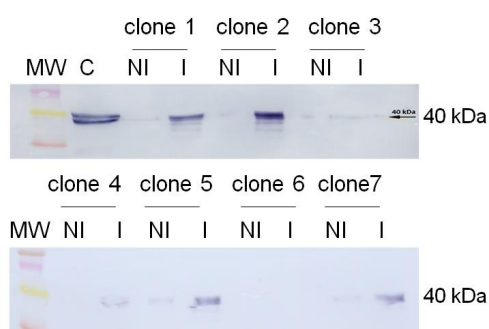
**Figure III.5. Représentation de la séquence d'acides aminés de la clusterine de rat et les sites de modifications post-translacionnels.** Les sites de glycosylations sont représentés par les triangles inversés, Les résidus cystéines nécessaires pour la formation des ponts disulfure sont représentés par des carrés et les sites potentiels de clivage Arg/Ser sont représentés par les flèches (D'après Lakins et al. 1998).



## SELECTION DES CLONES PTET-ON PTRE-SCLU STABLES ET INDUCTIBLES

Les clones MLL-pTet-on-pTRE-sClu appelés aussi MLLTet-sClu ont été choisis en fonction du niveau d'induction de l'expression de la clusterine. Celle-ci est estimée par la méthode du "Western Blotting".

Parmi les 60 clones résistants testés, seulement 6 expriment la protéine, à des niveaux différents (figure III.6).



**Figure III.6. Criblage des clones MLLTet-sClu par western blotting.** 20  $\mu$ l de milieu de culture de clones résistants à l'hygromycine après 48 heures en présence d'un microgramme par ml de doxycycline (NI) ou en absence (I) de doxycycline. 10  $\mu$ g de protéines totales de prostate de rat castré sont utilisés comme contrôle positif (C). Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 10%. La protéine a été détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la sous unité  $\alpha$  de la clusterine (Upstate) à 2  $\mu$ g/ml. NB ; L'ordre des clones 1-7 est l'ordre de screening et ne correspond pas aux clones 1, 2, 3 dans la suite des résultats, où les clones ont été classés par rapport au niveau d'expression de la CLU.

## 2. PARTIE 2 : CARACTÉRISATION DE LA LIGNÉE STABLE ET INDUCTIBLE POUR L'EXPRESSION DE LA SCLU

Nous avons montré par western blot que dans les trois clones qui exprimaient la sClu à un niveau intéressant, la protéine ne s'accumule pas dans le milieu intracellulaire. Même à l'aide d'un anticorps spécifique de la forme cytoplasmique (de chez Santa Cruz) et après une longue durée d'exposition lors de la révélation du signal par la méthode ECL (*enhanced chemiluminescent*), nous n'avons pu mettre en évidence qu'un très faible niveau de la clusterine dans le milieu intracellulaire. Cette expression n'est pas inductible et elle est aussi présente dans le contrôle négatif de la lignée transfectée avec le vecteur vide. Donc ceci semble ne pouvoir représenter que l'expression endogène de la clusterine dans la lignée parentale MLL. Les résultats sont illustrés par la figure 1 de l'article 1 (Ammar and Closset, 2008).



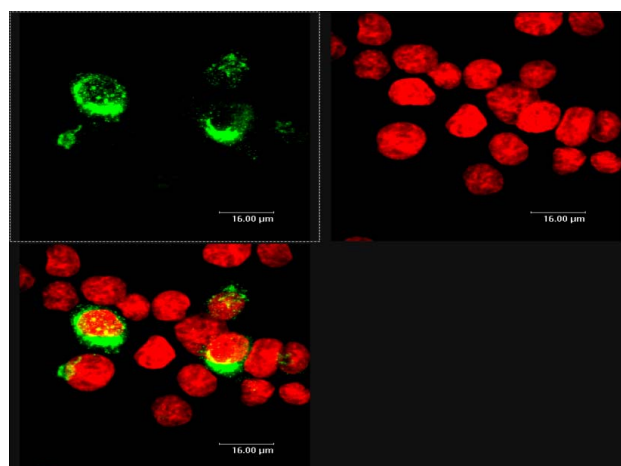
## 2.1. ETUDE DE LA RÉGULATION DE SCLU EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE LA DOXYCYCLINE

Parmi ces clones, nous avons choisi le clone 2 qui montre un niveau d'expression de la sCLU le plus élevé, pour la suite de notre travail. Nous avons confirmé par western blotting que l'induction de l'expression de la clusterine est dépendante de la dose de la doxycycline (illustré par la figure 2 de l'article 1 Ammar and Closset ,2008) (Ammar and Closset, 2008).

## 2.2. LOCALISATION DE LA SCLU DANS LES CELLULES MLLTET-SCLU PAR MICROSCOPIE CONFOCALE

Le but de notre travail étant d'étudier le rôle protecteur de la forme sécrétée de la clusterine sur l'apoptose, nous avons tout d'abord vérifié que les cellules sécrétant la clusterine n'accumulaient pas celle-ci dans le compartiment intracellulaire. Les expériences de microscopie confocale ont clairement montré une localisation de cette protéine au niveau apicale et en voie de sécrétion.

Les cellules MLLTet-sClu ont été cultivées sur une lame pendant 24h en absence ou en présence de 2 $\mu$ M de Dox. Après fixation au formaldéhyde (3%) dans du PBS, les cellules ont été lavées et saturées avec une solution PBS BSA 1% pendant 30 min. Ensuite les cellules ont été perméabilisées à l'aide d'un tampon phosphate contenant du triton X100 (0.005%), lavées avec du PBS et incubées avec un anti-clusterine de rat, spécifique de la sous unité alpha à la dilution de 1/200 et révélées avec un anti-immunoglobuline G de souris couplé au FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) lui-même révélé par un filtre FITC au microscope confocale Leica. Les résultats sont illustrés ci-dessous par la figure III.7.



**Figure III.7. Vue au microscope confocale de la lignée MLLTet-sClu.** Localisation de la clusterine (en vert) dans les cellules MLLTet-sClu induite par un 1 $\mu$ g/ml de Dox à l'aide de l'anticorps anti rat  $\alpha$ -clusterin et d'un anti-souris-FITC. Les noyaux sont contre colorés avec TOPRO-3 3 $\mu$ M. Les images sont acquises à une résolution 1024x1024 pixels avec des objectifs à immersion (à l'eau) en utilisant un microscope confocal Leica model TCS-SP2.



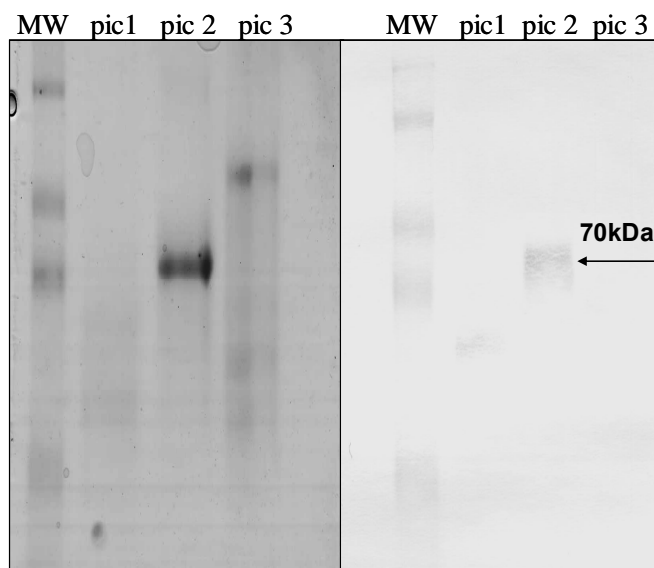
### 2.3. ETUDE DE LA PROLIFÉRATION DES CLONES MLLTET-SCLU

Nous avons étudié les effets de la forme secrétée de la clusterine sur les cellules cancéreuses prostatiques dans les différents clones isolés comparativement aux cellules non transformées et au contrôle négatif.

Nous avons montré que la surexpression de la sCLU n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire. Ces résultats sont représentés par la figure 3 de l'article 1 (Ammar and Closset, 2008).

### 2.4. PURIFICATION DE LA CLUSTERINE

La clusterine a été purifiée à partir du sérum de rat (250ml) selon un protocole inspiré de la méthode de Fritz (Fritz et al., 1983). Plusieurs étapes supplémentaires ont été insérées au début de la purification (Chromatographies sur protéine A ; Blue-Sepharose ; Con A Sepharose.) et en fin de purification (Chromatographie sur monoQ) et Séphacryl S200. Le pic 2, majoritaire lors de l'éluion de la monoQ par un gradient linéaire de 0,02 M à 0,3M en NaCl en tampon Tris-HCl pH 8.5 contient la clusterine à un niveau de pureté élevé comme le montrent l'électrophorèse en conditions dénaturantes en présence de SDS et non réductrices (en absence de mercaptoéthanol) et le Western Blotting repris ci-dessous (figure III.8).



**Figure III.8. Détection de la clusterine après purification de la protéine à partir du sérum de rat.** Analyse par électrophorèse des éluats correspondant aux pics du profil chromatographique sur mono Q et après concentration. 20µl de chaque échantillon a été dénaturé dans le tampon de chargement en absence de mercaptoéthanol et les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel PAGE avec son gradient 4-12% d'acrylamide. Le gel a été coloré au bleu de comassie. Un même duplicat de gel a été utilisé pour analyser les protéines par western Blotting. La clusterine a été détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal (Upstate) reconnaissant la forme longue de la protéine.

### 3. PARTIE 3: ETUDE DES EFFETS DE SURVIE DE LA SUREXPRESSION DE LA SCLU DANS LES CELLULES CANCÉREUSES PROSTATIQUES ANDROGÉNO-INDÉPENDANTES ET CIBLAGE DE SON MÉCANISME D'ACTION

La deuxième et la troisième partie de notre travail ont fait l'objet du premier article intitulé :

**« *Clusterin activates survival through the phosphatidy-3 kinase/Akt pathway* »**

**(Ammar and Closset, 2008).**

A l'aide des trois clones stables et inductibles surexprimant la sCLU à des niveaux différents en utilisant comme contrôle négatif, des cellules transfectées avec le vecteur vide, nous avons montré que :

- ✓ La surexpression de la sCLU n'affecte pas la prolifération cellulaire des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses.
- ✓ La surexpression de sCLU est à l'origine de la résistance des cellules MLLTet-sClu à l'apoptose induite par TNF $\alpha$ /Act D. Nous avons aussi montré que cet effet de survie dépend de la quantité de clusterine produite dans le milieu extracellulaire.

Pour confirmer et affiner ces résultats, nous avons utilisé à la fois la protéine produite dans le milieu de culture des cellules induites et la clusterine exogène purifiée à partir du sérum de rat (selon la méthode décrite par (Fritz et al., 1983)). Ces données recueillies nous ont convaincus d'un mécanisme d'action extracellulaire de la clusterine et nous ont amenés à nous intéresser à la mégaline, récepteur de la clusterine. La mégaline ou gp330 est une protéine membranaire décrite comme récepteur endocytaire de la clusterine dans les cellules thyroïdiennes, les cellules rénales et dans le cerveau. Nous avons mis en évidence par immuno-précipitation que la mégaline interagit avec la sous unité  $\alpha$ . Nous avons montré par des techniques de RT-PCR et de western blotting que ce récepteur est surexprimé au niveau mRNA et protéique dans les cellules épithéliales prostatiques produisant la clusterine. Ce récepteur est phosphorylé sur le résidu tyrosine en position 4573 comme l'ont révélé les Western Blotting réalisés à l'aide d'un anti-peptide 4564-4579 phosphorylé, développé au sein de notre laboratoire.

Cette phosphorylation dépend de la PI3-kinase puisque le traitement des cellules à la wortmannin entraîne une diminution de la phosphorylation qui peut atteindre une inhibition complète pour une dose de 25ng/ml administrée pendant 8h.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux deux voies de survie majeures impliquées dans la résistance des cellules tumorales. Nous avons montré que la surexpression de la sCLU stimule la voie de survie Akt mais n'a aucun effet sur la voie NF kappa B. Ces observations ont établi un lien entre la surexpression de la clusterine et l'activation de la voie Akt. L'activation de la



phosphorylation de l'Akt, conduit à la phosphorylation de Bad. Ce dernier inhibe la formation de mégapores au niveau de la mitochondrie et bloque la libération du cytochrome c. Lors de cette étude, nous avons montré que ce mode d'action n'est cependant pas l'unique mécanisme par lequel la clusterine protège les cellules de la mort cellulaire programmée. En effet, l'inhibition de la PI3 kinase par la wortmannin en absence de production de sCLU induit une mort totale de la population cellulaire alors que 40% des cellules surexprimant la sCLU échappent à l'apoptose induite par TNF $\alpha$  après un traitement à la wortmannin. Cette observation nous a amenés à orienter notre travail vers la recherche des facteurs qui pourraient expliquer les effets protecteurs de la clusterine en présence d'inhibiteur de la PI3-kinase. Les résultats de cette recherche font l'objet de la quatrième partie de ce travail.

# Clusterin Activates Survival through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway\*

Received for publication, January 16, 2008, and in revised form, March 5, 2008. Published, JBC Papers in Press, March 5, 2008, DOI 10.1074/jbc.M800403200

Hayet Ammar<sup>1</sup> and Jean L. Closset<sup>2</sup>

From the Biochemistry Department, Institute of Pathology B23, Avenue de l'Hôpital, 3, University of Liège, Liège 4000, Belgium

Clusterin is, in its major form, a secreted heterodimeric disulfide-linked glycoprotein (75–80 kDa). It was first linked to cell death in the rat ventral prostate after androgen deprivation. Recent studies have demonstrated that overexpression of clusterin in prostatic cells protects them against tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induced apoptosis. However the details of this survival mechanism remain undefined. Here, we investigate how clusterin prevents cells from undergoing TNF $\alpha$ -induced apoptosis. We established a double-stable prostatic cell line for inducible clusterin by using the Tet-On gene expression system. We demonstrated that 50% of the cells overexpressing clusterin escaped from TNF $\alpha$ - and actinomycin D-induced cell death. Moreover we demonstrated that the incubation of MLL cells with conditioned medium containing the secreted clusterin or the supplementation of purified clusterin in the extracellular medium decreased the TNF $\alpha$ -induced apoptosis significantly. This extracellular action implicates megalin, the putative membrane receptor for clusterin to mediate survival. Indeed clusterin overexpression up-regulated the expression of megalin and induced its phosphorylation in a dose-dependent manner. We interestingly showed that clusterin overexpression is associated with the up-regulation of the phosphorylation of Akt. Activated Akt induced the phosphorylation of Bad and caused a decrease of cytochrome *c* release. These results enable us to pinpoint one mechanism by which secreted clusterin favors survival in androgen-independent prostate cancer cells, implicating its receptor megalin and Akt survival pathway.

Clusterin, also known as testosterone-repressed message-2, is overexpressed in the rat prostate during castration-induced programmed cell death (1). Clusterin overexpression reaches a maximum 3–4 days post-castration and coincides with the onset of massive cell death (2). The clusterin level also rises in various tissues during cell death responses (3–5). As clusterin is present during apoptosis, it was initially viewed as a cell death inducer, but other studies suggest that clusterin overproduction occurs in resistant cells (6, 7). Thus, clusterin has been described as an anti-apoptotic factor, and it has also been implicated in prostate cancer progression to androgen independence

(8). Miyake *et al.* (9) have demonstrated that the overexpression of clusterin in human androgen-responsive prostate cancer cells LNCaP by stable transfection rendered them highly resistant to androgen ablation, and the introduction of antisense testosterone-repressed message-2 oligodeoxynucleotide therapy in the Shionogi tumor model induces apoptosis and tumor regression. Moreover small interference RNA-mediated clusterin gene silencing in osteosarcoma and prostate cancer induces significant reduction of cellular growth and increases cellular apoptosis (10, 11).

Clusterin is a sulfated glycoprotein encoded by a single gene. It has two known isoforms obtained by alternative splicing (12). The first isoform, secretory clusterin (sClu)<sup>3</sup> is obtained by translation from the first AUG. The translation product of the clusterin gene is a polypeptide of 449 amino acids, where the first 22 amino acids represent the classical hydrophobic secretory signal sequence. Maturation of the primary translation molecule includes disulfide bonding, conversion to a high mannose endoplasmic reticulum-associated form of 60 kDa, extensive additional *N*-linked glycosylation, and finally, proteolytic cleavage in the *trans*-Golgi compartments that results in the mature secreted heterodimeric clusterin protein form of 70–80 kDa. The other clusterin isoform is the nuclear form (nClu) of 55-kDa, which originates after apoptosis induction from a 49-kDa primary product that is translated from an alternatively spliced Clu transcript.

The elucidation of the function of clusterin after stress induction is clearly complicated by the discovery of the two isoforms of the protein. These isoforms explain in part the conflicting results for clusterin function in different laboratories. Many studies have demonstrated that overexpression of the nClu acts as a prodeath signal, inhibiting cell growth and survival (12, 13). However, other studies (14–16) have shown that the expression of the secreted form exerts cytoprotective properties. Despite growing evidence that the secreted clusterin acts as an anti-apoptotic factor and plays an important role in resistance to chemotherapeutic drugs (17), the molecular mechanism of clusterin-mediated survival signaling in cancer cells is not completely understood. Clusterin has long been viewed as a chaperone exerting its survival effect and cryopro-

\* This work was supported in part by the Fonds National de la Recherche Scientifique. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> A beneficiary of a "Télévie" research grant.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel. 32-43-66-24-24; Fax: 32-43-66-45-85; E-mail: jclosset@ulg.ac.be.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: sClu, secretory clusterin; nClu, nuclear clusterin; TGF, tumor growth factor; MLLTet-sClu, MatLyLu stable for the tetracycline transactivator factor and the secreted form of the clusterin; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; NF $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; EGFP, enhanced green fluorescent protein; Luc, luciferase; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; BrdUrd, bromodeoxyuridine; FACS, fluorescence-activated cell sorter; IKK, inhibitor  $\kappa$ B kinase; I $\kappa$ B, inhibitor  $\kappa$ B; IAP, inhibitor of apoptosis; Dox, doxycycline.

## Study of Clusterin Survival Effect

tective function by at least two mechanisms: by increasing the solubility of denatured proteins and by mediating uptake and degradation of a broad spectrum of hydrophobic denatured aggregated molecules (18, 19).

Although clusterin has long been proposed to participate in cell survival and it has been extensively studied to inhibit TNF $\alpha$  apoptosis, no studies have been carried out to investigate the link between clusterin and survival signaling pathways. Here we have established and characterized a model cell line showing inducible production of the secreted form of clusterin, to study how this protein can protect cells against tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induced apoptosis. We have shown that when overexpressed or added in the culture medium, clusterin protects the MLLTet-sClu cell line from TNF $\alpha$ -induced apoptosis.

On the one hand we have studied how the overexpression of the secreted clusterin affects two major survival pathways that might be stimulated during TNF $\alpha$ -induced apoptosis. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (protein kinase B) pathway, one of the major survival pathways in the cell that is often constitutively activated in advanced stages of prostate cancer (20–22), and the NF $\kappa$ B survival pathway, known to enhance the proliferation and growth of many tumor cells, have been shown to increase activity in LNCaP cells to promote cell survival (23). On the other hand, we have studied the clusterin putative receptor, megalin (also called gp330), a 600-kDa membrane protein participating in debris-dependent clusterin internalization (24).

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—The oligonucleotides were synthesized by Invitrogen Life Technology (Grand Island, NY). Peptides used to generate antibodies were synthesized by Neosystem (Strasbourg, France). Antibody against a synthetic C-terminal megalin peptide (CEDTFKTNLVKEDSDV (25) and an N-terminal cysteine residue for conjugation to keyhole limpet hemocyanin) was prepared in rabbits at the Animal Facilities of the University of Liège. The antiphosphorylated megalin was generated in rabbits against a synthetic peptide (4569–4579 sequence of rat megalin plus the N-terminal cysteine residue for conjugation to keyhole limpet hemocyanin).

**Cell Culture Conditions**—The rat prostate cell line Dunning R3327 MAT LyLu was kindly provided by Dr. De Coster (Beerse, Belgium). Cells were maintained in RPMI supplemented with 10% Tet-System-approved fetal bovine serum (Tet-free FBS, Clontech, Palo Alto, CA), 50 units/ml penicillin (Invitrogen), and 50  $\mu$ g/ml streptomycin (Invitrogen).

**Expression Vectors and Generation of Transfected Cell Lines**—The Tet-On System (Clontech), a modification of the tetracycline-controlled transcription activation system developed by Gossen and Bujard (26), was chosen to induce the conditional oversynthesis of clusterin by doxycycline (Dox). This system includes (i) the regulator plasmid pTet-On, expressing the gene coding for the reverse tetracycline-responsive transcriptional activator protein (under the control of the strong cytomegalovirus promoter) and the neomycin-resistance gene allowing selection of stably transformed cells in the presence of G418 (Geneticin); (ii) the response plasmid pTRE, containing the tetracycline-responsive element (TRE), into which the gene of

interest was cloned. Because plasmid pTRE does not have a selectable marker, cells have to be cotransfected with pTK-HYG to permit selection of stable transformants by growth in the presence of hygromycin; (iii) two plasmids, pTRE-EGFP (containing a gene coding for an enhanced green fluorescence protein) and pTRE-Luc (a luciferase expression vector), provided an essential control in screening process of clonal cell lines. Plasmid pTRE-sClu contains, at its EcoRI site, the complete open reading frame of clusterin, excised from the pSB28 plasmid (kindly provided by Dr. S. Bettuzzi (1)) by means of the EcoRI.

For transfection the Lipofectamine PLUS<sup>TM</sup> reagent (Invitrogen) was used.  $3 \times 10^6$  MAT LyLu cells were transfected with 3  $\mu$ g of pTet-On. After a 24-h culture, cells were trypsinized and seeded into 10-cm dishes ( $2 \times 10^5$  cells/dish). 24 h later, cells were cultured in a medium containing 400  $\mu$ g/ml G418 (Geneticin, Invitrogen) for 4 weeks. G418-resistant cells were isolated with a Freshny cylinder, and the activity of the transactivator system was estimated by transient transfection with pTRE-EGFP or pTRE-Luc. Clones showing the most intense green fluorescence in the presence of 2  $\mu$ M Dox (a tetracycline derivative (Sigma-Aldrich)) were transiently transfected with pTRE-Luc to allow selection of the clone with the lowest basal expression level.

$3 \times 10^6$  cells of MLLTet were selected and cotransfected with 10  $\mu$ g of pTRE-sClu or the empty vector pTRE (used as negative control) and 1  $\mu$ g of pTK-HYG. Transformants were cultured with 800  $\mu$ g/ml hygromycin (Invitrogen) for 15 days. Surviving clones were then tested for Dox-inducible clusterin synthesis by Western blot analysis as described below, using a monoclonal antibody against clusterin (Upstate, Charlottesville, VA).

**Growth Rate Analysis**—MAT Ly Lu (MLL) and MLLTet-sClu cells were seeded at  $10^5$  cells per 35-mm diameter dish in RPMI containing 10% Tet-free FBS replaced 24 h later with medium containing 0.1% or 10% Tet-free FBS with or without Dox. The culture medium was replaced every 24 h. At daily intervals cells were detached with trypsin-EDTA (Calbiochem, San Diego, CA), stained with Trypan Blue (Sigma), and counted with a hemocytometer in triplicate.

**MTT Cell Viability Assay**—The MTT assay is based on the ability of viable mitochondria to convert MTT, a soluble tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide), into a formazan precipitate, which is then dissolved in DMSO and quantified by spectrophotometry at 570 nm (27). MLL or MLLTet-sClu cells were seeded into 96-well dishes (3000 cells per well) in RPMI containing 10% Tet-free FBS and incubated for 48 h in the presence of varying concentrations of exogenous clusterin purified from rat serum as described below. Apoptosis was induced by adding 50 ng/ml TNF $\alpha$  (Roche Applied Science) and 4  $\mu$ g/ml actinomycin D (Sigma) for 24 h. The cells were then tested for MTT conversion, and cell viability was estimated as the amount of MTT dye converted relative to that of control cells.

**Cell Proliferation**—Cell proliferation was quantified by measuring bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation during DNA synthesis using the Cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Roche Applied Science). The experiments were performed according to the manufacturer's protocol.

**Apoptosis**—Cells were seeded into 6-well plates. Clusterin production was induced with 2  $\mu\text{M}$  Dox (control cells and cells where induction was not desired were cultured without Dox). Following treatment with 50 ng/ml TNF $\alpha$  and 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  actinomycin D for 24 h, the number of apoptotic, necrotic, and viable cells was determined using an Annexin V-fluorescein isothiocyanate detection kit (MEBCYTO-Apoptosis kit, MBL, Immunosources, Halle-Zoersel, Belgium). Briefly, cells were trypsinized, washed with phosphate-buffered saline, and stained with annexin V and propidium iodide (PI) for 15 min at room temperature. Stained cells were quantified using a fluorescence-activated cell sorter (FACSCalibur, BD Biosciences) and CellQuest software (BD Biosciences). Apoptosis is often analyzed using fluorescent annexin conjugates to detect phosphatidylserine on the plasma membrane. The PI is a fluorescent vital dye that stains DNA. It does not cross the plasma membranes that are viable or in the early stages of apoptosis, because they maintain plasma membrane integrity and are permeable to PI. Annexin V binds to cells early in apoptosis and continues to be bound through cell death. PI is used to distinguish cells that are in the earlier stages of apoptosis (Annexin-positive and PI-negative) from those that are in later stages of apoptosis or already dead (necrosis, Annexin-positive and PI-positive). Each experiment was performed three times.

**RNA Isolation and Reverse Transcription-PCR**—Total RNA from induced and uninduced cells was isolated by a single-step guanidium thiocyanate method with Tri-Pure reagent. A 2- $\mu\text{g}$  aliquot of RNA was reverse-transcribed for 45 min at 40  $^{\circ}\text{C}$  in the presence of 1  $\mu\text{g}$  of random hexamers (Promega, Madison, WI) in a total volume of 20  $\mu\text{l}$ . PCR mixtures contained 2  $\mu\text{l}$  of reverse transcriptase (200 units/ $\mu\text{l}$ , Promega) in a total volume of 25  $\mu\text{l}$ . Serial cDNA dilutions (1:1 to 1:100) were amplified for 20 cycles with sense (5'-ATTGCCGATAGTGATGACCT-3') and antisense (5'-CGTGAAGATGACCCAGAT-3')  $\beta$  actin primers using an annealing temperature of 59  $^{\circ}\text{C}$ . Dilutions yielding equal amounts of product were amplified for 35 cycles with sense (5'-GGTGTGTGACGAGGAT-3') and antisense (5'-AGTTGCAATTGCGCTCATCG-3') megalin primers, and clusterin was amplified for 28 cycles with sense primers (5'-TGCATGAAGTTCTACGCACG-3') and antisense (5'-TTGTTGGTTCGAACAGTCCAC-3'). The products of the PCR were separated by 1% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

**Rat Clusterin Purification**—Rat clusterin was purified as follows. Rat serum (200 ml) was chromatographed on 1.5 liters of AFFI-Gel blue (Bio-Rad, Richmond, CA), the non-adsorbed fraction was loaded onto a Protein A-Sepharose column (50 ml, Amersham Biosciences); the non-adsorbed fraction from this column was precipitated with ammonium sulfate at 75% saturation and further purified out by ConA-Sepharose chromatography followed by ion-exchange chromatography (pH 9.5, 0.01 M sodium glycinate) on a fast-flow DEAE-Sepharose column (15 ml). Fractions containing clusterin were pooled and finally purified out by gel filtration (Sephacryl S200 in phosphate-buffered saline). Chemical purity was assessed by 4–12% SDS-PAGE and Western blotting.

**Western Blot Analysis**—Cells were cultured for 48 h in medium containing 10% Tet-free FBS, with or without Dox

(final Dox concentration as indicated). The cells were washed twice with phosphate-buffered saline. Total cell extracts were prepared by sonication for 20 s in 100  $\mu\text{l}$  of ice-cold buffer (50 mM Tris, pH 7.4) containing 10% SDS. The homogenates were centrifuged (15,000  $\times g$ ) for 10 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ , and the supernatants were collected. The bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce) was used to determine the protein content of each lysate. Samples were heated at 100  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min, electrophoresed through 12% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences). Clusterin was immunodetected by using either a monoclonal anti-clusterin antibody under nonreducing conditions, recognizing the complete 80-kDa protein (Upstate) or an anti-clusterin  $\alpha$ -chain antibody recognizing the 40-kDa  $\alpha$  subunit (Upstate) or the goat polyclonal anti-clusterin (SC-6419, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by incubation with an anti-mouse or the anti-goat Ig G coupled to horseradish peroxidase. 4-Chloro-1-naphtol was used as a substrate according to the supplier's instructions or alternatively the ECL (enhanced chemiluminescence) kit (Sigma-Aldrich) was used for the detection.

For cytochrome *c* Western blot analysis, 50  $\mu\text{g}$  of cytosolic protein extract, obtained as described by Yang *et al.* (28), was resolved by 14% Tris-glycine PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with a monoclonal anti-cytochrome *c* antibody (BD Pharmingen, San Jose, CA), and immunoreactive bands were visualized as described above.

**Immunoprecipitation**—After treatment, cells were washed once with phosphate-buffered saline. Then 1.5-ml ice-cold lysis buffer (25 mM Hepes, pH 7.7, 75 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol, 20 mM  $\alpha$ -glycerophosphate) containing 1 $\times$  complete protease inhibitors (Roche Applied Science), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and the phosphatase inhibitors  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM) and NaF (50 mM) was added, and the cells were then incubated at 4  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Cells were disrupted by repeated aspirations through a 21-gauge needle and transferred to a 2-ml microcentrifuge tube. Cell debris was pelleted by centrifugation at 10,000  $\times g$  for 10 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Supernatants were precleared by adding 1  $\mu\text{g}$  of normal rabbit IgG and protein G/A-agarose (Amersham Biosciences). The resulting supernatants were incubated with antibody for 2 h at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Then 25  $\mu\text{l}$  of protein G/A-agarose were added to the mixture, and the mixture was incubated overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Immunoprecipitates were collected by centrifugation and washed four times with lysis buffer. Finally the pellets were resuspended in 40  $\mu\text{l}$  of 1 $\times$  electrophoresis sample buffer and analyzed by Western blotting.

**Immunoprecipitation and Activity Assay of I $\kappa$ B Kinase (IKK)**—For the IKK assay, 10<sup>6</sup> MLLTet-sClu cells cultured in T-75 flasks with or without 2  $\mu\text{M}$  Dox for 48 h were treated for 10 min either with 50 ng/ml TNF $\alpha$  (Roche Applied Science), 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  actinomycin D (Sigma), or both (each flask was treated separately). Then cells were collected with 400  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.6, 250 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The kinase from protein extracts (500  $\mu\text{g}$  of protein/sample) was immunoprecipitated with 2  $\mu\text{g}$  of anti-IKK  $\alpha$  mono-

## Study of Clusterin Survival Effect

clonal antibody (Sanvertech, Santa Cruz Biotechnology), and the resulting complex was incubated with protein A-agarose beads overnight at 4 °C (the beads were prewashed four times with lysis buffer). The *in vitro* kinase assay was performed by incubating the mixture at 30 °C for 30 min in a reaction buffer containing 1  $\mu$ g of GST-I $\kappa$ B $\alpha$ -(1–55) (as substrate) and 100  $\mu$ M ATP in ice-cold kinase buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM  $\alpha$ -glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>). The kinase reaction was stopped by adding 2 $\times$  SDS sample buffer, and the products were electrophoresed on a 10% SDS-PAGE gel and transferred on a cellulose nitrate membrane. The phosphorylated I $\kappa$ B was detected by, using a monoclonal anti-phosphoserine 32–36-I $\kappa$ B (Westburg, Allison Park, PA) followed by horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. The immunoreactive band was then revealed by ECL reagents (Amersham Biosciences).

**Electrophoretic Mobility Shift Assay**—Polynucleotide kinase (Promega) and [<sup>32</sup>P]ATP were used to label a DNA fragment corresponding to the NF- $\kappa$ B consensus sequence. The nuclear extracts obtained as described by Caccamo *et al.* (29) (10  $\mu$ g) were incubated for 10 min in gel-shift binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM dithiothreitol, 250 mM NaCl, 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l poly(dI:dC), 20% glycerol) and for 20 min at room temperature with the labeled fragment was added (radioactivity exceeding 50,000 cpm/ml). The samples were then resolved on a 6% polyacrylamide gel in 0.5  $\times$  Tris borate/EDTA buffer at 200 V. The gels were dried and developed by autoradiography.

## RESULTS

**Establishment and Characterization of a MATLyLu Cell Line Displaying Doxycycline-inducible Clusterin Synthesis**—We first developed three double-stable MLL cell line clones displaying inducible clusterin synthesis. To this end, we used the Tet-On System kit (Clontech), a modification of the system developed by Gossen and Bujard (26), in which a gene coding for a tetracycline-regulated transcription activator and the gene to be studied are sequentially introduced into a cell line. Two consecutive stable transfections were carried out to create a “double-stable” cell line containing integrated copies of both the regulator plasmid pTet-On and the vector (pTRE-sClu). The first step led to establishing a Tet-On MLL cell line. The screening method consisted of transient transfection with pTRE-EGFP and identification of transfectants by fluorescence microscopy. We identified five clones showing inducible high level synthesis of the green fluorescent protein. These MLLTet clones were then transiently transfected with pTRE-Luc, and luciferase activity was measured. The “best” clone, *i.e.* the clone showing a high level of luciferase activity in the presence of Dox and the lowest basal level in the absence of this antibiotic, was stably transfected with pTRE-sClu or with the empty vector to establish a negative control. Sixty hygromycin-resistant clones were analyzed by Western blotting to detect clusterin. We identified three positive clones displaying different levels of clusterin production. Clusterin was detected in the culture medium of the Dox-induced MLLTet-sClu clones (Fig. 1). It appeared as a 40-kDa band under reduced conditions and an 80-kDa band under unreduced conditions. PAGE-resolved total protein

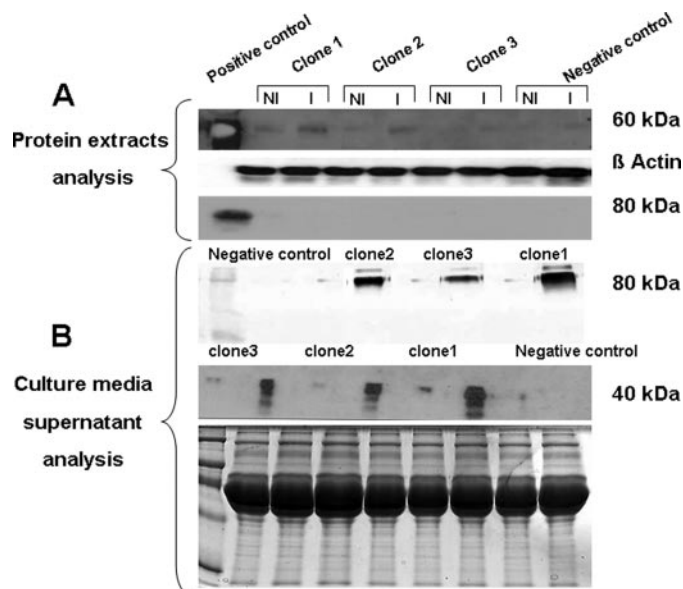


FIGURE 1. *A*, inducible synthesis of clusterin in transformed MAT LyLu cell clones. Western blot analysis of 100  $\mu$ g of proteins extracts of NI (cells cultured without Dox) or I (cells cultured with 2  $\mu$ M Dox for 48 h) cells of different clones, with a monoclonal anti-clusterin antibody (Upstate) recognizing a band at 80 kDa or with the Santa Cruz Biotechnology anti-clusterin recognizing a band at 60 kDa, immunoblotting hybridized with the anti- $\beta$  actin show the equal amount of proteins loaded. *B*, immunoblotting of the culture medium of MLLTet-sClu cells of clones 1–3 (*clone1*, -2, and -3) for 48 h in the presence of 2  $\mu$ M of Dox (I) or not probed with anti clusterin recognizing the long form at 80 kDa or the  $\alpha$  chain 40 kDa. The Coomassie-stained gel is provided to show the equal amount of protein samples.

extracts of MLLTet-sClu cells showed no immunoreactive band upon treatment with both upstate anti-clusterin antibodies, whether the cells were induced with 2  $\mu$ M Dox or not. Even with the Santa Cruz Biotechnology antibody we have detected only a slight intracellular form when we have used the sensitive system of detection ECL after 10 min of exposition. These results show that the intracellular form is present but at a very low concentration compared to the secreted form, so we can deduce that our inducible cell line is a model where the major induced clusterin is secreted (Fig. 1). We can conclude that MLLTet-sClu cells represent a suitable model for studying the effects of the long form of this sulfated glycoprotein. The clone (*Clone1*) that expressed clusterin at a high level for which results are shown in Fig. 2 displayed Dox dose-dependent clusterin production. When cells were treated with 2  $\mu$ M Dox, production increased with the incubation time; the negative control clone (cells transfected with the empty vector) incubated for the same length of time in the presence of Dox did not show any accumulation of clusterin in the media (Fig. 2B).

**Effect of Clusterin Overexpression on MAT LyLu Cell Growth and Proliferation**—We next compared the growth of induced and uninduced MLLTet-sClu cells cultured in the presence of Dox (doses tested: 0.2, 1, 2, and 4  $\mu$ M) for 72 h. Overproduction of clusterin had no cytotoxic effects. It did not affect cell viability, and it did not induce apoptosis (data not shown).

Cell counting and BrdUrd incorporation measurements did show somewhat reduced cell proliferation upon treatment with 2  $\mu$ M Dox, as compared with cells maintained without Dox for 48 h. This effect was not due to the overexpression of clusterin, because the parental epithelial cells maintained in the presence



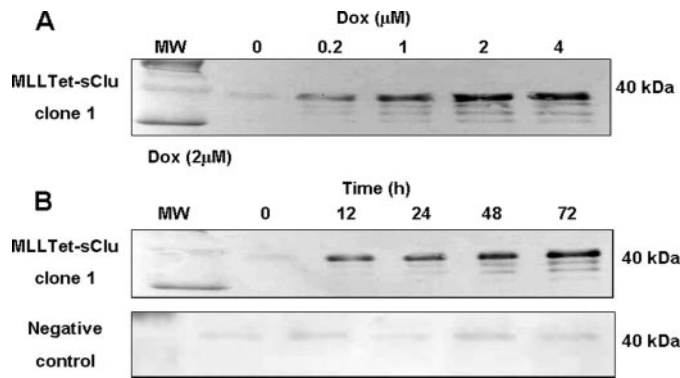


FIGURE 2. *A*, inducible synthesis of the secreted form of rat clusterin in transformed MAT LyLu cells. Western blot analysis, with a monoclonal anti- $\alpha$ -clusterin antibody, of the culture medium of MLLTet-sClu cells maintained for 48 h in the presence of increasing concentrations of Dox. *B*, time course of Dox-induced clusterin production in MLLTet-sClu cells. Western blot analysis was performed as in *A* on culture medium collected after treatment with 2  $\mu$ M Dox for various additional times. The negative control clone (cells transfected with the empty vector) incubated at the same time in the presence of Dox did not show any accumulation of clusterin in the media with time incubation. The Western blots shown in *A* and *B* were probed with a monoclonal anti- $\alpha$ -clusterin antibody, revealed a band at 40 kDa. Lane MW, molecular mass markers (14.3–220 kDa; Amersham Biosciences). The figure is representative of three experiments.

or absence of Dox showed similar proliferation (Fig. 3). We compared the proliferation rate of three clones overexpressing clusterin at a different level compared with the negative control we did not see significant effect on cell proliferation depending on the amount of clusterin synthesis. Also in Fig. 3 the proliferation rate of MLLTet-sClu clone 1 at different concentrations of Dox did not show any clusterin related effect.

**Secreted Clusterin Protects MLLTet-sClu Cells against TNF $\alpha$ -induced Apoptosis in a Dose-dependent Manner**—In the absence of Dox, treatment of MLLTet-sClu cells with 50 ng/ml TNF $\alpha$  and 4  $\mu$ g/ml actinomycin D resulted in a significant percentage of cell death. After 24 h, ~60% of the treated cells, on average, were in early apoptosis (low PI staining) or late apoptosis (high PI staining). This cytotoxic effect was greatly alleviated when the MLLTet-sClu cells were pretreated for 24 h with 2  $\mu$ M Dox: in this case, only 10% of the cells were found to die by apoptosis. The observed differences in resistance to TNF $\alpha$  treatment may thus reflect the ability of clusterin to delay the onset of apoptosis (Fig. 4A). We have also demonstrated that the clones displaying clusterin at different levels display differential sensitivity to the apoptotic effect of TNF $\alpha$  and actinomycin D, whereas the clone transfected with the empty vector did not show any protection effect. We can easily note that the difference in percentage of protection between the clones is in correlation with the quantity of clusterin produced in the media (Fig. 4C). We also studied the dose dependence of the observed cytoprotection. MLLTet-sClu cells were incubated without or with Dox (tested concentrations: 0.2, 0.5, 1, and 2  $\mu$ M) for 24 h. The cells were treated with 50 ng/ml TNF $\alpha$  and 4  $\mu$ g/ml actinomycin D for 24 h, collected, and analyzed by FACS after staining with Annexin V and propidium iodide. Fig. 4B shows that the higher the dose of Dox, the lower the percentage of apoptosis. Because Dox exerts no cytotoxic effect *per se* and because the amount of clusterin produced is Dox dose-

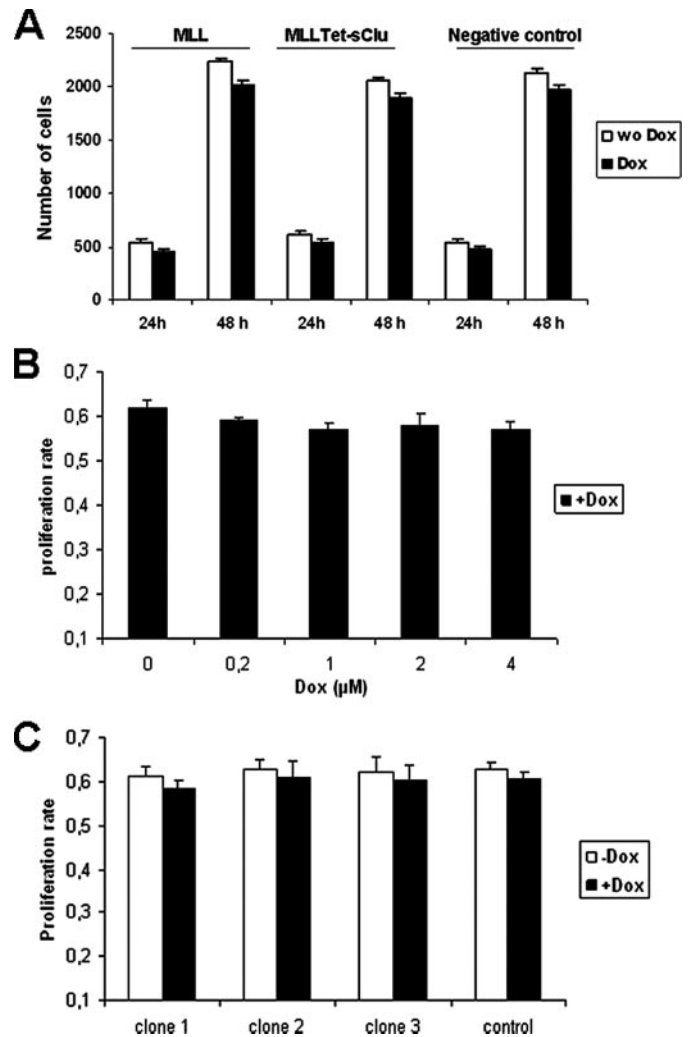
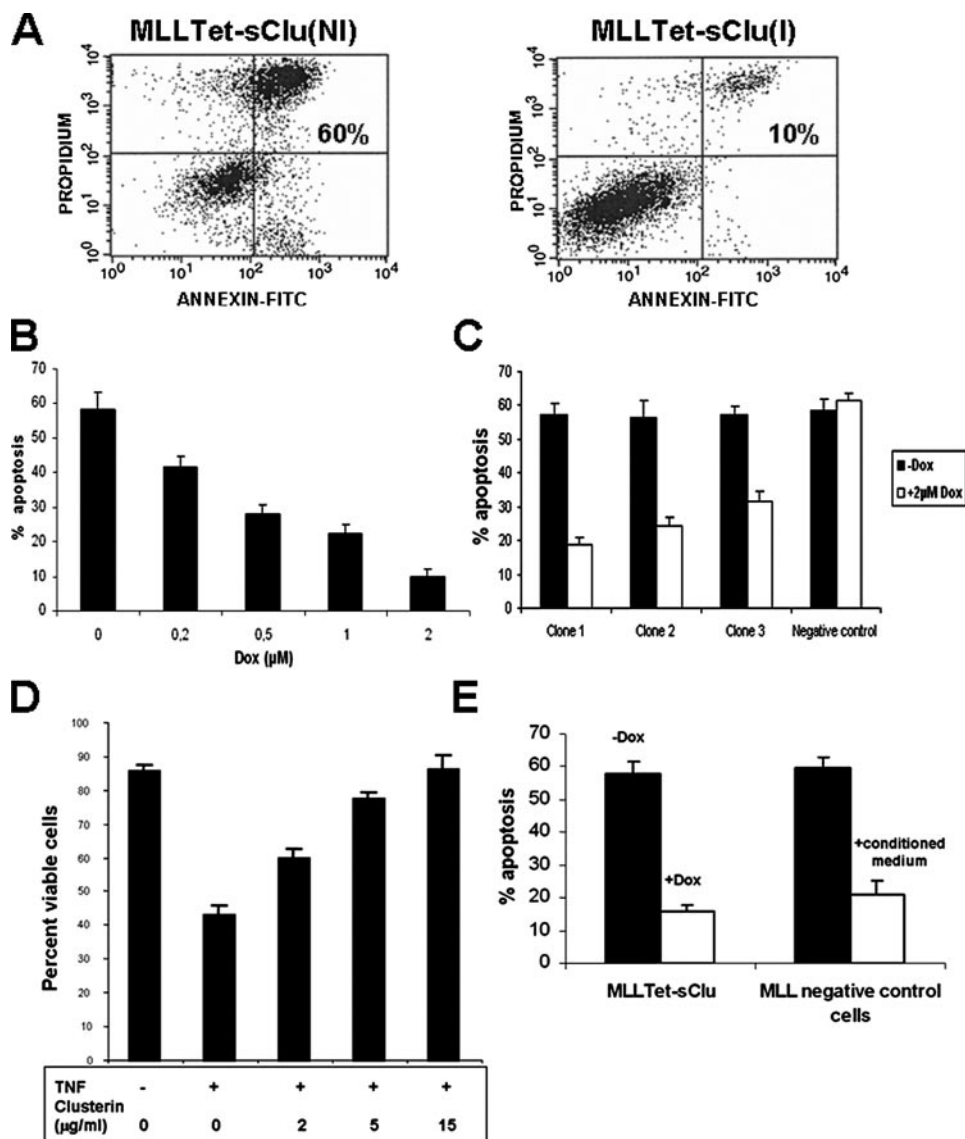


FIGURE 3. *A*, effects of clusterin on growth of androgen-independent prostate cancer cells. Parental MLL, MLL transfected with the pTRE empty vector, and the positive clone 1 were plated in medium supplemented with 10% Tet-free FBS without or with 2  $\mu$ M Dox, and the numbers of cells were counted at the indicated times. *B*, MLLTet-sClu clone 1 cells were cultured for 72 h in the absence or the presence of increasing concentrations of Dox, the proliferation rate was determined by the BrdUrd incorporation. *C*, proliferation rate of the different clones MLLTet-sClu 1–3 compared with the negative control, cells were cultured without or with 2  $\mu$ M Dox for 72 h. These results represent the averages of two independent experiments. Error bars indicate standard errors.

dependent, it appears that secreted clusterin protects cells against TNF $\alpha$ -induced apoptosis in a dose-dependent manner.

**Effect of Exogenous Clusterin on TNF $\alpha$ -induced Apoptosis in the Parental Cell Line MATLyLu**—We then examined how TNF $\alpha$  and actinomycin D affect the parental cell line MATLyLu. As shown in Fig. 4D, the viability of MLL cells was found to decrease in response to treatment. Moreover, when purified rat clusterin was supplied exogenously to these cells, the effect diminished in a dose-dependent manner. At high clusterin concentrations the cytotoxic effect of TNF $\alpha$  was completely abolished (Fig. 4D). Moreover the incubation of the negative control cells transfected with the empty vector in medium containing sClu from induced MLLTet-sClu with 2  $\mu$ M Dox for 48 h allowed the cells to become resistant to TNF $\alpha$ -induced apoptosis (Fig. 4E). Thus, the secreted form of clusterin acts from the outside of cells to enhance survival.

## Study of Clusterin Survival Effect



**FIGURE 4. Clusterin protects MLLTet-sClu cells against TNF $\alpha$ -induced apoptosis in a dose-dependent manner.** *A*, effect of TNF $\alpha$  on MLLTet-sClu cells induced or not (with 2  $\mu\text{M}$  Dox) to produce clusterin. Flow cytometry plots showing annexin staining versus propidium iodide staining were constructed for uninduced (NI) and induced (I) cells treated for 24 h with 50 ng/ml TNF $\alpha$  and 4  $\mu\text{g/ml}$  actinomycin D. The results shown are representative of three independent experiments. *B*, diagram showing mean percentages of TNF $\alpha$ -induced apoptosis in populations of MLLTet-sClu cells cultured for 48 h in the absence or presence of Dox. Concentrations tested: 0, 0.2, 0.5, 1, and 2  $\mu\text{M}$  Dox. *C*, diagram showing mean percentages of TNF $\alpha$ -induced apoptosis in populations of MLLTet-sClu cells of different clones 1, 2, and 3 compared with the negative control clone cultured for 48 h in the absence or presence of 2  $\mu\text{M}$  Dox. The data are presented as means  $\pm$  S.D. for three independent experiments. *D*, effects of exogenous clusterin on TNF $\alpha$ -induced apoptosis in MLL cells. MLL cells were cultured in the presence of 50 ng/ml TNF $\alpha$  and 4  $\mu\text{g/ml}$  actinomycin D with a varying dose of purified rat clusterin. Cell viability was assessed by means of the MTT assay. *E*, diagram showing mean percentages of TNF $\alpha$ -induced apoptosis in MLLTet-sClu without or with Dox and MLL negative control cells cultured in RPMI media with FBS 10% (black bars) or cultured in conditioned medium with sClu (supernatant of MLLTet-sClu induced for 48 h in the presence of 2  $\mu\text{M}$  Dox) (white bars). The data are presented as means  $\pm$  S.D. for three independent experiments.

**Megalin Binds to Clusterin and Its Expression Level Increases in Clusterin-overexpressing Cells**—Megalin is a 660-kDa membrane protein described as an endocytic receptor of clusterin (24). By immunoprecipitation with anti-megalin followed by Western blotting with a monoclonal antibody against the clusterin  $\alpha$  chain, we detected a protein having the molecular weight of the non-glycosylated clusterin alpha subunit (Fig. 5*B*). Because the same antibody revealed no immunoreactive band

in total protein extracts of Dox-induced MLLTet-sClu, it's likely that the clusterin  $\alpha$  chain is part of a megalin-clusterin complex.

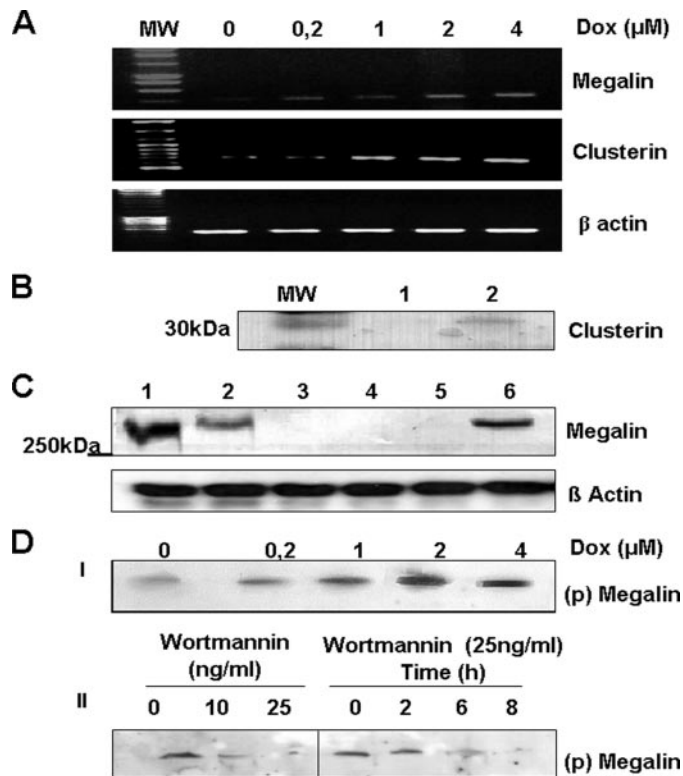
Because clusterin acts from outside the cell, we studied the expression of the megalin gene in clusterin-overproducing MLLTet-sClu cells. We first performed reverse transcription-PCR to measure levels of megalin mRNA. As shown in Fig. 5*A*, the level of megalin mRNA was higher in Dox-induced cells, and it rose in a dose-dependent manner. Next, megalin itself was detected by Western blotting in membrane-protein extracts of induced MLLTet-sClu cells, using a monospecific polyclonal antibody against the C-terminal peptide of the megalin, developed in our laboratory. Fig. 5*C* shows the immunoreactive band corresponding to megalin (molecular mass exceeding 250 kDa) in extracts of MLLTet-sClu cells overexpressing clusterin.

Clusterin also stimulated megalin phosphorylation as demonstrated by Western blotting using the antiphosphorylated peptide 4564–4579 sequence of rat megalin (Fig. 5*D*). This phosphorylation as shown in Fig. 5*D* decreased with the wortmannin treatment and was completely inhibited by 25 ng/ml after 8-h treatment, demonstrating that megalin phosphorylation is PI3K-dependent.

**Clusterin Potentiates the PI3K/Akt Survival Pathway in MLLTet-sClu Cells**—Given the importance of the PI3K/Akt survival pathway, it is important to examine how overproduction of clusterin affects this pathway in induced MLLTet-sClu cells. We therefore focused on three events: phosphorylation of Akt, phosphorylation of the Akt target protein Bad, and Bad-mediated

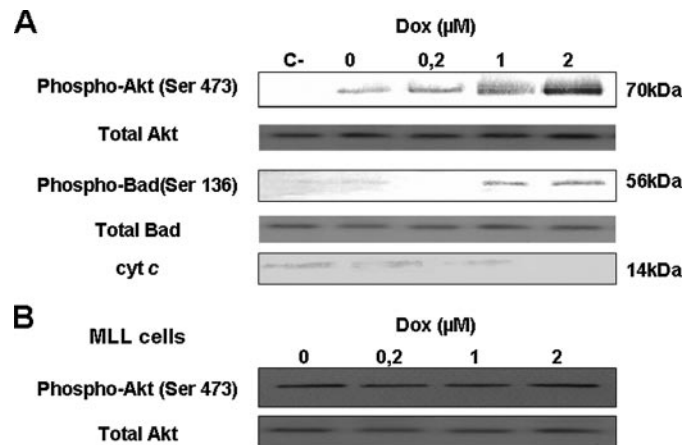
cytochrome *c* release from mitochondria.

First, cells were cultured in the presence or the absence of Dox (doses tested: 0.2, 1, and 2  $\mu\text{M}$ ) for 48 h, and the amount of phosphorylated Akt was determined by Western blotting with a phospho-Akt-specific antibody, after prior immunoprecipitation of total Akt. Interestingly, the level of Akt phosphorylation was found to increase with the dose of Dox used to induce clusterin synthesis (Fig. 6).



**FIGURE 5. Effect of clusterin overexpression on megalin expression and phosphorylation.** *A*, regulation of megalin production in MLLTet-sClu cells. Representative PCR of reverse-transcribed total RNA extracted from MLLTet-sClu cells cultured for 48 h in the presence increasing concentrations of Dox. Reverse transcript size (400 bp) was determined by comparison with the migration of a DNA molecular weight ladder. To check that equal amounts of mRNA were loaded, a rat  $\beta$  actin cDNA was also amplified in the same samples. *B*, clusterin interacts with megalin: total protein extracts of MLLTet-sClu cells cultured for 48 h without (lane 1) or with 2  $\mu$ M Dox (lane 2) were immunoprecipitated with anti-megalin. The immunoprecipitates were electrophoresed and probed with a monoclonal antibody against the clusterin  $\alpha$  chain. *C*, Western blot analysis of megalin with a rabbit antiserum against megalin peptide. Lanes 1 and 2, respectively, cytoplasmic and membrane extracts of kidney cells, as positive controls. Lanes 3 and 4, respectively, culture medium samples from cultured of MLLTet-sClu cells uninduced (NI) or induced for 48 h with 2  $\mu$ M Dox (I). Lanes 5 and 6, membrane extracts of MLLTet-sClu (NI) or (I). An immunoreactive band corresponding to a protein of >250 kDa is present in membrane extracts of cells induced to overproduce clusterin. *D*, megalin phosphorylation detected by Western blotting revealed with anti-phosphorylated megalin peptide in MLLTet-sClu cell extracts. Cells were cultured for 48 h in the presence increasing concentrations of Dox (I). Dose- and time-dependent effects of the PI3K pathway inhibitor (wortmannin) on megalin phosphorylation in MLLTet-sClu inducible for the expression of clusterin with 2  $\mu$ M Dox. MLLTet-sClu cells cultured in the presence of 2  $\mu$ M Dox were treated or not with increasing concentrations of wortmannin for 8 h. MLLTet-sClu cells cultured in the presence of 2  $\mu$ M Dox were treated with 25 ng/ml for various additional times (II).

We then evaluated phosphorylation of the Akt target protein Bad to check the correlation between Akt phosphorylation and Akt activity. The level of phosphorylated Bad was found to increase in parallel with Akt phosphorylation. Thus, Bad was not available to allow pore formation on the mitochondrial membrane. This is confirmed in Fig. 6A, which shows that the amount of cytochrome *c* released into the cytosol of MLLTet-sClu cells treated with TNF $\alpha$ /ActD for 12 h decreased as the concentration of Dox used to induce clusterin synthesis increased. These effects were caused by the overexpression of clusterin and not Dox itself, because the incubation of MLL

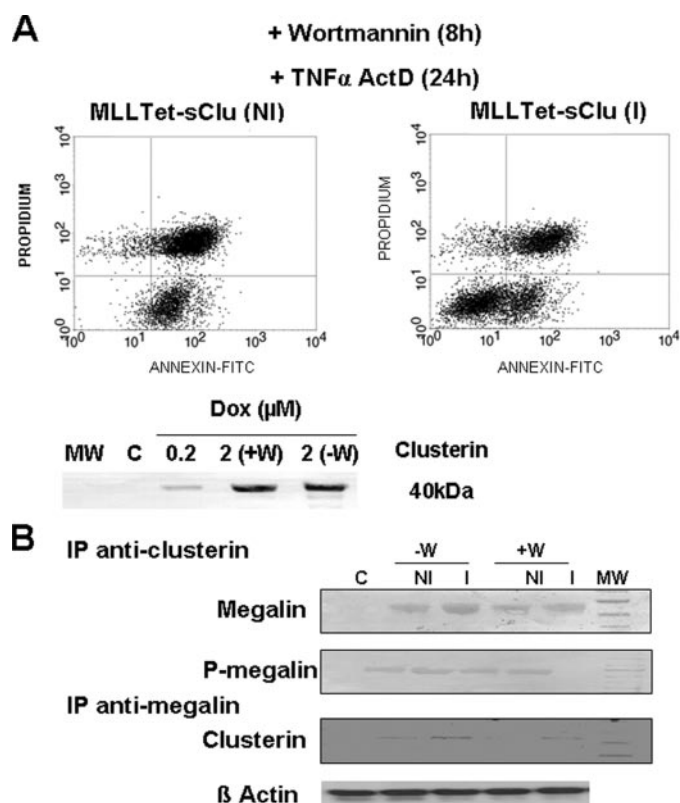


**FIGURE 6. Effect of clusterin overexpression on the Akt pathway.** *A*, extracts of MLLTet-sClu cells cultured for 48 h in the presence of increasing concentrations of Dox were immunoprecipitated with anti-Akt. The immunoprecipitates were electrophoresed and probed with rabbit antibody raised against serine 473-phosphorylated Akt, C-; negative control for immunoprecipitation. Immunoprecipitates obtained by treating extracts with anti-Bad were electrophoresed and probed with anti-phosphoserine 136 (Upstate). *B*, MLLTet-sClu cells were cultured for 48 h with Dox (concentrations tested: 0, 0.2, 1, and 2  $\mu$ M) and analyzed by Western blotting with anti-cytochrome *c* as probe. MLLTet negative control cell extracts, after incubation for 48 h with increasing concentrations of Dox, were separated by electrophoresis and probed with rabbit antibody raised against serine 473-phosphorylated Akt or the total Akt. Data are representative of two individual experiments.

cells with increasing concentrations of Dox had no effect on Akt phosphorylation (Fig. 6B).

**Effects of Wortmannin on Clusterin-mediated Cytoprotection against TNF $\alpha$ -induced Apoptosis**—The role of the PI3K as a major mediator of survival in prostate cancer cells is well documented. Exposure of MLLTet-sClu cells to wortmannin (Sigma), a specific inhibitor of PI3K, resulted in rapid and complete loss of Akt phosphorylation (data not shown). When uninduced MLLTet-sClu cells were pretreated with 25 ng/ml wortmannin for 8 h and then apoptosis was triggered with TNF $\alpha$  plus actinomycin D for 24 h, all of the MLLTet-sClu cells died (Fig. 7A). In contrast, at least 40% of the Dox-induced cells survived under the same conditions. Thus, clusterin protects cells from apoptosis even when the PI3K is inhibited. Wortmannin does not interfere with the clusterin production as shown in Fig. 7A. Here, we used immunoprecipitation to study the interaction between clusterin and megalin after 4-h treatment with 25 ng/ml wortmannin. As shown in Fig. 7B, after immunoprecipitation with anti-clusterin (mouse antibody) and detection with anti-megalin (goat antibody) the interaction of megalin with clusterin was increased weakly in induced cells after treatment with wortmannin and TNF $\alpha$  compared with control cells without wortmannin. However the amount of phospho-megalin (detected with the anti-phospho-megalin rabbit antibody) increased in the complex with clusterin in induced cell extracts without wortmannin treatment compared with the cells induced and treated with TNF $\alpha$  and wortmannin. When we immunoprecipitated the extracts with anti-megalin (a goat antibody) and then detected the clusterin with the polyclonal antibody (rabbit anti-clusterin) we have shown by Western blotting and immunodetection with the anti-rabbit-horse-radish peroxidase conjugate that the amount of clusterin increased in both inducible cell extracts with or without wort-

## Study of Clusterin Survival Effect

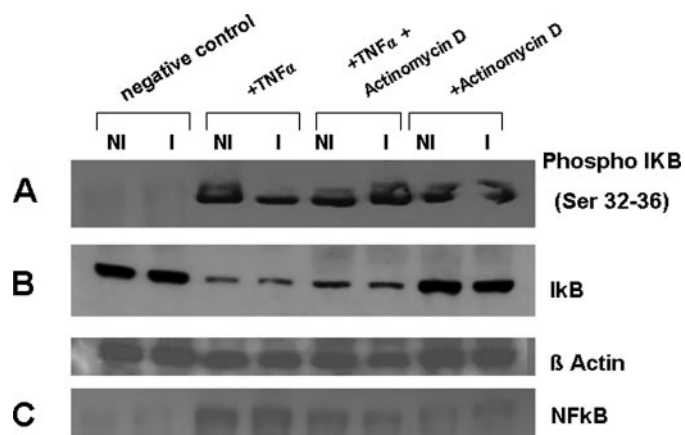


**FIGURE 7.** A, effects of clusterin overproduction on TNF $\alpha$ -induced apoptosis in MLLTet-sClu cells treated with wortmannin. Flow cytometry plots are presented, showing annexin staining versus PI staining of cells pretreated or not with 2  $\mu$ M Dox to induce clusterin synthesis (over a 24-h culture period) then exposed to 25 ng/ml wortmannin for 8 h and finally treated with 50 ng/ml TNF $\alpha$  plus 4  $\mu$ g/ml actinomycin D for 24 h to trigger apoptosis. Western blot analysis of the sClu synthesis in MLLTet-sClu clone 1 cultured in the presence of 2  $\mu$ M Dox without or with 25 ng/ml wortmannin treatment during 8 h. B, MLLTet-sClu cells, cultured for 24 h in the absence or the presence of Dox, then exposed or not to 25 ng/ml wortmannin for 4 h, and finally treated with 50 ng/ml TNF $\alpha$  plus 4  $\mu$ g/ml actinomycin D for 24 h to trigger apoptosis, were immunoprecipitated with anti-clusterin (monoclonal mouse antibody) or anti-megalin (polyclonal goat antibody). The immunoprecipitates were separated by electrophoresis and probed with an antibody raised against phospho-megalin or with anti-megalin. The same cell extracts were immunoprecipitated with anti-megalin and then separated by electrophoresis and probed with anti-clusterin. C, negative control for immunoprecipitation. The results shown are representative of three independent experiments.

mannin treatment. However the clusterin signal in induced cells and cells treated with wortmannin was lower than those in the cells without wortmannin treatment.

Our results confirm that the PI3K/Akt survival pathway is important in the androgen-independent MLL rat prostatic cell line, because all cells die when the PI3K is inhibited. They also show that, although the survival effect of clusterin does appear to be linked to its effect on this pathway, there may be additional pathways PI3K independent through which clusterin enables MLLTet-sClu cells to resist TNF $\alpha$ -induced apoptosis.

**Clusterin Does Not Affect NF $\kappa$ B Activity in MLLTet-sClu Cells**—NF $\kappa$ B, like Akt, interferes with apoptotic pathways. Recent evidence suggests that the anti-apoptotic activity of Akt may be mediated by IKK-catalyzed phosphorylation. IKK phosphorylates I $\kappa$ B, causing its degradation and the release of NF $\kappa$ B. This factor is then translocated into the nucleus where it promotes cell survival by activating transcription of survival factors like survivin and IAP (30). We therefore investigated the possi-



**FIGURE 8.** The NF $\kappa$ B pathway in MLLTet-sClu cells induced or not to overproduce clusterin. A, *in vitro* IKK activity of MLLTet-sClu extracts, as measured on immunoprecipitated material (see "Experimental Procedures"). After the kinase assay, the reaction mixtures were electrophoresed and analyzed with a monoclonal anti-phospho-Ser 32–36 I $\kappa$ B. B, Western blot analysis of I $\kappa$ B stability in extracts of MLLTet-sClu cells cultured for 48 h in the absence (NI) or presence (I) of 2  $\mu$ M Dox and treated with 50 ng TNF $\alpha$ , 4  $\mu$ g/ml actinomycin D, or both. C, gel shift assay of NF $\kappa$ B in MLLTet-sClu nuclear extracts. The assay was performed as described under "Experimental Procedures" on nuclear extracts MLLTet-sClu cultured for 48 h in the absence (NI) or presence (I) of 2  $\mu$ M of Dox.

bility that NF $\kappa$ B might play a role in protection against TNF $\alpha$ -induced apoptosis. First we studied the effect of clusterin overproduction on IKK activity. Fig. 8 shows the results of *in vitro* kinase assays performed as described under "Experimental Procedures" on preparations obtained from MLLTet-sClu cells induced or not to overproduce clusterin and treated with TNF $\alpha$ , actinomycin D, or both. Induction of clusterin oversynthesis did not affect IKK activity. We also examined by Western blotting the amount of I $\kappa$ B present in cells under these conditions and in gel-shift assay the amount of active NF $\kappa$ B. The results of these experiments, also shown in Fig. 8, suggest that in our cell model, overexpression of the secreted form of clusterin does not interfere with I $\kappa$ B stability or NF $\kappa$ B activity.

**Statistical Analysis**—All presented assays have been repeated for at least three times, unless otherwise indicated. Each data point represents the mean of the independent experiments, and bars denote  $\pm$  S.D. To determine the level of significance statistical evaluation was calculated by using the Student *t* test; *p* < 0.05 was considered to be significant.

## DISCUSSION

Taken together our data confirm the survival effect of the secreted form of clusterin and point to a new mechanism by which sClu protects prostate cells from TNF-induced apoptosis. This mechanism implicates megalin and the Akt signaling pathway. To elaborate these conclusions we studied the survival effect of clusterin in an inducible prostate cell line. For that, we have established double-stable cell line clones displaying Dox-inducible synthesis of clusterin. Our choice for the inducible Tet-On gene expression system was to avoid the effects due to the clonogenicity of stable transfectants as described by Scaltriti *et al.* (31).

Here, we have shown that MLLtet-sClu clones did not exhibit any significant morphological differences compared with the control cells. They did not show any alteration of the

proliferation rate with the overexpression of clusterin. In contrast Scarliti *et al.* have shown that the overexpression of the intracellular form of clusterin induces G<sub>2</sub>/M phase arrest and cell death in PC3 prostate cancer cells. This reinforces our model where the secreted form is dominant and the intracellular form is only slightly expressed. Moreover, we have shown that the overexpression of sClu protects cells from TNF $\alpha$  and actinomycin D induced apoptosis, and this protection depends on the Dox dose used for the induction. To confirm that the survival effect induced by the overexpression of clusterin observed in this model is not due to the clonogenicity of one stable clone, we have compared three clones displaying Dox-induced clusterin. We have shown that the protection effect observed is dependent on the clusterin expression level. We have also compared these positive clones to a stable clone with the empty vector. These effects were completely absent in the control clone.

Although the protective effect of clusterin in prostatic cells has been demonstrated and studied extensively by several authors (17, 32, 33), the mechanism by which clusterin acts on cell survival is poorly understood. Here we have shown that clusterin acts as an extracellular survival signal, because the addition of the latter to the culture medium protects cells from TNF-induced apoptosis. These results are in agreement with those of Sintich *et al.*, showing that the sensitivity of LNCaP cells to TNF $\alpha$  decreased in the presence of exogenous clusterin and that addition of an anti-clusterin antibody to PC3 cells sensitized them to TNF-dependent apoptosis (34). The findings of Trougakos *et al.* consolidate our observation. Indeed they show that the incubation of cells in media with a high concentration of sClu can protect them from the cytotoxicity of the intracellular clusterin and the neutralization of sClu by using specific antibodies sensitized cells to genotoxic stress (35). However, these results are in contrast with those of Zhang *et al.* (36) who have demonstrated that the survival effect of clusterin is due only to the intracellular form and the addition of exogenous recombinant clusterin to the culture media does not protect the human fibrosarcoma cell line from etoposide induced-apoptosis. These differences could be explained by the different systems used. Moreover clusterin function during cell death depends on the cellular context, the site of action, and the type of the signal that induces apoptosis.

The survival effect has been already attributed to the secreted form. An extensive number of studies have demonstrated that the tumor cell survival and the progression toward high grade and metastasis carcinoma were connected to the up-regulation of the secreted form of clusterin and the loss of the nuclear form (12, 15, 37). In prostate cancer the relationship between the sClu expression and the development of androgen resistance have been reported by different researchers (5, 9, 16, 17, 32, 38, 39). Recent work has shown that osteosarcoma cells became resistant to chemotherapeutic drugs by the up-regulation of clusterin and that antibody neutralization of the extracellular isoform sensitized the cells to drugs that induce cell death (40). Very recently Carnevali *et al.* (14) have shown that clusterin is involved in the defense of the lung against effects of cigarette smoke. They demonstrated that the coincubation of fibroblasts with conditioned medium with the sClu significantly decreased

the cellular oxidation caused by the cigarette smoke extract. These findings consolidate our observations, because the incubation of parental cells in the culture media of MLLTet-sClu after 48 h of incubation with Dox to induce clusterin overexpression protected cells from TNF $\alpha$ -induced apoptosis.

Interestingly, we demonstrated that the survival effect of clusterin on prostatic cells was mediated in part by activation of the PI3K/Akt pathway, because Akt phosphorylation increased in a Dox dose-dependent manner. The fact that the effect was dose-dependent would indicate that the clusterin effect was physiologically significant and not just due to the use of an excess of Dox. In our experiments, activation of the PI3K/Akt pathway led to a dose-dependent phosphorylation of Bad and to diminished cytochrome *c* release from the mitochondria. These effects were inhibited by wortmannin used at a dose 25 ng/ml, which is known to specifically inhibit PI3K. These results are also consistent with the survival function of Akt: phosphorylated Bad prevents pore formation in the mitochondrial membrane, blocks cytochrome *c* release, and thus inhibits TNF $\alpha$ -induced apoptosis (41).

With our inducible cell line we have established a direct relationship between increasing levels of clusterin and activation of the Akt survival pathway. This observation correlates well with the parallel increases in clusterin synthesis and PI3K/Akt activity observed in the progression of prostate cancer to androgen independence (20, 21, 42, 43). Clusterin, however, seems to act also via a PI3K-independent pathway. When uninduced, MLLTet-sClu cells exposed to the PI3K inhibitor wortmannin showed 100% mortality upon treatment with TNF $\alpha$ . In contrast, when the same cells were induced to overproduce clusterin, some 40% of them survived under these conditions. These cells must escape apoptosis by recruiting mechanisms that depend on other biological properties or another mode of action of clusterin.

Clusterin is also known to have chaperone protein activity. It helps to keep the extracellular environment free of proteins with abnormal conformation. Clusterin and abnormal proteins form complexes, which bind to specific receptors and become endocytosed (18, 44).

Clusterin can also interact directly or indirectly with factors involved in cell survival. Recent studies have shown that clusterin can alter the stability of I $\kappa$ B and modulate the activity of NF $\kappa$ B. This transcription factor has been linked to the progression and survival of many cancers, including prostate cancer (23). The NF $\kappa$ B pathway is an important one, activated during TNF $\alpha$ -induced apoptosis. In our experiments, the overproduction of clusterin in MLLTet-sClu cells had no effect on I $\kappa$ B stability, the IKK kinase, or NF $\kappa$ B activity. These results contrast with those obtained by Santilli on LAN5 and human neuroblastoma cells (45). The discrepancy between our results and those of Santilli is due to the fact that our observations concern the secreted form acting from the outside, whereas Santilli's observations essentially concerned the action of intracellular clusterin lacking the protein export signal. Furthermore these data confirm that our model is indeed a model for the secreted form of clusterin.

Because clusterin acts as an external survival signal, we focused on megalin as its possible site of action on the mem-

## Study of Clusterin Survival Effect

brane. We have shown here that megalin is indeed the receptor of clusterin in our model. To our knowledge it is the first time that megalin expression on the mRNA and protein level has been demonstrated in prostate epithelial cells. Binding of clusterin to this membrane protein is suggested by our observation that megalin and clusterin co-immunoprecipitate in the presence of anti-megalin antibody. Megalin or gp330 has been shown previously to be a clusterin receptor that binds clusterin in rat epididymal epithelia and in renal epithelial cells, with subsequent internalization (46, 47). Interaction between clusterin or ApoJ and megalin has also been observed in Alzheimer disease, where it leads to formation of amyloid bodies and to their internalization by neuronal cells. Oversynthesis of megalin mRNA was observed in the MLLTet-sClu cell line upon induction of clusterin expression with Dox. These results were confirmed by Western blotting with an anti-megalin antibody. Up-regulated synthesis of a receptor in response to an increased concentration of the ligand is a common regulatory mechanism of targeted cells. This observation strengthens our hypothesis that clusterin acts as an extracellular signal via the megalin receptor. Indeed recent studies show that megalin can interact with protein kinase B and protect renal proximal tubule cells from apoptosis induced by the high level of albumin (48).

Megalin has long been viewed as an endocytic receptor involved in the internalization of different ligands (44, 49). Recent studies indicate that in addition to providing an endocytosis signal, the cytoplasmic tail of this receptor is crucial to the interaction of cytoplasmic adaptors with scaffold proteins and thereby mediates signal transduction (50, 51).

As early as 1996, cloning and sequencing of human megalin cDNA and protein alignments enabled investigators to identify on megalin a potential phosphorylation consensus sequence 4569–4579 capable of interacting with SH2 domains on PI3K (50, 51). Here we have demonstrated that the sequence 4569–4579 of rat megalin is a PI3K phosphorylation site and the phosphorylation of tyrosine 4573 is induced by clusterin. In addition, in the absence or presence of wortmannin-specific inhibitor of PI3K, by immunoprecipitation we have shown that clusterin interacts better with the phosphorylated form of megalin and that clusterin may stabilize the megalin-clusterin complex via its interaction. Finally clusterin also increases the PI3K dependent phosphorylation of Akt leading to the activation of the survival pathway via Bad phosphorylation. This suggests that clusterin may act as an external survival signal via a transduction mechanism involving its megalin receptor and PI3K/Akt pathway. The elucidation of the details of this new mechanism will require further investigations.

In conclusion our data show for the first time that the over-expression of the secreted isoform of clusterin protects the prostate androgen-independent epithelial cells from TNF-induced apoptosis through the activation of the Akt survival pathway and via its receptor the megalin.

*Acknowledgments*—We thank Dr. Mustapha Zeddou for his help for the FACS experiment and Drs. Ricarda Finnern, Benaissa Elmoualij, and Michael McNamara for their critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

1. Bettuzzi, S., Hiipakka, R. A., Gilna, P., and Liao, S. T. (1989) *Biochem. J.* **257**, 293–296
2. Lee, C., Sensibar, J. A., Dudek, S. M., Hiipakka, R. A., and Liao, S. T. (1990) *Biol. Reprod.* **43**, 1079–1086
3. Bursch, W., Gleeson, T., Kleine, L., and Tenniswood, M. (1995) *Arch. Toxicol.* **69**, 253–258
4. Kyprianou, N., English, H. F., Davidson, N. E., and Isaacs, J. T. (1991) *Cancer Res.* **51**, 162–166
5. Kyprianou, N., English, H. F., and Isaacs, J. T. (1990) *Cancer Res.* **50**, 3748–3753
6. French, L. E., Sappino, A. P., Tschopp, J., and Schifferli, J. A. (1992) *J. Clin. Invest.* **90**, 1919–1925
7. Ho, S. M., Leav, I., Ghatak, S., Merk, F., Jagannathan, V. S., and Mallery, K. (1998) *Am. J. Pathol.* **153**, 131–139
8. July, L. V., Akbari, M., Zellweger, T., Jones, E. C., Goldenberg, S. L., and Gleave, M. E. (2002) *Prostate* **50**, 179–188
9. Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P. S., and Gleave, M. E. (2000) *Cancer Res.* **60**, 170–176
10. Miyake, H., Chi, K. N., and Gleave, M. E. (2000) *Clin. Cancer Res.* **6**, 1655–1663
11. Trougakos, I. P., So, A., Jansen, B., Gleave, M. E., and Gonos, E. S. (2004) *Cancer Res.* **64**, 1834–1842
12. Leskov, K. S., Klokov, D. Y., Li, J., Kinsella, T. J., and Boothman, D. A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11590–11600
13. Yang, C. R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J. J., Kinsella, T. J., and Boothman, D. A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5907–5912
14. Carnevali, S., Luppi, F., D'Arca, D., Caporali, A., Ruggieri, M. P., Vettori, M. V., Caglieri, A., Astancolle, S., Panico, F., Davalli, P., Mutti, A., Fabbri, L. M., and Corti, A. (2006) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 393–399
15. Kurahashi, T., Muramaki, M., Yamanaka, K., Hara, I., and Miyake, H. (2005) *BJU Int.* **96**, 895–899
16. Miyake, H., Yamanaka, K., Muramaki, M., Kurahashi, T., Gleave, M., and Hara, I. (2005) *Oncol. Rep.* **14**, 1371–1375
17. Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P. S., and Gleave, M. E. (2000) *Cancer Res.* **60**, 2547–2554
18. Bartl, M. M., Luckenbach, T., Bergner, O., Ullrich, O., and Koch-Brandt, C. (2001) *Exp. Cell Res.* **271**, 130–141
19. Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A., and Wilson, M. R. (2000) *Biochemistry* **39**, 15953–15960
20. Nesterov, A., Lu, X., Johnson, M., Miller, G. J., Ivashchenko, Y., and Kraft, A. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10767–10774
21. Pfeil, K., Eder, I. E., Putz, T., Ramoner, R., Culig, Z., Ueberall, F., Bartsch, G., and Klocker, H. (2004) *Prostate* **58**, 259–268
22. Chen, X., Thakkar, H., Tyan, F., Gim, S., Robinson, H., Lee, C., Pandey, S. K., Nwokorie, C., Onwudiwe, N., and Srivastava, R. K. (2001) *Oncogene* **20**, 6073–6083
23. Gasparian, A. V., Yao, Y. J., Kowalczyk, D., Lyakh, L. A., Karseladze, A., Slaga, T. J., and Budunova, I. V. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 141–151
24. Zlokovic, B. V., Martel, C. L., Matsubara, E., McComb, J. G., Zheng, G., McCluskey, R. T., Frangione, B., and Ghiso, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4229–4234
25. Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A. K., and Farquhar, M. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9725–9729
26. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995) *Science* **268**, 1766–1769
27. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., and Boyd, M. R. (1988) *Cancer Res.* **48**, 4827–4833
28. Yang, C. C., Lin, H. P., Chen, C. S., Yang, Y. T., Tseng, P. H., Rangnekar, V. M., and Chen, C. S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25872–25878
29. Caccamo, A. E., Scaltriti, M., Caporali, A., D'Arca, D., Scorcioni, F., Candiano, G., Mangiola, M., and Bettuzzi, S. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 514–519
30. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. (1998) *Oncogene* **17**, 3247–3259

31. Scaltriti, M., Santamaria, A., Paciucci, R., and Bettuzzi, S. (2004) *Cancer Res.* **64**, 6174–6182
32. Sensibar, J. A., Sutkowski, D. M., Raffo, A., Buttyan, R., Griswold, M. D., Sylvester, S. R., Kozlowski, J. M., and Lee, C. (1995) *Cancer Res.* **55**, 2431–2437
33. You, K. H., Ji, Y. M., and Kwon, O. Y. (2003) *Z. Naturforsch. [C]* **58**, 148–151
34. Sintich, S. M., Steinberg, J., Kozlowski, J. M., Lee, C., Pruden, S., Sayeed, S., and Sensibar, J. A. (1999) *Prostate* **39**, 87–93
35. Trougakos, I. P., Lourda, M., Agiostratidou, G., Kletsas, D., and Gonos, E. S. (2005) *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 436–449
36. Zhang, H., Kim, J. K., Edwards, C. A., Xu, Z., Taichman, R., and Wang, C. Y. (2005) *Nat. Cell Biol.* **7**, 909–915
37. Gleave, M., and Chi, K. N. (2005) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1058**, 1–15
38. Caccamo, A. E., Desenzani, S., Belloni, L., Borghetti, A. F., and Bettuzzi, S. (2006) *J. Cell. Physiol.* **207**, 208–219
39. Zellweger, T., Chi, K., Miyake, H., Adomat, H., Kiyama, S., Skov, K., and Gleave, M. E. (2002) *Clin. Cancer Res.* **8**, 3276–3284
40. Lourda, M., Trougakos, I. P., and Gonos, E. S. (2007) *Int. J. Cancer* **120**, 611–622
41. Datta, S. R., Ranger, A. M., Lin, M. Z., Sturgill, J. F., Ma, Y. C., Cowan, C. W., Dikkes, P., Korsmeyer, S. J., and Greenberg, M. E. (2002) *Dev. Cell* **3**, 631–643
42. Sharma, M., Chuang, W. W., and Sun, Z. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 30935–30941
43. Shukla, S., MacLennan, G. T., Marengo, S. R., Resnick, M. I., and Gupta, S. (2005) *Prostate*
44. Hammad, S. M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W. O., and Argraves, W. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18644–18649
45. Santilli, G., Aronow, B. J., and Sala, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 38214–38219
46. Girton, R. A., Sundin, D. P., and Rosenberg, M. E. (2002) *Am. J. Physiol.* **282**, F703–F709
47. Hermo, L., Lustig, M., Lefrancois, S., Argraves, W. S., and Morales, C. R. (1999) *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 282–293
48. Caruso-Neves, C., Pinheiro, A. A., Cai, H., Souza-Menezes, J., and Guginho, W. B. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18810–18815
49. Morales, C. R., Igdoura, S. A., Wosu, U. A., Boman, J., and Argraves, W. S. (1996) *Biol. Reprod.* **55**, 676–683
50. May, P., Bock, H. H., and Herz, J. (2003) *Sci. STKE* 2003, PE12
51. Herz, J., Gotthardt, M., and Willnow, T. E. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 161–166

#### 4. PARTIE 4: ANALYSE PROTÉOMIQUE DE LA LIGNÉE MLLTET-SCLU ET IDENTIFICATION DES NOUVEAUX PARTENAIRES DE SCLU

Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une deuxième publication soumise au journal Plos One. Cette publication intitulée:

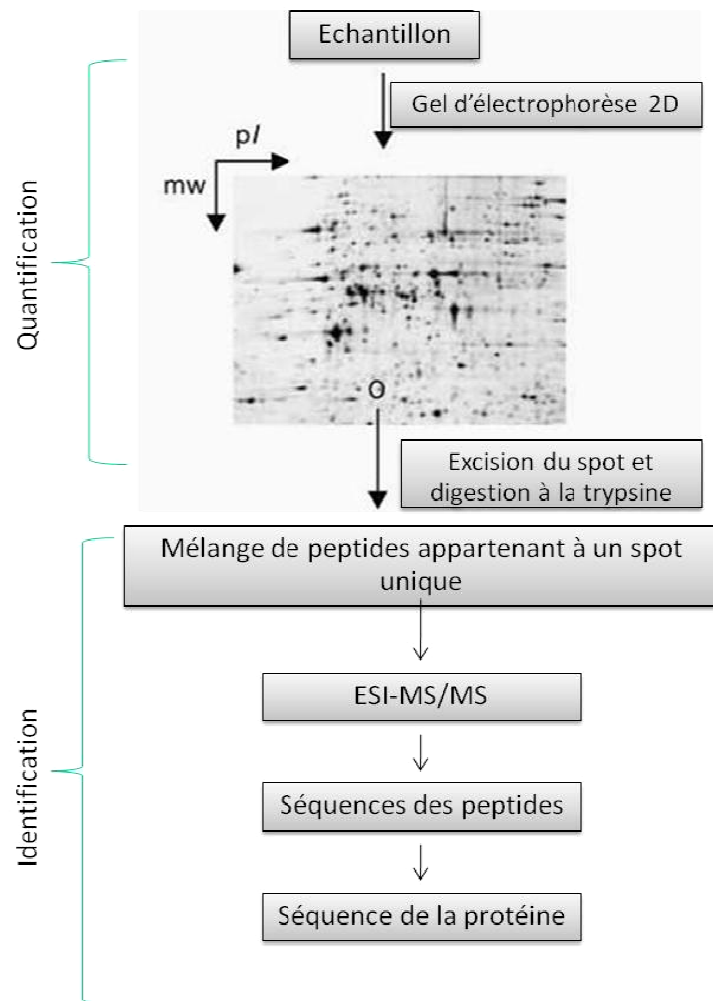
***“Proteome profiling of a prostatic cell line induced or not to overexpress clusterin”*** Afin de comprendre comment la sCLU continue à jouer un rôle protecteur sur l'apoptose, même en présence d'inhibiteur de la voie Akt, nous avons décidé de réaliser un large criblage des protéines régulées par la surexpression de la sCLU par une analyse protéomique de notre modèle cellulaire. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Nicolas Smargiasso et Gabriel Mazzucchelli dans le laboratoire de spectrométrie de masse du professeur DePaw à l'université de Liège. Différentes techniques permettent de réaliser une caractérisation protéique globale. La technique choisie est le ESI, ESI «*ELECTROSPRAY Ionization mass spectrometry (ESI-MS)*» ou, *ELECTROSPRAY mass spectrometry (ES-MS)*». L'analyse protéomique a été réalisée selon le schéma présent sur la figure III.9.

L'analyse comparée des protéines nucléaires et cytoplasmiques issues des cellules MLLTet-sClu non induites ou induites à la doxycycline pour la surexpression de la sCLU a été réalisée, ainsi que celles des surnageants de culture correspondants. Cette étude a permis de montrer que la surexpression de la sCLU stimule la production de différents types de protéines dans différents compartiments cellulaires.

Tout d'abord, cette étude protéomique a permis de confirmer que notre modèle cellulaire est bien un modèle qui permet d'étudier la forme sécrétée, puisque la spectrométrie de masse n'a pas détecté la présence de la clusterine dans le compartiment intracellulaire.







**Figure III.9. Schéma décrivant les étapes d'analyse protéomique par électrophorèse sur gel à deux dimensions et spectrométrie de masse.** Les protéines provenant du lysat cellulaire sont séparées dans la première dimension par focalisation isoélectrique et dans la seconde dimension selon leurs masses moléculaires apparentes. La visualisation des protéines se fait par coloration du gel. Les spots des protéines d'intérêt sont excisés et digérés par une enzyme protéolytique (trypsine) avant d'être analysés en MS. Pour l'identification par MS/MS, un ou plusieurs peptides sont isolés et fragmentés pour former des peptides de plus petites tailles donnant l'information sur la séquence du peptide parent. La protéine est ensuite identifiée sur base des informations collectées par recherche informatique dans les bases de données.

Au niveau des extraits protéiques cytoplasmiques, la sCLU stimule la synthèse des protéines du métabolisme comme l' $\alpha$ -énolase, la malate déshydrogénase et l'aspartate transaminase, des protéines protectrices de la cellule en cas de stress comme Hsp70 et 90, l'inhibiteur de la ribonucléase, des protéines impliquées dans le transport comme Arf1 et d'autres protéines qui sont impliquées dans la promotion et la progression du cancer comme PCNA.

Dans le milieu extracellulaire, nous avons trouvé que la surexpression de la sCLU induit l'expression de l'ostéopontine. En revanche, l'analyse des extraits nucléaires ne nous a pas permis d'identifier des protéines dont l'expression est modulée par la surexpression de la sCLU.

Parmi les protéines régulées par la surexpression de sCLU, notre attention s'est portée sur celles qui sont impliquées dans la résistance des cellules cancéreuses et dans la progression du cancer prostatique vers l'androgéno-indépendance.

Parmi les protéines identifiées, les plus intéressantes sont les protéines du choc thermique (hsp 70, hsp 90), l'Arf1, la PCNA et l'OPN. Nous avons confirmé l'induction de ces protéines dans le modèle surexprimant la forme secrétée par western blotting. Aucun changement n'a été mis en évidence au niveau de l'ARN messager de ces facteurs (uniquement dans le cas de l'OPN), ce qui nous a fait penser que cette régulation est post-transcriptionnelle. Il reste à déterminer si cette régulation de ces protéines a lieu au niveau de leur dégradation ou de leur synthèse. Il serait aussi intéressant de vérifier si l'inhibition de l'expression de la CLU à l'aide d'un antisens induirait une diminution de ces facteurs.



**Proteome profiling of a prostatic cell line induced or not to overexpress clusterin**

Hayet Ammar, Nicolas Smargiasso\*, Gabriel Mazzucchelli\*, Edwin De Paw\*, Jean L. Closset,  
Biochemistry Laboratory, University of Liège, Belgium.

\*Mass Spectrometry Laboratory, GIGA, University of Liège, Belgium.

\*To whom all correspondence should be addressed Tel: +32 4 361 13 71

E-mail: [ammarhayet@gmail.com](mailto:ammarhayet@gmail.com).

## **Abstract**

Progression of prostate cancer to androgen independence results, in part, from upregulation of antiapoptotic genes following androgen withdrawal. Among the proteins likely to play a role is clusterin, also known as testosterone repressed message-2 (TRPM-2), which exists in two forms: a pro-apoptotic nuclear form (nCLU) and a secreted survival factor (sCLU). The latter exerts its action partly via the Akt pathway. Here the aim was to identify new factors induced by clusterin overexpression. The focus was on the androgen-independent epithelial cell line MLLTet-sClu, which inducibly overexpresses sCLU. On the basis of a comparative proteomic analysis of induced and uninduced MLLTet-sClu cells, 18 differentially expressed proteins were identified, of which 9 were confirmed by western blotting: three enzymes involved in energy metabolism ( $\alpha$ -enolase, malate dehydrogenase, aspartate transaminase), the heat shock proteins Hsp90 and Hsp70, osteopontin (bone sialoprotein, OPN), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and ADP-ribosylation factor 1 (Arf1), a small GTP-binding protein playing a role in protein trafficking. Up-regulation at transcript level was only demonstrated for OPN. As these last five proteins have been linked previously to cancer, their upregulation in response to sCLU overexpression opens new avenues for research aiming to elucidate the role of clusterin in prostate cancer progression and resistance to therapy.

Key words:

Clusterin, prostate cancer, osteopontin, inducible cell line, survival

## Introduction

Prostate cancer is the second leading cause of male cancer deaths in western countries. At early stages the disease is androgen dependent, and androgen deprivation therapy is the initial treatment used. Yet many patients are not cured by this therapy; their cancer recurs and becomes refractory to classical chemotherapy [1]. Progression to androgen independence results, in part, from up-regulation of anti-apoptotic genes following androgen withdrawal. Among the anti-apoptotic proteins blamed for this phenomenon is clusterin, also called Testosterone Repressed Message-2 (TRPM-2).

Clusterin is viewed as a chaperone exerting its survival effect and cryoprotective function by at least two mechanisms: by increasing the solubility of denatured proteins and by mediating uptake and degradation of a broad spectrum of hydrophobic denatured aggregated molecules [2,3]. The gene encoding this protein was initially cloned as a gene highly upregulated in the castrated rat prostate model. It was first thought to be a pro-apoptotic factor, as it was also found to be overexpressed in a different model of hormonal ablation [4,5]. More recently it has emerged as a cell-survival protein [6,7,8,9,10,11,12]. These apparently contradictory roles of clusterin are believed to be played by two distinct isoforms of the protein.

Human clusterin is encoded by a single gene, located on chromosome 8. The Clusterin gene codes for a 449-aa polypeptide where the first 22 amino acids constitute the classical hydrophobic secretory signal peptide. This precursor form is targeted to the endoplasmic reticulum, where it is cleaved into two distinct peptides ( $\alpha$  and  $\beta$ ) held together by five disulfide bonds. The product is then glycosylated to yield the mature secreted heterodimeric form (70-80 kDa), sCLU [13]. A nuclear isoform (nCLU) has been recently identified. It is reported to result from alternative splicing, with excision of exon II [10]. As the nuclear form lacks the signal peptide, it does not enter the endoplasmic reticulum and does not undergo the maturation process [14].

It is becoming clear that the different functions of clusterin depend on its final maturation and localisation. On the one hand, nCLU accumulation has been observed in prostate cells dying by apoptosis [9,15], and overexpression of nCLU is reported to induce G2-M arrest and caspase-

dependent apoptosis in prostate cancer cells [16]. This form of clusterin thus appears as a pro-apoptotic factor. On the other hand, many investigators have demonstrated that overexpression of sCLU in prostate cancer cells protects them from TNF-induced apoptosis, enhancing the resistance of carcinoma cells to chemotherapy [6,17,18]. This form thus seems to be involved in cell survival and prostate cancer progression to androgen independence. Antisense oligonucleotides and small interfering RNAs targeting the full-length clusterin are reported to induce apoptosis and chemosensitivity *in vitro* as well as *in vivo*, in prostate cancer xenografts and in prostate cancer patients [17,18,19,20,21,22,23].

In a previous study we developed [6] an androgen-independent prostate cancer cell line (MLLTet-sClu) with stably integrated genes encoding the tetracycline transactivator factor and the secreted form of clusterin. In this line, sCLU expression is inducible by doxycycline (Dox). We studied in this line the effect of clusterin overexpression on TNF $\alpha$ - and ActD-induced apoptosis. In these experiments, the secreted form of clusterin was found to mediate survival of MLLTet-sClu cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, one of the major survival pathways in cells and one that is often constitutively activated in advanced stages of prostate cancer. Protein kinase B (Akt) is activated by phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate (PIP3), whose production is mediated by phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-kinase). Targets of Akt are involved in the regulation of proliferation, metabolism, and apoptosis [24]. The level of activated Akt is very high in recurring prostate cancers [25].

Other investigators have confirmed the involvement of the PI3 kinase/Akt pathway in mediating clusterin survival effects. In human retinal pigment epithelial cells subjected to oxidative stress, clusterin-induced Akt phosphorylation contributes to cell viability [26]. It has been shown that clusterin has a role protecting cardiomyocytes from oxidative stress via the Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway [27]. It has also been demonstrated that Akt induce sCLU to enhance survival and cytoprotection against Docetaxel in prostate tumor cells [28]. The same group has shown that once sCLU is present in prostate cancer cells, Akt inhibition cannot induce cell death even in the presence of Docetaxel. This matches our results in our previous work. In our cell line, overexpression of sCLU still protected 40% of the cells from TNF $\alpha$ -induced apoptosis, even when the PI3 kinase was inhibited

by wortmannin [6]. Hence, sCLU must be able to exert its protective effect in one or more additional ways.

It seems likely that clusterin does not act alone to mediate survival, so here our goal was to identify new factors induced by clusterin overexpression. For this we compared the proteomes of Dox-induced and noninduced MLLTet-sClu cells.

## **Materials and Methods**

### **Cells and cell cultures**

The MLLTet-sClu cell line, described by Ammar and Closset (2008), is derived from the rat prostate cell line Dunning R3327 MAT LyLu. It was maintained in RPMI supplemented with 10% Tet-System-approved foetal bovine serum (Tet-free FBS; Clontech, Palo Alto, CA), 50 U/ml penicillin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen).

MLLTet-sClu cells were cultured in RPMI supplemented with 1% Tet-System-approved foetal bovine serum, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, G418, and hygromycin.

### **Protein extracts from induced and noninduced MLLTet-sClu cells**

Clusterin expression was induced (or not) with Dox (2 µM unless specified otherwise). Cells were pelleted by centrifugation at 1000xg for 5 min. Proteins secreted into the cell culture medium were concentrated overnight at 4 °C with 3 volumes of Precipitant and 3 volumes of Co-precipitant of the 2D-Clean-Up Kit (Amersham Biosciences). After centrifugation for 30 min at 12000xg, the protein pellet was collected and re-solubilised in 1% Triton X-100, 1% CHAPS, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1.25 ml per pellet obtained from 15 ml medium). The resulting solution is henceforth called the “extracellular protein fraction”

The pellet of cells obtained from the cell culture was harvested. The cells were lysed with a digitonin-containing buffer (2 ml/T 75): 2 mM saccharose, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1/4 Complete tablet (Roche) per 5 ml, 0.15M MES at pH 6.8, and 0.12 mM digitonin. This buffer was added onto the cell pellet and incubated on ice for 5 min. Then the solution was centrifuged (480 g at 4 °C for 5 min). The supernatant (henceforth called the “cytoplasmic extract” was stored at -20 °C.

### **2D gel electrophoresis and image analysis**

Protein concentrations were determined in the cytoplasmic extract and extracellular protein fraction with the Plus One 2D Kit (Amersham Biosciences). Both fractions were then subjected to 2D SDS-PAGE. Prior to the first-dimension run, impurities were eliminated from the samples with the 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences, ville). Then 150 µg protein was dissolved in 320 µl



rehydration buffer: 7 M urea, 2 M thiourea, 1% ASB-14 (w/v), 1% CHAPS (w/v), 1% Triton X-100 (v/v), 20 mM DTT, 0.4% 3-10 ampholytes (v/v). Protein extracts were applied to an 18-cm IPG strip (Immobiline Dry strip, pH 3-10; Amersham Biosciences). IEF was performed (38750 V.h) in a Protean IEF Cell (Bio-Rad). Reduction of cysteins (in 6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS (w/v), 20% glycerol v/v, 130 mM DTT) and alkylation of free thiol groups (same buffer but 135 mM iodoacetamide instead of DTT) were done sequentially with 10 ml of each solution/strip. Then the gel strips were transferred to a 12.5 % SDS-polyacrylamide gel for the second-dimension run (100 W total) in an Ettan DALTsix Electrophoresis unit (Amersham Biosciences). The gels were silver stained, scanned with a Molecular Imager FX (Bio-Rad), and analysed with the Image Master 2D Platinumium program (Amersham Biosciences).

Triplicate gel sets were produced, each set comprising a gel run with a sample from induced cells, a gel run with a similar sample from non-induced cells, and a reference gel run with a mix of equal amounts of both samples. Only protein spot changes exceeding 1.5-fold were considered.

### **Identification by Mass Spectrometry**

After silver staining, protein spots of interest were manually excised from the gel, destained (with 30 mM potassium ferricyanide, 100 mM sodium thiosulfate), reduced (in 25 mM DTT, 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , for 45 min at 56 °C), alkylated (in 25 mM iodoacetamide, 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 30 min), and in-gel digested overnight at 37 °C with trypsin (Trypsin, sequencing grade; Roche) at 12 ng/ $\mu\text{l}$ . Peptides were eluted in three steps with 50% acetonitrile (v/v) - 1% formic acid (v/v). They were freeze-dried, resuspended in 20  $\mu\text{l}$  formic acid (0.1% v/v), and separated by reversed-phase liquid chromatography on an Ultimate LC system (LC Packings, Dionex). For elution, a linear gradient ranging from 2% acetonitrile (v/v), 0.1% formic acid (v/v) in mQ water to 80% acetonitrile (v/v), 0.1% formic acid (v/v) in mQ water was used (60 min elution time). The outlet of the LC system was connected directly to the nano-electrospray source of an Esquire HCT ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). Mass data acquisitions were performed in the 200–1500 m/z range. For each mass scan, a data-dependent scheme picked the three most intense doubly or triply charged ions. These ions were then selectively isolated and fragmented in the trap. The resulting fragments were

mass analysed. The data were analysed and formatted (Data Analysis software; Bruker) for subsequent protein identification by searching the MSDB database by means of an MS/MS ion search algorithm on the Mascot search engine ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

### **RNA isolation and RT-PCR**

Total RNA from induced and noninduced cells and from the prostates of intact and castrated rats was isolated by a single-step guanidium thiocyanate method with Tri-Pure reagent (Invitrogen) according to the protocol provided by the manufacturer.

Reverse transcription was performed as described previously [6].

For the PCR, the cDNA samples were diluted so as to obtain equal amounts of  $\beta$ -actin-specific fragment (internal standard). Each reaction mixture (25  $\mu$ l final volume) contained 10  $\mu$ l appropriately diluted cDNA solution, 100 pmol of each specific primer (see Table 1), 1 mM dNTP mix, and 2.5 U DNA polymerase (Eurogentec) in buffer (25 mM TAPS pH 9.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol). The temperature program was: 94°C for 1 min, annealing T° (see Table 1) for 1 min, extension at 72°C for 1 min. The number of cycles is specified in Table 1. After 2% agarose gel electrophoresis, the products were detected by ethidium bromide staining.

### **Western blot analysis**

Cells were cultured for 24 h in medium containing 1% Tet-free FBS, with or without Dox (final concentration as indicated). After harvest, they were centrifuged and washed twice with PBS. Extracts were prepared as described above. The bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL) was used to determine the protein content of each lysate. Samples were heated at 100°C for 5 min, electrophoresed through 12% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Bucking, England). The protein of interest was immunodetected with a specific monoclonal or polyclonal primary antibody and then with an anti-mouse or anti-rabbit Ig G coupled to horseradish peroxidase. ECL reagents (Sigma-Aldrich) were used for detection.

**Antibodies:**

Horseshoe peroxidase-conjugated secondary antibodies for immunoblotting were obtained from Amersham Biosciences. Antibodies against Actin and Clusterin were purchased from Upstate. Antibodies against OPN were purchased from Cell Signaling and antibodies against Hsp70, Hsp90, and PCNA were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-Arf1 was purchased from (San Bio).

## Results

### **Proteins differentially produced in induced and noninduced MLLTet-sClu cells**

Extracellular protein fractions and cytoplasmic extracts from noninduced and Dox-induced MLLTet-sClu cells were subjected to 2D SDS-PAGE. After silver staining and image analysis (see Fig. 1A for the extracellular protein fractions and Fig. 2A for the cytoplasmic extracts), respectively 15 and 25 spots were selected for excision and further analysis. Mass spectrometry revealed the identities of 18 of the corresponding proteins (Table 2 and 3). One of these was clusterin, which, as expected, was detected exclusively in the extracellular protein fraction and showed high overexpression in induced cells. It appeared on the stained gels as a “chaplet” of spots, probably corresponding to different posttranslational modifications (Fig. 1B).

Differential expression of eight proteins besides clusterin was demonstrated in both independent experiments and confirmed by western blotting (see Fig. 1B and Fig. 2B): in the cytoplasmic extract, three enzymes involved in energy metabolism (aspartate transaminase, malate dehydrogenase, and  $\alpha$ -enolase), the heat shock proteins Hsp70, Hsp90, Hsp86 (an Hsp90 isoform), and ADP ribosylation factor 1 (Arf1); in the extracellular protein fraction, osteopontin (bone sialoprotein, OPN). It is noteworthy that Hsp70, Hsp90, Arf1, and OPN have all been linked previously to cancer (references in Table 2). What's more, the two heat shock proteins and OPN have been explicitly linked to resistance to chemotherapy and the evolution of prostate cancer to androgen independence [29,30]. Differential expression of an additional cancer-related protein, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), was revealed in only one of the two independent proteomic analyses, but it was nevertheless confirmed by western blotting. These results and considerations led us to focus subsequently on Hsp70, Hsp90, Arf1, OPN, and PCNA.

### **Protein and transcript levels in relation to the doxycycline concentration**

First we examined by western blotting the relationship between the Dox dose and levels of the selected proteins (Fig. 3). Only PCNA failed to show a clearly dose-dependent response. Then, to assess the contribution of transcript-level regulation to the observed changes in the Hsp70, Hsp90, Arf1, OPN, and PCNA protein levels, we used specific primers (Table 1) to perform RT-PCR on RNA

extracts of noninduced MLLTet-sClu cells and cells exposed to different doses of Dox (Fig. 4). In this experiment, only the OPN transcript level was found to increase in the presence of Dox.

## Discussion

Our aim here was to identify new factors whose induction by the secreted form of clusterin might contribute to cancer cell survival and resistance to therapy. By comparing the proteomes of MLLTet-sClu cells induced or not to overexpress clusterin, we have identified proteins whose levels are significantly upregulated in response to sCLU overexpression. If we limit the list to the proteins showing upregulation on confirmatory western blots, these proteins are: enolase, malate dehydrogenase, aspartate transaminase, OPN, Hsp70, Hsp90, Arf1, and PCNA (although this last protein showed differential expression in only one of two independent experiments and although its level did not appear to depend on the external Dox concentration). Upregulation of some metabolic enzymes was to be expected in induced MLLTet-sClu cells, given the increased synthesis and secretion of sCLU. More strikingly, the other five proteins have all been implicated in cancer cell resistance to chemotherapy and/or the evolution of hormone-dependent cancer.

Here we establish, for the first time in a prostate cancer cell line, a link between clusterin overexpression and the upregulation of osteopontin (also called bone sialoprotein). OPN is a multifunctional secreted adhesive protein viewed as a marker of epithelial cell transformation [31]. Many studies have highlighted the role of OPN as a survival factor involved in the development of prostate cancer and its progression to androgen independence [29,30,32]. In particular, both the OPN level and the level of OPN transcripts increase with the grade of prostate cancer, and cells expressing the highest levels of OPN seem to be selected during metastatic progression [32]. OPN has been shown to act via the PI3-Akt pathway [33]. Recently, OPN was shown to promote prostate cancer cell progression processes by activating the Akt/ $\beta$ -catenin pathway [34]. Interestingly CLU and OPN are both up-regulated in development and the progression of prostate cancer *in vivo* in PTEN knockout mouse model [35]. Indeed recent results have shown that the sCLU is a metastasis mediator oppositely to the nuclear form (nCLU) which is an apoptosis mediator and metastasis inhibitor [36,37,38]. Very recently it has been shown that CLU promotes the mRNA expression and secretions of a number of chemokines including MMP9 and TNF- $\alpha$ , by macrophages via the ERK and PI3K/Akt signaling pathways and contributes to the macrophage chemotactic migration which consist an important step for tumor growth and metastasis [39,40]. Based on these recent results and ours, we can suggest that

clusterin secreted by tumor cells is an important mediator of metastasis as an enhancer of expression and secretion of chemokines responsible of the creation of a microenvironment favoring metastasis.

Heat-shock proteins, like clusterin itself, are described as molecular chaperones, i.e. proteins assisting the non-covalent folding/unfolding and assembly/disassembly of macromolecular structures and thereby contributing to housekeeping and maintenance within the cell. Some heat-shock proteins have been linked to tumour progression, their levels being high in certain cancers and associated with poor prognosis in terms of response to therapy and survival [41,42,43,44].

Heat-shock proteins are also described as stress response proteins, whose synthesis is upregulated in order to cope with cell-endangering conditions. They counter proteotoxic stress, for instance, by interacting with misfolded proteins and ensuring their clearance [45,46]. Both Hsp70 and Hsp90, when induced in response to cytotoxic stress, prevent cell death triggered by a variety of apoptotic stimuli, including heat shock, tumour necrosis factor, chemotherapeutic agents, and ionising radiation [44,47,48]. Conversely, depletion of these proteins disrupts their chaperoning functions and enhances TNF-triggered apoptotic effects. In keeping with these findings, the expression of heat-shock proteins in malignant cells appears to play a key role in protecting the cells from both malignancy-associated spontaneous apoptosis and apoptosis caused by therapy [41,49,50,51,52].

Hsp70 and Hsp90 have both been highlighted as regulators of apoptosis. By binding to the apoptotic peptidase-activating factor 1 (Apaf-1), Hsp70 has been shown to block signalling cascades leading to caspase-dependent apoptosis [53]. It has also been shown to inhibit caspase-independent apoptosis, by binding to and antagonising the apoptosis-inducing factor (AIF) [54].

An anti-apoptotic action of Hsp90 in tumour cells has also been demonstrated. This protein can suppress TNF-induced apoptosis by preventing cleavage of Bid [55]. It can also interfere with the intrinsic caspase apoptotic pathway by forming a cytosolic complex with Apaf-1, thereby inhibiting formation of an active apoptosome [56]. Hsp90 also enhances survival through its influence on Akt-mediated survival signalling [57] and on the Raf-MAP kinase growth regulatory pathway [58]. Furthermore, Hsp90 is essential to the stability of the constitutive protein kinase Pim-1 (Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase), a protein involved in cell survival, proliferation,

differentiation, apoptosis, and tumourigenesis [59]. Overexpression of the PIM-1 proto-oncogene has notably been linked to the development and progression of prostate cancer [60]. Treatment of human and mouse prostate cancer cell lines with an anti-Pim-1 antibody results in disruption of Pim-1/Hsp90 complexes, decreased Pim-1 and Hsp90 levels, reduced Akt phosphorylation at Ser473, reduced Bad phosphorylation at Ser112 and Ser136, and increased cleavage of caspase-9, an indicator of activation of the mitochondrial cell death pathway [61]. The fact that Pim-1 can phosphorylate the BAD protein, thereby preventing the pro-apoptotic action of this protein responding via diverse pathways to multiple apoptosis-promoting signals, provides an imaginable explanation of the ability of clusterin to protect MLLTet-sClu cells against TNF $\alpha$ -induced apoptosis when PI3 kinase is inhibited.

Together, these data highlight the important role of Hsp70 and Hsp90 in the resistance of prostatic cancer cells, and notably in inhibiting TNF-induced apoptosis. Any or all of the above-mentioned survival mechanisms might explain the resistance of Dox-induced MLLTet-sClu cells to apoptosis. In these cells, it is unclear whether clusterin overexpression constitutes a stress eliciting Hsp70 and Hsp90 upregulation, or whether clusterin acts as a specific upregulator. Whatever the case may be, our observations suggest that clusterin may increase cell survival by enhancing the expression of proteins that protect the cell from a toxic environment, stabilise the cell edifice, and/or regulate key steps in apoptosis pathways. One might speculate that in some cancer patients, such mechanisms contribute to clusterin-promoted escape from chemotherapy-induced and/or spontaneous apoptosis. It is noteworthy that clusterin, Hsp70, and Hsp90 are also upregulated *in vivo* in response to castration [4,62,63].

ADP-ribosylation factors (Arfs) are small GTPases that regulate vesicular trafficking through the exo- and endocytotic pathways. In addition to its role in vesicular trafficking, Arf1 is reported to be involved in cell processes such as protein transport, signalling, growth, and immunity [64]. Its overexpression appears to correlate positively, and its depletion negatively, with breast cancer cell migration and growth [65]. Arf1 might participate in signal transduction by recruiting key proteins to the vicinity of the cell membrane. It notably recruits the p110 subunit of the PI3 kinase, thereby favouring Akt phosphorylation and activation [66]. In our model it would be worth investigating



whether the Arf1 level rises merely in order to cope with increased clusterin secretion, or whether this protein actually helps to mediate the anti-apoptotic effect of sCLU, in a PI3-dependent or -independent manner.

PCNA, finally, is a proliferation marker involved in DNA repair, replication, post-replication modifications, and chromatin assembly. The differentiation and proliferative activity of tumour cells are important predictors of the aggressiveness of a carcinoma. A correlation has been evidenced between PCNA-positive immunostaining and carcinoma grade [67,68], and the PCNA index has been proposed as an objective and quantitative means of evaluating the malignancy of prostate cancer [69]. Here we demonstrate that sClu overexpression is accompanied by PCNA upregulation. As in a previous study sClu overexpression appeared not to affect the proliferation rate of MLLTet-sClu cells [6], it could be that PCNA exerts a proliferative action on these cells only under conditions that favour apoptosis, thus countering toxic effects and increasing cancer cell survival.

In conclusion, our proteomic study has revealed up-regulation by overexpressed sCLU of four proteins having established links with cancer progression. Further investigation is required to determine how clusterin and these survival actors are interlinked, to unravel the mechanisms underlying cancer cell resistance to therapy, and to develop more effective treatments. Nevertheless, our findings open new avenues for future research by suggesting, on the basis of the known properties and functions of these four proteins, at least seven imaginable mechanisms through which the secreted form of clusterin might exert anti-apoptotic effects in tumor cells: Akt activation (PI3-dependent or not), BAD phosphorylation (by Hsp90-stabilised Pim-1), inhibition of caspase-dependent apoptosis (via Hsp70 binding to Apaf-1), inhibition of caspase-independent apoptosis (via Hsp70 binding to AIF), enhanced chaperoning (by heat-shock proteins and perhaps by clusterin itself) and enhanced expression and secretion of chemokine such OPN.

## Acknowledgments

This work was supported by the *Fonds National de la Recherche Scientifique* (FNRS). Ammar Hayet was the beneficiary of a “*Télévie*” research grant.

We would like to thank Dr Kathleen Broman for critical reading of the manuscript and for her help with writing the text.

## References

1. Lee CT (2004) Re: Racial differences in mortality among Medicare recipients after treatment for localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 96: 718-719.
2. Lakins JN, Poon S, Easterbrook-Smith SB, Carver JA, Tenniswood MP, et al. (2002) Evidence that clusterin has discrete chaperone and ligand binding sites. *Biochemistry* 41: 282-291.
3. Poon S, Easterbrook-Smith SB, Rybchyn MS, Carver JA, Wilson MR (2000) Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 39: 15953-15960.
4. Montpetit ML, Lawless KR, Tenniswood M (1986) Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate. *Prostate* 8: 25-36.
5. Huovinen R, Warri A, Collan Y (1993) Mitotic activity, apoptosis and TRPM-2 mRNA expression in DMBA-induced rat mammary carcinoma treated with anti-estrogen toremifene. *Int J Cancer* 55: 685-691.
6. Ammar H, Closset JL (2008) Clusterin activates survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 283: 12851-12861.
7. Chen X, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, et al. (2001) Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene* 20: 6073-6083.
8. Bailey RW, Aronow B, Harmony JA, Griswold MD (2002) Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. *Biol Reprod* 66: 1042-1053.
9. Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Scorcioni F, et al. (2003) Nuclear translocation of a clusterin isoform is associated with induction of anoikis in SV40-immortalized human prostate epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 514-519.
10. Leskov KS, Klovov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA (2003) Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* 278: 11590-11600.
11. Miyake H, Chi KN, Gleave ME (2000) Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 6: 1655-1663.
12. Zhang H, Kim JK, Edwards CA, Xu Z, Taichman R, et al. (2005) Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol* 7: 909-915.
13. Jones SE, Jomary C (2002) Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 427-431.
14. Yang CR, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T, Pink JJ, et al. (2000) Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5907-5912.
15. Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Scorcioni F, et al. (2004) Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin. *Biochem J* 382: 157-168.

16. Scaltriti M, Bettuzzi S, Sharrard RM, Caporali A, Caccamo AE, et al. (2004) Clusterin overexpression in both malignant and nonmalignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer* 91: 1842-1850.
17. Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, et al. (1995) Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 55: 2431-2437.
18. Sintich SM, Steinberg J, Kozlowski JM, Lee C, Pruden S, et al. (1999) Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor-alpha in PC3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP-2 (clusterin). *Prostate* 39: 87-93.
19. Gleave ME, Miyake H, Zellweger T, Chi K, July L, et al. (2001) Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer. *Urology* 58: 39-49.
20. Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES (2004) Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. *Cancer Res* 64: 1834-1842.
21. Miyake H, Hara I, Gleave ME (2005) Antisense oligodeoxynucleotide therapy targeting clusterin gene for prostate cancer: Vancouver experience from discovery to clinic. *Int J Urol* 12: 785-794.
22. Chi KN, Eisenhauer E, Fazli L, Jones EC, Goldenberg SL, et al. (2005) A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 1287-1296.
23. Zoubeidi A, Chi K, Gleave M (2010) Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 16: 1088-1093.
24. Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68: 965-1014.
25. Ayala G, Thompson T, Yang G, Frolov A, Li R, et al. (2004) High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clin Cancer Res* 10: 6572-6578.
26. Kim JH, Jun HO, Yu YS, Min BH, Park KH, et al. (2010) Protective effect of clusterin from oxidative stress-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 561-566.
27. Jun HO, Kim DH, Lee SW, Lee HS, Seo JH, et al. (2011) Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Exp Mol Med* 43: 53-61.
28. Zhong B, Sallman DA, Gilvary DL, Pernazza D, Sahakian E, et al. (2010) Induction of clusterin by AKT--role in cytoprotection against docetaxel in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther* 9: 1831-1841.
29. Standal T, Borset M, Sundan A (2004) Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol* 26: 179-184.
30. Forootan SS, Foster CS, Aachi VR, Adamson J, Smith PH, et al. (2006) Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer. *Int J Cancer* 118: 2255-2261.
31. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO (1979) Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 16: 885-893.
32. Khodavirdi AC, Song Z, Yang S, Zhong C, Wang S, et al. (2006) Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. *Cancer Res* 66: 883-888.
33. Das R, Mahabeleshwar GH, Kundu GC (2003) Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* 278: 28593-28606.
34. Robertson BW, Chellaiah MA (2010) Osteopontin induces beta-catenin signaling through activation of Akt in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 316: 1-11.

35. Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, et al. (2003) Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4: 209-221.
36. Moretti RM, Mai S, Montagnani Marelli M, Rizzi F, Bettuzzi S, et al. (2011) Molecular mechanisms of the antimetastatic activity of nuclear clusterin in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 39: 225-234.
37. Moretti RM, Montagnani Marelli M, Mai S, Cariboni A, Scaltriti M, et al. (2007) Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 67: 10325-10333.
38. Flanagan L, Whyte L, Chatterjee N, Tenniswood M (2010) Effects of clusterin over-expression on metastatic progression and therapy in breast cancer. *BMC Cancer* 10: 107.
39. Shim YJ, Kang BH, Choi BK, Park IS, Min BH (2012) Clusterin induces the secretion of TNF-alpha and the chemotactic migration of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 422: 200-205.
40. Shim YJ, Kang BH, Jeon HS, Park IS, Lee KU, et al. (2011) Clusterin induces matrix metalloproteinase-9 expression via ERK1/2 and PI3K/Akt/NF-kappaB pathways in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol* 90: 761-769.
41. Nylandsted J, Brand K, Jaattela M (2000) Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 926: 122-125.
42. So A, Hadaschik B, Sowery R, Gleave M (2007) The role of stress proteins in prostate cancer. *Curr Genomics* 8: 252-261.
43. Kurahashi T, Miyake H, Hara I, 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.
44. Jones EL, Zhao MJ, Stevenson MA, Calderwood SK (2004) The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in prostate cancer. *Int J Hyperthermia* 20: 835-849.
45. Ellis RJ, van der Vies SM (1991) Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60: 321-347.
46. Carver JA, Rekas A, Thorn DC, Wilson MR (2003) Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB Life* 55: 661-668.
47. Jaattela M (1993) Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 151: 4286-4294.
48. Gabai VL, Budagova KR, Sherman MY (2005) Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene* 24: 3328-3338.
49. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, et al. (2000) Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7871-7876.
50. Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M (2004) Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle* 3: 1484-1485.
51. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, et al. (2004) Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 200: 425-435.
52. Harashima K, Akimoto T, Nonaka T, Tsuzuki K, Mitsushashi N, et al. (2005) Heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone complex inhibitor, radicicol, potentiated radiation-induced cell killing in a hormone-sensitive prostate cancer cell line through degradation of the androgen receptor. *Int J Radiat Biol* 81: 63-76.
53. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2: 476-483.
54. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, et al. (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3: 839-843.
55. Zhao C, Wang E (2004) Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Signal* 16: 313-321.

56. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, et al. (2000) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19: 4310-4322.
57. Sato S, Fujita N, Tsuruo T (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10832-10837.
58. Schulte TW, Blagosklonny MV, Ingui C, Neckers L (1995) Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J Biol Chem* 270: 24585-24588.
59. Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M, Petersen K, Meyer M, et al. (2001) Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* 2: 167-179.
60. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, et al. (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412: 822-826.
61. Hu XF, Li J, Vandervalk S, Wang Z, Magnuson NS, et al. (2009) PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *J Clin Invest* 119: 362-375.
62. Colombel M, Olsson CA, Ng PY, Buttyan R (1992) Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res* 52: 4313-4319.
63. Buttyan R, Zakeri Z, Lockshin R, Wolgemuth D (1988) Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol Endocrinol* 2: 650-657.
64. D'Souza-Schorey C, Chavrier P (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 347-358.
65. Boulay PL, Claing A (2009) [ARF proteins: molecular switches controlling tumour proliferation and metastasis]. *Med Sci (Paris)* 25: 783-785.
66. Boulay PL, Cotton M, Melancon P, Claing A (2008) ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* 283: 36425-36434.
67. Cappello F, Ribbene A, Campanella C, Czarnecka AM, Anzalone R, et al. (2006) The value of immunohistochemical research on PCNA, p53 and heat shock proteins in prostate cancer management: a review. *Eur J Histochem* 50: 25-34.
68. Visakorpi T (1992) Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J Pathol* 168: 7-13.
69. Naito S, Sakamoto N, Kotoh S, Goto K, Koga H, et al. (1994) Proliferating cell nuclear antigen in needle biopsy specimens of prostatic carcinoma. *Eur Urol* 26: 164-169.

### Figure legends

**Figure 1:** A: Representative 2D gel for the extracellular fraction of induced (I, treated for 24 h with 2  $\mu$ M Dox) and noninduced (NI) MLLTet-sClu cells. Culture supernatant was collected and concentrated, then separated by 2D PAGE. The gels were silver stained, scanned with a Molecular Image FX scanner, and then analysed with the Image Master 2D Platinum program. Spots showing more than 1.5 upregulation in the Dox-induced cells were excised, then analysed by mass spectrometry. B: On the left, magnification of zones 1 (corresponding to clusterin), 2 (corresponding

to lactate dehydrogenase, LDH), and 3 (corresponding to OPN). On the right, western blot analysis of these three proteins, showing upregulated expression of clusterin and OPN, but not LDH) in Dox-induced cells. The proteins of the extracellular fraction were separated by PAGE (12.5% acrylamide), blotted onto a nitrocellulose membrane, and detected with a monoclonal anti-alpha-clusterin antibody (band observed at 40 kDa), anti-LDH antibody (band at 37 kDa), or anti-OPN antibody (band at 33 kDa). The figure is representative of two independent experiments.

**Figure 2:** A: Representative 2D gel for cytoplasmic protein extracts of induced (I, treated for 24 h with 2  $\mu$ M Dox) and noninduced (NI) MLLTet-sClu cells. B: Western blot confirmation of upregulated factors. The results shown are representative of two independent experiments.

**Figure 3:** Western blot analysis of Clu, OPN, Hsp70, Hsp90, PCNA, and Arf1 in MLLTet-sClu. On the left: Immunoblots obtained after PAGE of the extracellular fraction of MLLTet-sClu cells. Detection was done with a monoclonal anti-rat clusterin (Upstate) or a polyclonal anti-rat OPN. MLLTet-sClu cells were cultured for 48 h in the presence or absence of doxycycline. The Dox concentrations tested were: 0 - 0.5- 1 - 2  $\mu$ M (lanes 1-4, respectively). The blue-stained gel is provided to show equal protein loading. On the right: immunoblots obtained after PAGE of cytoplasmic protein extract of MLLTet-sClu under the same conditions as above, After blotting, membranes were treated independently with polyclonal anti-hHsp70, anti-hHsp90, or anti-rat Arf1.

**Figure 4:** Representative PCRs, with specific primers, of reverse-transcribed total RNA extracted from MLLTet-sClu cells cultured for 48 h in the presence or absence of doxycycline. Concentrations tested: 0 - 0.2- 1 - 2 - 4  $\mu$ M (lanes 1-5, respectively). Reverse transcript size (Clu: 789pb; OPN: 811pb; hsp70: 520pb; hsp90: 101pb; PCNA: 675pb and Arf1: 775pb) was determined by comparison with the migration of a DNA molecular weight ladder. To check that equal amounts of cDNA were used, a rat  $\beta$  actin cDNA (411pb) was also amplified in the same samples.

## Tables

**Table 1:** Specific up- and downstream primers and PCR conditions (Annealing temperature (T°C) and number of cycles (Cycles)) used to amplify transcripts corresponding to factors upregulated in MLLTet-sClu cells overexpressing the secreted form of clusterin.

**Table 2:** Proteins of the cytoplasmic fraction showing differential regulation in MLLTet-sClu cells induced (with doxycycline) or not to overproduce the secreted form of clusterin. The molecular weight (MW) is in kDa (kDa), the number 1 or 2 represents the reproducibility of the result in one or two experiments. The confirmation by western blot (WB) is represented by (c) when it's confirmed, (not c) when it's not confirmed by WB or (not tested) when it's not tested by WB. References showing the implication of confirmed proteins, in cancer, are included.

**Table 3:** Proteins of the extracellular fraction showing differential regulation in MLLTet-sClu cells induced (with doxycycline) or not to overproduce the secreted form of clusterin. The molecular weight (MW) is in kilodalton (kDa). The number 1 or 2 represents the reproducibility of the result in one or two experiments. The confirmation by western blot (WB) is represented by (c) when it's confirmed, (not c) when it's not confirmed by WB or (not tested) when it's not tested by WB. References showing the implication of confirmed proteins, in cancer, are included.

<b>Protein</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>T°C</b>	<b>cycles</b>
Clusterin	5'TGCATGAAGTTCTACGCACG3'	5'TTGTTGGTCGAACAGTCCAC3'	60	28
OPN	5'CTTGCCCTCCTGTCTCCCGGTGAAA3'	5'TGTGAAACTCGTGGCTCTGATGTT3'	56	30
Hsp70	5'CAAGATCAGCGAGGCTGACAAG3'	5'AACTGTACACAGGGTGGCAGTG3'	65	30
Hsp90	5'GCCAACATGGAACGGATTATG3'	5'GGGTGGTCAGGGTTGATCTCT3'	65	30
Arf1	5'GGTGTGTGACGAGGAT3'	5'AGTTGCAATTGCGCTCATCG3'	60	35
β Actin	5'ATTGCCGATAGTGATGACCT3'	5'CGTGAAAAGATGACCCAGAT3'	59	20
PCNA	5'GGGGATTAGACGGTTGCGGGC3'	5'GCCAAGCTCCCCACTCGCAG3'	60	40

**Table 1**

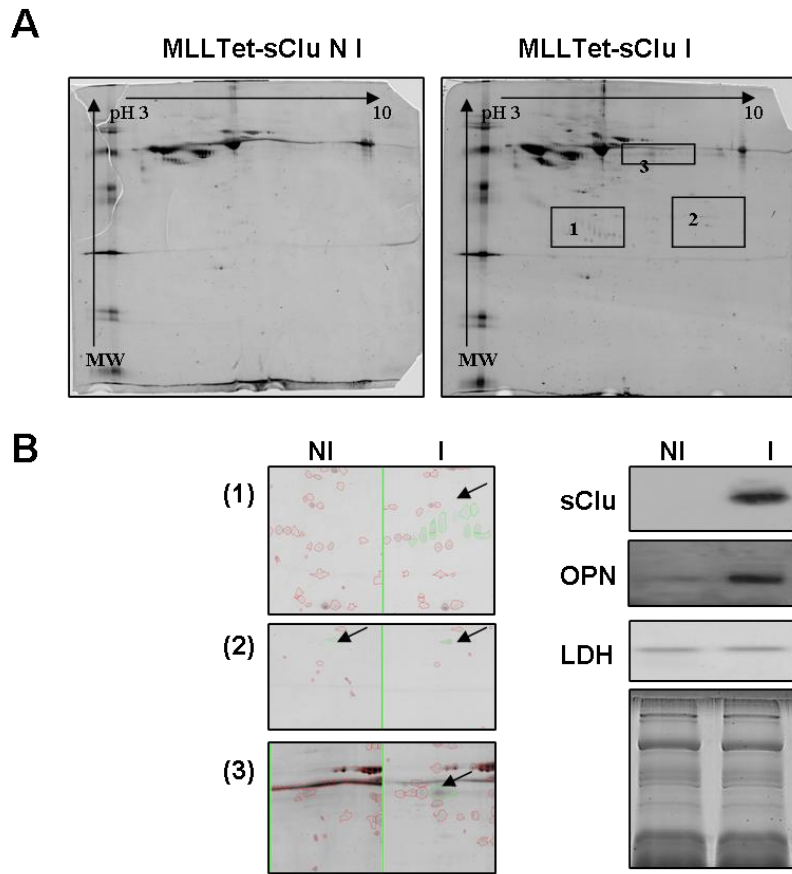


MW (kDa)	IP	Protein name	Reproducibility	Confirmed or not	References
85,16	4,93	Hsp 86 (Hsp90 Isoform)	2		
83,47	5,06	Hsp90	2	c	[52]
70,47	5,25	Hsp70	2	c	[44,48,50,51]
21	6,36	ARF-1	2	c	[64,66]
52	7,3	CAP-1	2	Not c	
29,072	4,57	PCNA	1	c	[67]
51,584	4,64	Ribonuclease inhibitor	2	Not c	
48	9,13	Aspartate transaminase	2	c	
36,099	8,92	Malate dehydrogenase	2	c	
47	5,84	$\alpha$ Enolase	2	c	
36,099	6,28	Aldose reductase	1	Not tested	
55,542	7,48	UDP-glucose dehydrogenase	1	Not tested	
36	5,17	Annexin V	2	Not c	

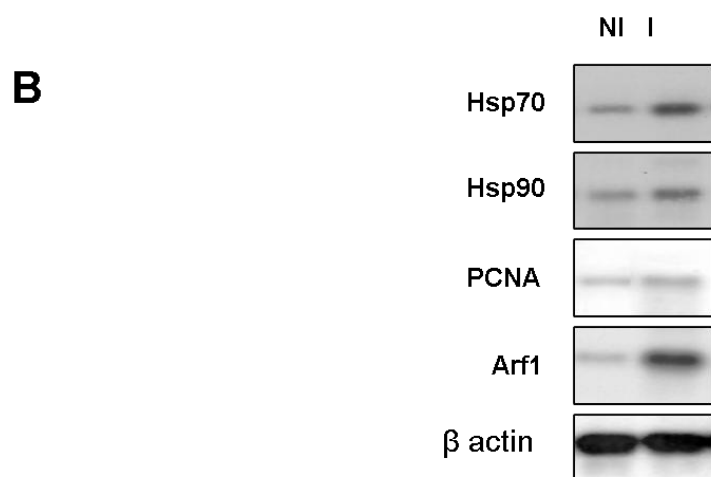
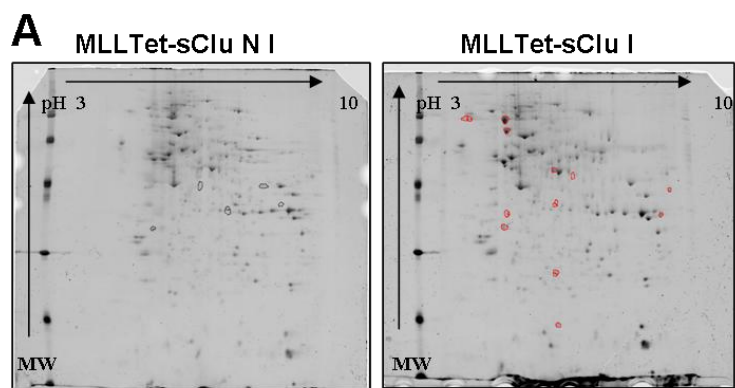
**Table 2**

<b>MW</b>	<b>IP</b>	<b>Protein name</b>	<b>Reproducibility</b>	<b>Confirmation</b>	<b>references</b>
51,970	5,47	TRPM2	2	c	
51,992	5,58	Clusterin	2	c	
33,228	4,33	Osteopontin	2	c	[30,32]
35,634	4,93	Annexin V	1	c	
36,712	8,45	LDH	1	Not c	
85,16	4,93	Hsp86	1	Notc	
83,47	5,06	Hsp90	1	Not c	

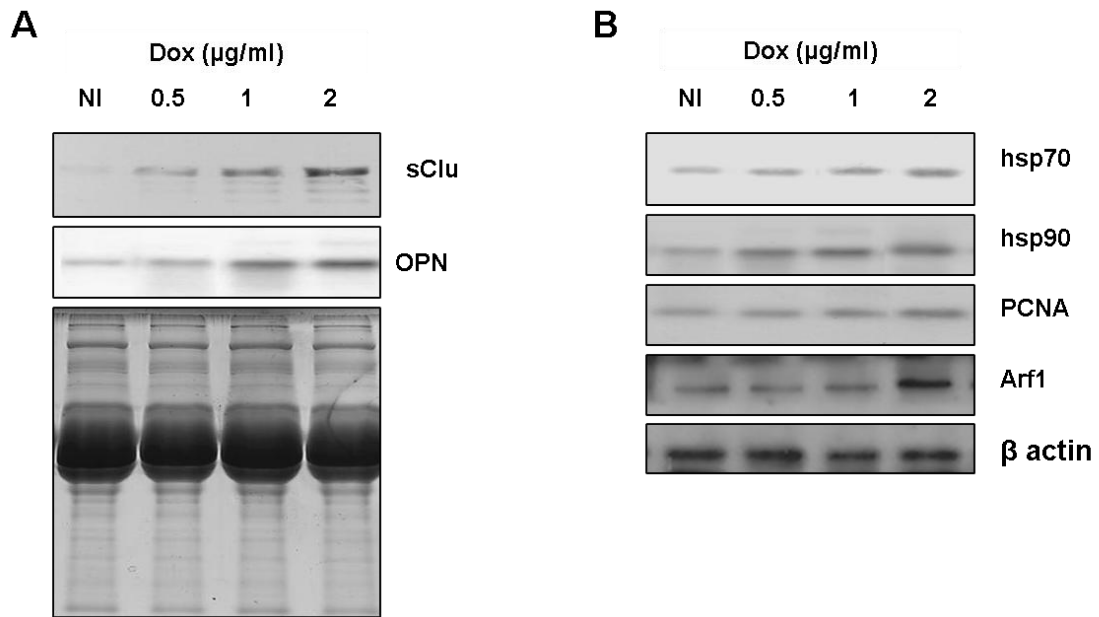
**Table 3**



**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

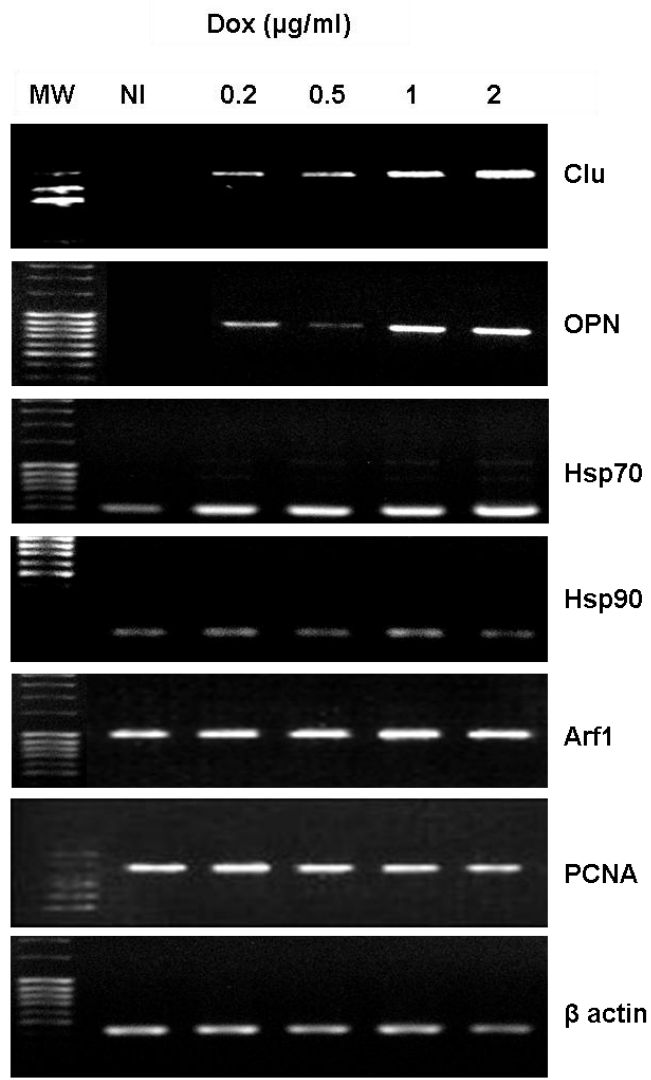


Figure 4



## IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse (réalisé entre 2000 et 2005), nos objectifs étaient d'une part de comprendre l'implication de la forme secrétée de la clusterine dans la résistance des cellules tumorales prostatiques lors de l'apoptose induite par TNF $\alpha$  et l'actinomycine D et, d'autre part d'identifier le ou les modes d'action de cette forme protéique. Pour ce faire, nous avons établi une lignée double stable et inductible par la doxycycline qui surexprime la forme secrétée de la clusterine (sCLU) en fonction de la dose d'antibiotique.

Pour la réalisation de la lignée inductible, nous avons choisi la cellule MatLyLu, une lignée cancéreuse androgéno-indépendante de rat exprimant très faiblement la clusterine. Comparée à d'autres lignées cellulaires prostatiques comme PIF et MatLu, les cellules MatLyLu possédaient le niveau d'expression de la clusterine le plus faible.

Comme la clusterine se présente sous plusieurs formes, nous nous sommes d'abord préoccupés des caractéristiques de la protéine surexprimée par les cellules MLLTet-sClu. Nous avons montré que la protéine produite était quasi exclusivement secrétée. Aucune forme de la clusterine autre que celle excrétée n'a pu être décelée ni par western blotting, ni par microscopie confocale ni par analyse protéomique, ce qui confère à la lignée inductible tout son intérêt.

Nous avons montré que quelque soit le clone ou le niveau d'expression de la clusterine, celle-ci n'a pas d'effet sur la morphologie ou sur la prolifération des cellules transformées. Dans notre travail, nous avons dès lors choisi d'utiliser le clone pour lequel la doxycycline induisait la production la plus forte de clusterine.

Notre modèle de lignée inductible est intéressant pour étudier la forme secrétée de la clusterine surtout face à l'existence de différentes formes protéiques au sein de la cellule. Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe pas encore d'outil pour les identifier structurellement. Nous pouvons les distinguer seulement par leur localisation cellulaire et par leurs effets. Comme l'expression de ces différentes formes protéiques ainsi que leur localisation peuvent être modulées par divers stimuli et sont dépendantes des conditions environnantes de la cellule, un modèle où l'expression de la protéine est sous le contrôle d'un système comme le TetOn permet d'éviter toutes les interférences dues aux régulations endogènes.

La plupart des cellules androgéno-indépendantes sont résistantes à l'apoptose. Il a dès lors été difficile de trouver un inducteur d'une mort cellulaire massive dans la lignée MatLyLu. Plusieurs inducteurs d'apoptose prostatique tels que le TGF $\beta$ , TRAIL, ou Fas L ont été testés sans succès dans le cadre de notre travail (données non montrées). L'apoptose n'a pu être induite de façon





massive au sein de ces cellules qu'en associant l'actinomycine D au TNF $\alpha$ . L'actinomycine D est un agent bloquant de la transcription qui permet la diminution rapide d'XIAP dans les cellules cancéreuses prostatiques (Ng et al., 2002).

TNF $\alpha$  induit l'apoptose *in vitro* dans les cellules prostatiques normales ou cancéreuses (Chopra et al., 2004; Katdare et al., 2007; Kulik et al., 2001) et notre choix sur base expérimentale, de TNF $\alpha$  pour induire l'apoptose dans les cellules prostatiques MLL s'est avéré judicieux puisque, très récemment, on a montré que TNF $\alpha$  est nécessaire *in vivo*, pour induire l'apoptose et la régression de la prostate chez la souris après castration (Davis et al., 2011).

Pour la suite de la discussion, nous avons subdivisé celle-ci en plusieurs sections. Dans la première section nous discuterons l'action de survie de la clusterine médiée par un mécanisme extracellulaire. Nous discuterons ensuite l'implication de la mégaline, comme récepteur de la clusterine. La voie Akt et les voies possibles par les quelles la sCLU pourrait médier son action de survie seront discutées dans les deux dernières sections. Nous terminerons par une conclusion à notre travail.

## 1. LA CLUSTERINE ACTIVE LA SURVIE VIA UN MÉCANISME EXTRACELLULAIRE

Notre modèle nous a permis de montrer que la surexpression de la sCLU protège les cellules de l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  et l'actinomycine D proportionnellement à la dose de doxycycline utilisée. En effet, en absence de sCLU, 50% des cellules meurent par apoptose. Par contre, la surexpression de la sCLU réduit ce taux à environ 10%. Nous avons ainsi confirmé l'effet protecteur de la clusterine lors de l'apoptose des cellules MatLyLu transformées.

Ensuite nous avons montré que l'action de survie de la clusterine est due à la forme sécrétée de la protéine, puisque la production de celle-ci mais aussi l'addition de clusterine purifiée dans le milieu de culture protège les cellules de l'apoptose induite par TNF $\alpha$ . Nos résultats sont en accord avec ceux de Sintich *et al.* qui ont montré d'une part, que la sensibilité des cellules LNCaP au TNF $\alpha$  diminuait en présence de la clusterine exogène et d'autre part, que l'addition d'un anticorps anti-clusterine aux cellules PC3 sensibilisait celles-ci à l'apoptose induite par TNF $\alpha$ . Sintich *et al.* ont fait l'hypothèse que cet effet protecteur de la clusterine dépendait d'une interaction directe de celle-ci avec le TNF $\alpha$ , son récepteur ou avec les molécules de surface impliquées dans la voie de transduction de cette cytokine (Sintich et al., 1999). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Trougakos *et al.*, qui ont montré que les effets toxiques de la forme intracellulaire peuvent être annulés par l'incubation des cellules d'ostéosarcome humain avec des fortes concentrations de sCLU. A l'opposé, l'utilisation d'un anticorps contre la forme sécrétée sensibilise ces cellules au stress génotoxique (Trougakos et al., 2005).

Nos résultats divergent de ceux obtenus par Zhang *et al.*, qui ont montré que la survie peut être activée par une forme intracellulaire de la clusterine dans les cellules de fibrosarcome de l'apoptose induite par l'étoposide (Zhang et al., 2005). Ces différents résultats peuvent être expliqués par les différences des systèmes étudiés et les inducteurs apoptotiques utilisés. Soulignons que récemment, Trougakos et son équipe ont montré qu'il existe une forme intracellulaire douée d'une activité protectrice, celle-ci sur le plan moléculaire s'apparente à la forme sécrétée et serait dépourvue du peptide signal (Trougakos et al., 2009b).

L'implication de la clusterine dans l'apoptose et la survie a été longtemps ambiguë suite aux différents résultats opposés publiés à ce sujet. Ce n'est que ces dernières années, à la lumière de l'existence de différentes formes protéiques de la CLU que ses contradictions ont trouvé une explication (voir intro). Aujourd'hui il est clairement admis qu'il existe 3 formes pour la CLU : une forme nucléaire apoptotique et deux formes anti-apoptotiques ; la forme cytoplasmique et la forme sécrétée (Bettuzzi and Rizzi, 2009; Rizzi et al., 2009; Trougakos et al., 2009b).

## 2. IMPLICATION DE LA MÉGALINE DANS LE MODE D'ACTION DE LA SCLU

La mégaline a été le premier récepteur identifié de la clusterine (Bartl et al., 2001; Kounnas et al., 1995a). C'est un membre de la famille des récepteurs au LDL (LDLR) (May et al., 2005). Ce récepteur a été étudié dans notre modèle comme intermédiaire possible de l'action de la sCLU au niveau membranaire. Nos résultats impliquent clairement la mégaline dans ce rôle. Ceux-ci montrent en effet, dans les cellules MLLTet-sClu une augmentation de la mégaline (mRNA et protéine) après induction de la surexpression de la sCLU par la doxycycline. Dans nos expériences, la mégaline co-précipite avec la clusterine. Ce récepteur est aussi phosphorylé et sa phosphorylation augmente avec le niveau d'expression de sCLU et diminue après traitement à la wortmannin, un inhibiteur de la PI3-kinase.

Nos résultats suggèrent donc que la mégaline ne serait pas seulement un récepteur endocytique qui protégerait les cellules d'un stress toxique mais qu'elle pourrait aussi médier l'action de survie de la clusterine en favorisant l'activation de différentes voies de transduction dont celle de la PI3-kinase. A ce propos, on peut rappeler que la mégaline a été identifiée comme un récepteur potentiel de la clusterine susceptible de lier cette protéine dans différentes circonstances pathologiques dont la maladie d'Alzheimer (Wilson et al., 2008). Elle possède dans sa partie cytoplasmique une séquence consensus de phosphorylation qui lui permet d'interagir avec les domaines SH2 de la PI3-kinase (Hjalm et al., 1996; Saito et al., 1994). En appui à ces données, nos résultats ont montré que la surexpression de la clusterine induit non seulement une augmentation de la phosphorylation de la mégaline mais aussi de l'Akt un des substrats de la PI3-kinase. L'activation de cette voie de survie est observée dans la plupart des cancers (Altomare and Testa, 2005; Ayala et al., 2004; Shukla et al., 2005). Dans le cancer prostatique,



cette voie est impliquée dans la progression androgéno-indépendante et dans la résistance des cellules aux thérapies par les agents cytotoxiques (Lee, 2004; Pfeil et al., 2004; Pinthus et al., 2007; West et al., 2002). Nos résultats ouvrent donc des nouvelles perspectives d'action de la mégaline et la sCLU dans la survie. Dans ce contexte, il est intéressant de rappeler que d'autres récepteurs VLDLR et le ApoER2, appartenant à la même famille que la mégaline sont également impliqués dans la transduction du signal (May et al., 2003; May et al., 2005). Ces récepteurs peuvent aussi lier la clusterine comme l'ont montré Bajari *et al.*, Bartl *et al.* et Kounnas *et al.* (Bajari et al., 2003; Bartl et al., 2001; Kounnas et al., 1995b).

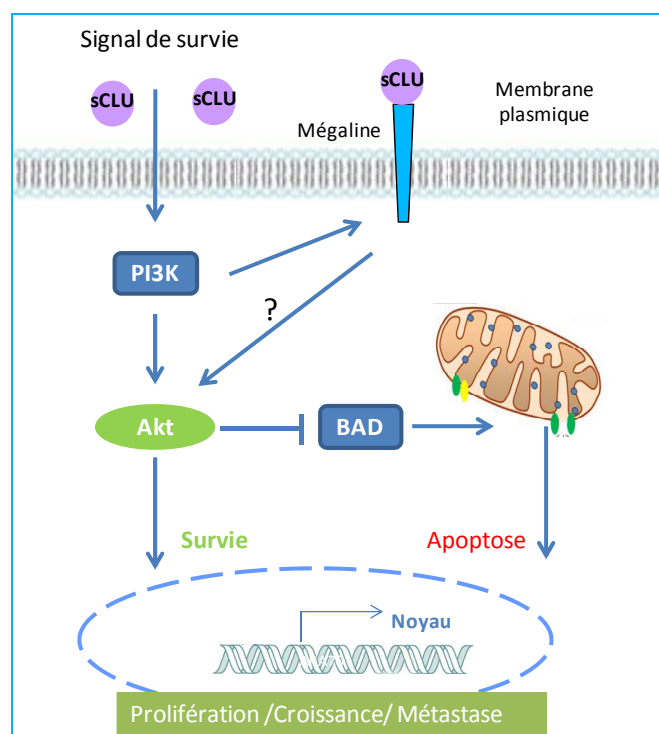
La mégaline semble être impliquée dans l'agressivité du cancer prostatique puisqu'une étude récente vient d'établir une corrélation entre une mutation ponctuelle dans la séquence de la mégaline et le risque de récurrence et la mortalité des patients souffrant de cancer prostatique (Holt et al., 2008). La mégaline a aussi été impliquée dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques dans le cancer du sein (Xue and Wong, 2012).

Très récemment, un autre membre LRP1, de la même famille des récepteurs aux LDLs a été impliqué dans une liaison avec le facteur de croissance MK (*midkine*) et dans l'activation des voies de signalisation. Ce facteur est surexprimé dans le cancer prostatique avancé et est connu pour son rôle de stimulateur de la croissance tumorale (Chen et al., 2007). Il n'existe cependant aucune liaison qui ait été établie dans la littérature entre LRP1, *midkine* et la clusterine. Quoiqu'il en soit de ces hypothèses, l'intérêt pour la mégaline dépasse aujourd'hui son utilisation comme récepteur endocytaire des drogues anti-cancéreuses. Celles-ci pourraient par son rôle dans la signalisation liée à la survie cellulaire, ouvrir à d'autres agents anticancéreux le champ d'action des nouvelles thérapies anticancéreuses.

### 3. LA SCLU ACTIVE LA VOIE DE SURVIE AKT

La voie de signalisation de l'activation d'Akt, ou l'inactivation de PTEN est un moyen pour la cellule cancéreuse d'échapper à l'apoptose dans un milieu dépourvu d'androgènes. En effet, dans près de 50% des tumeurs de la prostate, cette voie est constitutivement régulée à la hausse en raison d'une diminution ou d'une perte complète d'expression de ce gène suppresseur de tumeur, PTEN (Yoshimoto et al., 2006). Ce dernier fonctionne comme un régulateur négatif de cette voie par son activité lipide-phosphatase. Les cibles d'Akt sont impliquées dans la régulation du métabolisme et de l'apoptose (Brazil and Hemmings, 2001). Le niveau d'Akt activé est très élevé dans les cancers prostatiques récurrents (Ayala et al., 2004; Majumder and Sellers, 2005; Shukla et al., 2005) et la privation androgénique renforce la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques via l'activation d'Akt (Lee, 2004; Pfeil et al., 2004; Pinthus et al., 2007).

Dans la lignée MLLTet-On-sClu induite par la doxycycline, nous avons établi pour la première fois un lien entre la surexpression de la sCLU et l'activation de la voie Akt. En effet, nous avons montré que l'Akt phosphorylé au niveau de la Serine 473 augmente avec la dose de doxycycline utilisée. L'activation de la voie Akt /PI3K conduit à la phosphorylation dose dépendante de Bad, au niveau de la serine 136, ainsi qu'à une diminution du cytochrome *c*. Le Bad phosphorylé empêche la formation des pores au niveau de la mitochondrie et bloque le relargage du cytochrome *c* et inhibe l'apoptose induite par TNF $\alpha$  (figure IV.1). Ces résultats renforcent l'implication de la forme sécrétée de la clusterine dans la survie des cellules tumorales prostatiques pour échapper à la mort cellulaire programmée et montrent que la clusterine médie son rôle protecteur par la médiation de la voie Akt.



**Figure IV.1. Schéma montrant l'effet de la surexpression de la sCLU sur l'apoptose :** La surexpression de la sCLU est perçue par la cellule comme un signal de survie. Activation de la voie Akt, qui phosphoryle Bad et inhibe ainsi l'apoptose par le blocage du relargage du cytochrome *c* par la mitochondrie. La surexpression de la sCLU active la surexpression de la mégaline qui est phosphorylée de manière dépendante de la PI3-kinase. L'activation de la voie de survie Akt via le complexe sCLU/mégaline est une hypothèse qui n'a pas été vérifiée.

Très récemment, ce lien entre la clusterine et l'activation de la voie Akt a été confirmé dans d'autres modèles expérimentaux. Par exemple, dans les cellules de la rétine humaine RPE (*Retinal Pigment Epithelia*), la clusterine induit la phosphorylation d'Akt dans des conditions de stress oxydatif et contribue ainsi à leur survie. Par contre le blocage de la clusterine par un siRNA induit leur apoptose et ceci par désactivation de la voie Akt (Kim et al., 2009). Dans le même contexte, il a été démontré que la sCLU protège également les cardiomyocytes de la mort cellulaire programmée induite par le stress oxydatif, par l'activation de la voie Akt et GSK-3 (Jun et al., 2011). De plus, le blocage de la sCLU par un siRNA dans les cellules cancéreuses du



poumon NSCLC (*Non-Small Lung Cancer Cells*), inhibe la prolifération et induit l'apoptose de ces dernières, par inactivation de la voie de survie Akt (Yan et al., 2013). Dans ces mêmes cellules, il a été très récemment démontré que IGF-1 active la voie Akt via une surexpression de la sCLU (Ma and Bai, 2012).

Dans le cancer prostatique, le lien entre Akt et la clusterine a été observé aussi par Shim et ses collaborateurs. En effet, ceux-ci ont montré que la sensibilité des cellules cancéreuses prostatiques au tamoxifène résulte en une diminution rapide de la clusterine et de la phosphorylation d'Akt sur la Ser473 (Shim et al., 2009). Il a été également démontré que la sCLU et la voie Akt sont impliqués dans la résistance des cellules tumorales au docétaxel et au paclitaxel. Akt medie son action pour bloquer l'apoptose induite par ces agents thérapeutiques par l'activation de l'expression de la clusterine via STAT1 (Zhong et al., 2010). Il est donc possible qu'il existe une boucle de rétrocontrôle entre la clusterine et la voie Akt qui provoque l'évolution des cellules cancéreuses vers des stades de résistance aux agents thérapeutiques.

#### 4. LA SCLU N'ACTIVE PAS LA VOIE DE SURVIE NF KAPPA B

NFκB est un facteur de transcription qui a été associé à la progression et la survie des nombreux cancers et en particulier le cancer prostatique (Gasparian et al., 2002; Inoue et al., 2007; Jin et al., 2008; Karin, 2006; Shukla et al., 2005). NFκB est aussi une voie majeure de survie qui est activée lors de l'apoptose induite par le TNFα (Beg and Baltimore, 1996). Certains travaux suggèrent que la CLU par son activité chaperonne modifie la stabilité d'IκB et module l'activité de NFκB (Santilli et al., 2003).

L'action de la clusterine sur cette voie a été étudiée dans notre modèle de lignée inductible. Nos résultats montrent, contrairement aux observations réalisées par Santilli, que la clusterine ne modifie pas la stabilité d'IκB. La différence d'effet de la clusterine avec ce qui a été démontré par Santilli pourrait s'expliquer par le fait que dans notre modèle, c'est la seule forme sécrétée de la clusterine qui est étudiée (Santilli et al., 2003).

Une étude récente vient de confirmer cette hypothèse. C'est en fait la forme précurseur de la forme sécrétée (psCLU) qui interagit avec Iκappa B. Cependant, ni la chaîne α ni la chaîne β ne sont capables d'interagir isolément avec Iκappa B (Essabbani et al., 2010). De plus, la forme nucléaire semble induire l'apoptose par interaction avec NFκB et inhibition de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> (Takase et al., 2008)

## 5. LA SCLU ACTIVE LA SURVIE VIA D'AUTRES VOIES DE SIGNALISATION

L'utilisation de la Wortmannin un inhibiteur de la PI3K, dans notre modèle, a d'autre part montré qu'en absence de la clusterine, toutes les cellules meurent par apoptose après traitement au TNF $\alpha$ . Par contre, en présence de la clusterine, environ 40% des cellules résistent à la mort cellulaire programmée. Dès lors, la clusterine pourrait donc aussi agir via d'autres voies indépendantes de la PI3-kinase.

A ce propos, Il est connu que la clusterine possède des activités de protéine chaperonne. Elle pourrait donc aussi agir par interaction directe ou indirecte avec des facteurs de transduction impliqués dans les voies de survie.

Dans ce contexte il a été récemment démontré que dans le cytoplasme, la CLU joue un rôle de régulateur puissant de l'apoptose par son interaction avec Bax. En effet, la cCLU interagit avec Bax et stabilise le complexe Ku70-Bax, qui sert de facteur de rétention pour Bax et bloque ainsi l'apoptose (Trougakos et al., 2009b; Zhang et al., 2005). Nous pouvons éventuellement suggérer que la CLU peut être endocytée par la mégaline pour générer une forme cytoplasmique. Ce point mériterait d'être abordé, même si nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autres formes de la CLU que celle qui est sécrétée. La nature même de notre modèle montre ses limitations mais les méthodes immunologiques de détection avec leur sensibilité et leur spécificité in situ constituent une limitation plus générale à l'exploitation de la plupart des modèles sur le plan moléculaire.

Des études très récentes ont montré que la forme nucléaire de la clusterine contient dans son deuxième domaine coiled coil, un domaine d'homologie Bcl-2 (BH3) qui lui permet d'interagir avec la protéine Bcl-X<sub>L</sub> et libère ainsi Bax, pour promouvoir l'apoptose par activation de la caspase-3 et relargage du cytochrome c. Ils ont également montré que c'est seulement la forme nucléaire et non pas la forme sécrétée qui peut interagir avec Bcl-X<sub>L</sub>. (Kim and Choi, 2011).

## 6. IDENTIFICATIONS DES NOUVEAUX FACTEURS ET DES NOUVELLES VOIES POSSIBLES

Comme dans notre modèle la sCLU induit une protection des cellules épithéliales, malgré l'inhibition de la PI3-kinase par la wortmannin, nous avons conclu que la clusterine utilise aussi des voies alternatives pour protéger les cellules de l'apoptose. Afin d'identifier ces voies, nous avons choisi, dans la deuxième partie de notre travail, de réaliser une étude protéomique comparant les cellules non induites aux cellules induites pour l'expression de la sCLU.

L'étude protéomique de la lignée MLLTet-sClu nous a permis d'identifier des nouveaux facteurs régulés par la surexpression de la clusterine. Si on se limite aux facteurs confirmés par WB, on



peut dénombrer des protéines impliquées dans le métabolisme comme l' $\alpha$ -énolase, la malate déshydrogénase, l'aspartate transaminase, mais aussi d'autres protéines comme l'OPN, la Hsp70, la Hsp90, l'Arf1, et le PCNA qui sont intéressantes pour leur implications dans la progression du cancer.

L'augmentation de l'expression des protéines du métabolisme dans notre modèle, peut sans doute s'expliquer par les besoins énergétiques accrus des cellules ayant à assurer une production et une sécrétion abondante de clusterine.

Parmi les autres protéines identifiées, les plus intéressantes sont les protéines chaperonnes, la hsp70 et la hsp90. Ces protéines du choc thermique sont des chaperonnes moléculaires qui aident à la formation structurelle et au folding d'une grande variété de protéines tels que ErbB2, Src, Abl, Raf et Akt (Pearl and Prodromou, 2006; Takayama et al., 2003). Ces deux chaperonnes peuvent aussi interagir avec le récepteur aux androgènes, sauvage ou muté, en lui conférant une conformation permettant une réponse optimale aux androgènes (Pratt et al., 2004).

Hsp70 et Hsp90, comme la clusterine, sont des chaperonnes induites dans plusieurs modèles d'apoptose suite à différents traitements (Gabai et al., 2005; Jaattela, 1993; Jones et al., 2004). Leur surexpression peut être expliquée par leur intervention dans la protection de l'édifice cellulaire, mais aussi dans l'élimination des débris produits suite à l'apoptose ou à la nécrose (Carver et al., 2003; Ellis and van der Vies, 1991). Il n'est dès lors pas étonnant de voir augmenter les protéines du choc thermique lors d'une surexpression de la clusterine. En effet, cette situation est similaire à celle observée dans le modèle de rat castré. Il est dès lors intéressant de noter que la surexpression de la clusterine est corrélée à l'augmentation de Hsp70 et Hsp90 (Buttayan et al., 1988; Colombel et al., 1992; Montpetit et al., 1986). Il se peut que cette surexpression soit perçue par la cellule comme le démarrage d'un stress qui les amène à préparer leur défense.

Enfin, la Hsp70 et la Hsp90 comme la clusterine sont impliquées dans la progression du cancer et dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Leur niveau d'expression est élevé et il est associé au mauvais pronostic de certains cancers et notamment le cancer de la prostate (Jones et al., 2004; Kurahashi et al., 2007; Nylandsted et al., 2000a). Par contre, l'inhibition de ces chaperonnes par des siRNA ou par d'autres inhibiteurs spécifiques, augmentent la sensibilité des cellules cancéreuses aux inducteurs d'apoptose et favorise leur mort (Dote et al., 2006; Lamoureux et al., 2011; Nylandsted et al., 2000b). Ces propriétés justifient l'intérêt porté à ces facteurs pour mieux comprendre et combattre les mécanismes de défense développés par les cellules cancéreuses (Ischia et al., 2013).

Dans ce contexte, plusieurs travaux ont montré l'implication de Hsp70 et 90 dans la régulation des voies apoptotiques ou de survie suite à leur interaction avec différentes composantes de ces

voies. En effet, par association à Apaf-1, elles bloquent la signalisation conduisant à l'activation en cascade des caspases (Pandey et al., 2000; Saleh et al., 2000). Hsp70 peut aussi inhiber la voie apoptotique indépendante des caspases, en se liant à l'AIF (Ravagnan et al., 2001).

Hsp90, quant à elle active aussi la survie en agissant sur la voie Akt (Sato et al., 2000) et sur la voie des Raf-MAP kinase (Schulte et al., 1995). Par ailleurs, la présence de Hsp90 est capitale pour la stabilité de la protéine kinase Pim-1 (*Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*) impliquée dans la survie, la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la tumorigenèse (Bachmann et al., 2004; Wang et al., 2001). La surexpression du proto-oncogène PIM-1, est hautement liée au développement et la progression du cancer prostatique (Dhanasekaran et al., 2001). Il a été récemment démontré que Pim-1 active la phosphorylation de Bad et inhibe ainsi l'apoptose de manière indépendante de la PI3-kinase (Hu et al., 2009a; Hu et al., 2009b). La fonctionnalité de cette voie mériterait d'être testée dans notre lignée inducible. Celle-ci permettrait peut être d'expliquer la résistance des cellules surexprimant la sCLU à l'apoptose induite par TNF $\alpha$  lorsque la PI3-kinase est inhibée par un traitement à la wortmannin.

Le PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), est un marqueur de prolifération impliqué dans la réparation de l'ADN, la réplication, et l'assemblage de la chromatine. Une forte corrélation entre le marquage positif en immuno-histologie du PCNA et le grade du cancer est évidente (Visakorpi, 1992). Le taux de PCNA a d'ailleurs été proposé comme un moyen objectif et quantitatif pour évaluer l'agressivité du cancer prostatique (Cappello et al., 2003; Naito et al., 1994; Nemoto et al., 1993).

Nous avons observé une surexpression du PCNA dans les cellules induites pour l'expression de la clusterine. Cependant, cette augmentation n'a pu être corrélée à aucune altération de la prolifération cellulaire. Il se pourrait que la clusterine, comme facteur de survie induise le PCNA pour contrebalancer via la prolifération cellulaire, l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques. Néanmoins, dans la littérature, l'action de la clusterine sur la prolifération est très controversée (Bettuzzi et al., 2002; Moretti et al., 2007b; Scaltriti et al., 2004a; Scaltriti et al., 2004b).

Dans nos travaux, nous avons aussi identifié une corrélation entre la surexpression de la sCLU et celle de l'Arf1 (*ADP-ribosylation factor 1*), une petite GTPase qui régule le trafic des vésicules (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Celui-ci pourrait jouer un rôle dans la croissance des cellules cancéreuses et la propagation des tumeurs hormono-sensibles. De part sa fonction, Arf1 pourrait être impliquée dans la sécrétion de la sCLU par les cellules cancéreuses et ainsi favoriser leur survie. On sait à ce propos que l'inhibition de l'expression d'ARF1 engendre une inhibition de la prolifération et de la migration du cancer prostatique. Ces fonctions sont assurées par l'activation de la voie PI3-kinase/Akt. Dans ce contexte, il est intéressant de noter qu'Arf1 est





aussi impliqué dans le recrutement de la sous unité catalytique (p110a) de la PI3K au niveau de la membrane plasmique (Boulay et al., 2008).

## 7. LA SCLU STIMULE L'EXPRESSION DE LA CYTOKINE OPN

De manière intéressante, notre étude protéomique a permis d'établir un lien entre la surexpression de la clusterine et celle de l'OPN. L'ostéopontine est une phosphoglycoprotéine sécrétée, inhibitrice de la minéralisation osseuse. Elle est impliquée dans l'inflammation, l'athérosclérose et la progression tumorale. L'augmentation de son expression est corrélée à une charge tumorale élevée et à une forte probabilité de métastases osseuses dans les cancers du poumon, du colon, du foie, du sein et de la prostate (Wai and Kuo, 2004). Cette chémokine, médie ses effets migratoires via les voies PI3 kinase/Akt, EGFR, MMP, Erk et NFκB (figure IV.2) (Rangaswami et al., 2006).

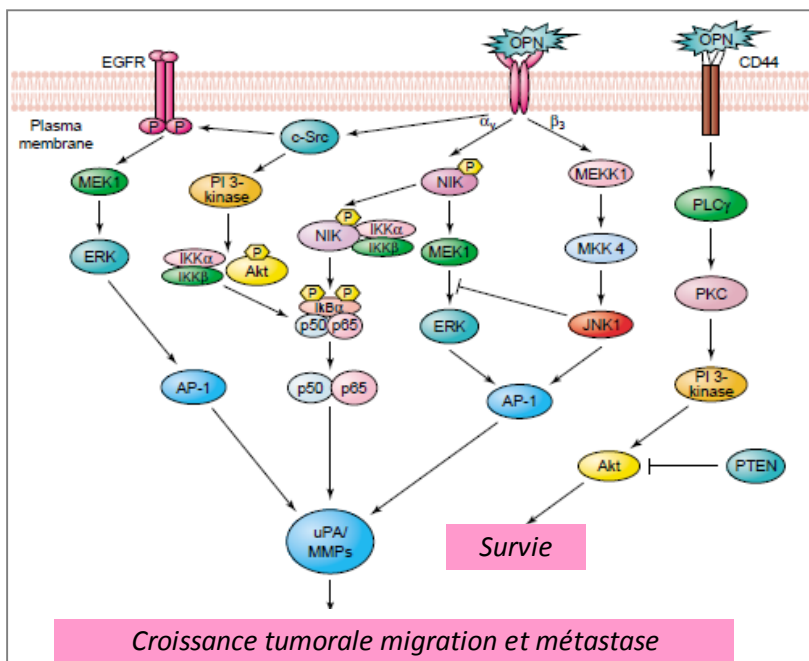


Figure IV.2. Schéma montrant l'implication de la l'ostéopontine dans les voies de signalisation impliquées dans la survie, la croissance tumorale et la migration (Rangaswami et al., 2006).

De plus, il a été récemment démontré que l'OPN protège les cellules de l'apoptose par activation de la voie PI3-kinase/Akt (Das et al., 2003) et qu'elle favorise la progression du cancer prostatique en stimulant la voie Akt/β-catenin (Robertson and Chellaiah, 2010).

Une étude récente a aussi montré que la sCLU et l'OPN produites par les cellules souches embryonnaires de souris inhibent l'apoptose des cellules du myocarde, induite par le stress oxydatif (Singla and McDonald, 2007). Il serait donc utile de vérifier la sécrétion de ces facteurs par les cellules souches cancéreuses puisque celles-ci jouent un rôle important dans la progression du cancer prostatique résistant aux effets de la castration (CRPCa) (Collins and Maitland, 2006; Maitland et al., 2006).

La clusterine et l'ostéopontine ont été impliquées dans la progression du cancer prostatique chez la souris KO pour PTEN (figure VI.3). En effet, leur surexpression augmente avec l'évolution de la tumeur. Cette surexpression est accompagnée, comme attendu de l'augmentation d'Akt (Wang et al., 2003). Chez la souris, le KO conditionnel pour PTEN dans la prostate entraîne une hyperplasie de la glande avec l'apparition des nombreux PINs. La prostate adénomateuse devient en 9 semaines cancéreuse et invasive, avec formation de métastases au niveau lymphatique, des poumons et des os. Un rôle permissif de la clusterine et de l'OPN dans la dissémination de la tumeur peut dès lors être proposé, d'autant que des données récentes ont impliqué la clusterine dans la migration et l'invasion du cancer prostatique. La forme sécrétée de la CLU joue un rôle activateur alors que la forme nucléaire est inhibitrice de la migration (Bettuzzi et al., 2009; Moretti et al., 2011; Moretti et al., 2007a; Moretti et al., 2007b).

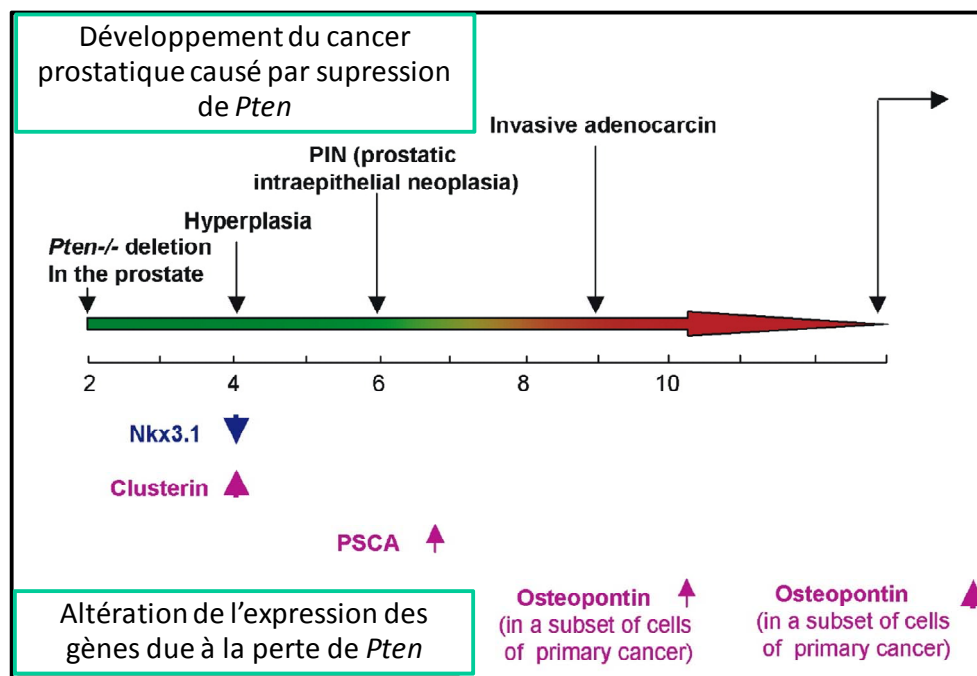


Figure IV.3. Schéma montrant l'implication de la clusterine et l'ostéopontine dans le développement et la progression du cancer prostatique. (D'après (Wang et al., 2003)).

En guise de synthèse de nos résultats et de ceux de la littérature récente, nous avons dressé le schéma ci-dessous. Celui-ci récapitule les différentes voies possibles par lesquelles la forme sécrétée de la clusterine pourrait agir pour activer le processus de survie et de résistance des cellules cancéreuses au traitement induisant la mort (figure VI.4).



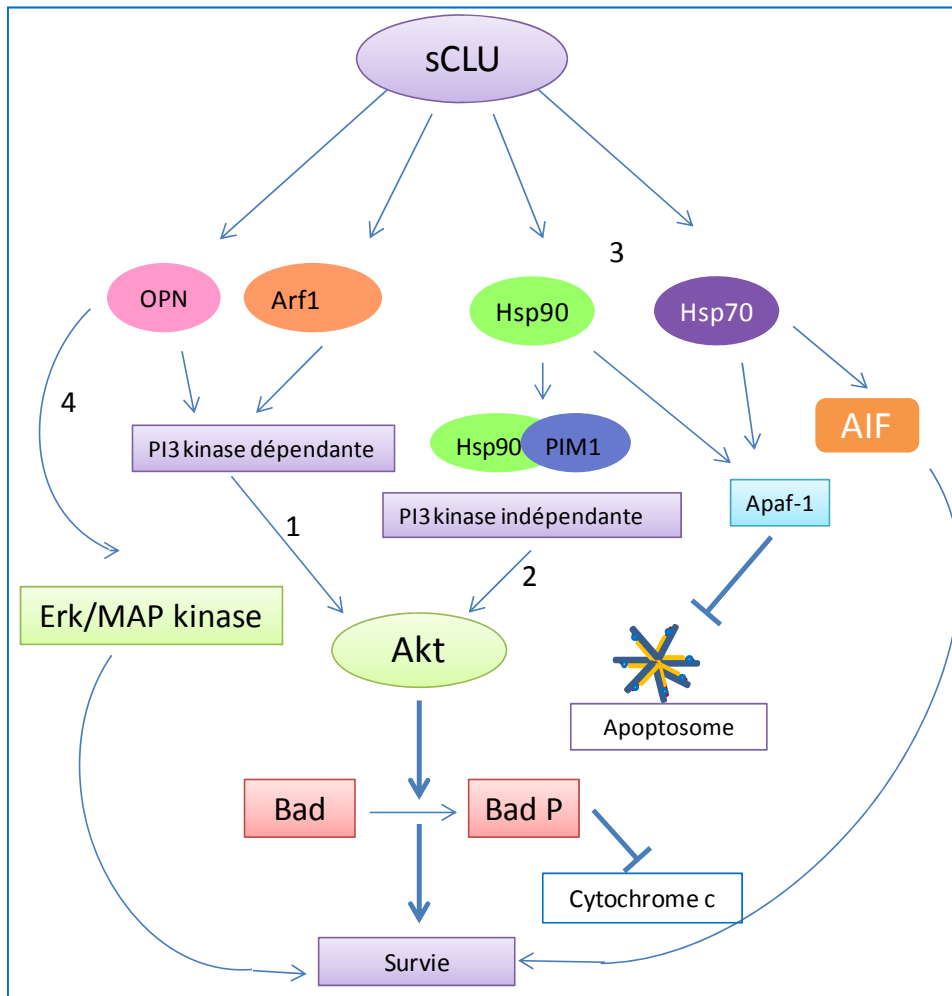


Figure IV.4. Schéma synthétisant les voies possibles par lesquelles la sCLU pourrait médier la survie dans les cellules cancéreuses prostatiques.

Ces différentes voies possibles pour expliquer l'effet de survie de la sCLU, sont:

1. Activation de la voie Akt de manière PI3-kinase dépendante par la phosphorylation de Bad et inhibition du relargage du cytochrome c.
2. De manière PI3-kinase indépendante via Hsp 90 qui stabilise la kinase PIM1.
3. Inhibition de l'apoptose caspase dépendante par interaction de la Hsp70 ou la Hsp90 avec Apaf-1 ou même caspase indépendante via l'interaction Hsp70 avec AIF.
4. Par la stimulation de l'expression et de la sécrétion de la chemokine l'OPN en activant la voie Akt et bien d'autres voies comme la voie ERK/MAP kinase.
5. Par son action chaperonne et via l'action des chaperonnes, comme la Hsp70 et la Hsp90.
6. Par l'activation de la prolifération lors de l'induction de l'apoptose.

Plus d'investigations seront cependant nécessaires pour confirmer les hypothèses émises sur ces voies alternatives et leur capacité à constituer des cibles thérapeutiques efficaces pour vaincre la progression du cancer prostatique et d'autres cancers.

## 8. CONCLUSION GÉNÉRALE

Notre modèle de lignée inductible s'est avéré être un modèle pertinent pour étudier une forme particulière de la CLU. C'est un modèle qui nous a permis d'étudier la forme secrétée sans interférence apparente avec d'autres formes de la clusterine.

A l'aide de ce modèle, nous avons identifié différents modes d'action de la sCLU dans les cellules épithéliales prostatiques qui permettent de contrecarrer l'apoptose induite par TNF $\alpha$ /ActD. Dans les cellules prostatiques androgéno-indépendantes, elle agit sur la voie de survie Akt en l'activant, permettant aux cellules de résister à l'apoptose et ainsi d'échapper à la mort. Dans ces cellules, l'effet anti-apoptotique ne passe pas par la voie NF $\kappa$ B. Nous avons également montré que cette forme secrétée agit par un mécanisme extracellulaire qui impliquerait la mégaline.

La surexpression de la sCLU dans les cellules épithéliales prostatiques stimule la production d'autres facteurs protéiques. Ceux-ci ont été identifiés grâce à l'étude protéomique de la lignée inductible MLLTet-sClu. Parmi ces facteurs, on trouve les protéines heat chocs Hsp70 et Hsp 90 et l'ostéopontine (OPN), déjà impliquées dans la survie et la progression tumorale du cancer prostatique.

Nos résultats permettent d'éclairer les mécanismes qui sous-tendent l'action de la clusterine dans la survie et ouvrent ainsi des nouvelles perspectives de recherches tant fondamentales que thérapeutiques. D'autres investigations cependant sont nécessaires pour établir les liens existants entre ces différents facteurs et voies d'action stimulées par la surexpression de la sCLU. La clusterine n'est pas une simple chaperonne, c'est aussi une protéine impliquée dans des voies de transduction.

Pour mieux comprendre les effets de la clusterine dans toutes leurs variétés, il faut continuer à développer les techniques de caractérisation et d'identification de chacune des formes de la molécule. Il sera ainsi possible de lier comme nous avons tenté de le faire, dans les modèles cellulaires adéquats, chacune de ces formes à leur activité biologique propre.





# V. MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. ANIMAUX

Les rats Wistar mâles adultes ont été achetés chez IFFA Credo (Bruxelles, Belgique) et maintenus à l'animalerie dans des conditions standards d'éclairage et de température. Ils ont été castrés sous anesthésie à l'éther par une incision au niveau du scrotum. Les animaux ont été sacrifiés 4 jours après l'opération (n=4 par groupe).

Les prostates d'animaux castrés ont été prélevées après le sacrifice, puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -70°C.

## 2. LES LIGNÉES CELLULAIRES

Les lignées cellulaires tumorales prostatiques androgéno-indépendantes de rat MAT LyLu, MAT Lu et PIF nous ont été données par le Dr. De Coster (Beerse, Belgique).

### 2.1.1. CULTURES CELLULAIRES

Les cellules sont cultivées en présence de milieu complet: RPMI 1640 additionné de L-glutamine et tamponné par de l'HEPES 25 mM (Life Technologies, Bethesda, USA), supplémentés avec 10% de sérum foetal bovin (Life Technologies, Bethesda, USA), 50U/ml de pénicilline (Life Technologies, Bethesda, USA), et 50µg/ml streptomycine (Life Technologies, Bethesda, USA). Elles sont maintenues dans une atmosphère humide (95% d'humidité) composée de 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est remplacé toutes les 24 à 48 heures.

### 2.1.2. TEST DE VIABILITÉ

Les cellules MAT LyLu sont récoltées, centrifugées 10 minutes à 200 g et lavées 2 fois avec du PBS. Ensuite, elles sont incubées 10 minutes dans une solution de bleu trypan 0,4% (Sigma, Deisenhofen, Allemagne)-PBS à température ambiante. Elles sont à nouveau centrifugées 10 minutes à 200 g et reprises dans du PBS pour être comptées au microscope optique à l'aide d'une cellule de Thoma.

### 2.1.3. TRANSFECTIONS

Toutes les expériences de transfection sont basées sur le principe de la lipofection à l'aide du réactif « LipofectAMINE Plus Reagent » (Life Technologies). Les conditions optimales de



transfection ont été déterminées à l'aide du vecteur d'expression pCMV-LacZ (Clontech) par analyse au microscope optique après le test X-Gal. Les cellules sontensemencées à raison de  $6.10^5$  cellules par puits de 3 cm de diamètre avec 2 ml de milieu de culture complet. Après 18 heures d'incubation, le complexe de transfection est préparé: Dans un volume final de 100  $\mu$ l de milieu RPMI 1640, 1,5  $\mu$ g de DNA et 7  $\mu$ l de Reagent Plus, sont incubés 15 minutes à température ambiante, Ensuite ils sont mis en présence de 100  $\mu$ l de milieu RPMI 1640 contenant 4,8  $\mu$ l de lipofectAMINE Plus. La solution est délicatement mélangée et incubée à température ambiante pendant 15 minutes. Les cellules sont rincées deux fois avec une solution de PBS (Life Technologies) et recouvertes de 800  $\mu$ l de milieu RPMI 1640 auxquels la solution de transfection est ajoutée. Les plaques de 6 puits sont agitées par 4 à 5 rotations lentes et incubées 4 heures à 37°C. Au terme de l'incubation, la solution de transfection est remplacée par 2 ml de milieu complet (avec sérum et antibiotiques). Les cellules sont récupérées par trypsination pour être analysées après des temps d'incubation variant entre 6 et 24 heures.

---

#### 2.1.4. LA CYTOMÉTRIE DE FLUX

La cytométrie en flux est une technique rapide et précise qui allie optique, laser, dynamique des fluides et électronique. Elle permet de mesurer différents paramètres cellulaires (taille, granulosité et fluorescence). Les cellules circulent dans une veine liquide (flux) qui les entraîne une à une devant une station de mesure. Cette dernière quantifie l'intensité de lumière de diffusion et les intensités de fluorescence différentes émises simultanément et à différentes longueurs d'onde par chaque cellule traversant un laser utilisé comme source d'excitation.

Le cytomètre à flux Facstar Plus (Becton Dickinson) est équipé d'un laser à Argon émettant une source lumineuse monochromatique à 488 nm d'une puissance maximale de 100 mW (ILT air cooled, Becton Dickinson). Les signaux d'émission ont été collectés à l'aide de filtres appropriés, pour la fluorescéine à 530 nm (bande passante de 30 nm), pour la phycoérythrine, à 575 nm (bande passante de 26 nm) et de l'iodure de propidium à 630 nm avec une bande passante de 22 nm. 5000 évènements ont été analysés.

---

#### 2.1.5. ETABLISSEMENT D'UNE DOUBLE LIGNÉE STABLE À PARTIR DES CELLULES MATLYLU

Pour l'établissement de la double lignée inductible la trousse « Tet Gene Expression System » de chez Clontech a été utilisée.

## Principe

Chez E coli, la protéine TetR régule négativement les gènes de l'opéron de la résistance à la tetracycline (*tetracyclin repressor*). En absence de l'antibiotique cette protéine bloque la transcription des gènes par fixation à l'opérateur teto. C'est d'après cette protéine régulatrice et de l'opérateur teto que les systèmes Tet-Off et Tet-On ont été développés. Le système est basé sur deux composantes :

La première est la protéine régulatrice. Dans le système Tet-off, cette protéine est la fusion de 1-207 aa de TetR et de 127 aa de la partie C terminale du domaine d'activation AD du virus de l'Herpes VP16, et ce dernier transforme la protéine d'un répresseur en un activateur transcriptionnel. La protéine hybride est désignée tTA. Le gène codant pour cette dernière est localisé sur le plasmide pTet-off qui contient aussi la séquence codante pour la résistance à la néomycine qui permettra la sélection des transformants stables.

Le système Tet-on est similaire au système Tet-off sauf que la protéine régulatrice est la protéine inverse de TetR, appelée rTetR. Cette protéine a été modifiée par la substitution de 4 acides aminés au sein de sa séquence par Gossen et al. en 1995, (Gossen et al., 1995; Hillen and Berens, 1994). La séquence codante pour cette protéine rTA est située sur le plasmide d'expression pTet-on. Ce dernier contient aussi le gène codant pour la résistance à la néomycine.

La deuxième composante du système est le plasmide réponse pTRE (ou ses variantes) qui contient la séquence codante pour la protéine d'intérêt sous le contrôle du facteur cis ; la *tetracycline-response element* situé en amont du promoteur court du Cytomégalovirus.

L'étape ultime du système est de produire une lignée double stable qui contient les deux vecteurs (le plasmide régulateur et le plasmide réponse). Dans le système Tet-on la protéine en présence de la doxycycline, la protéine fusion rTetR-VP16 ou rTA peut par sa portion rTetR se lier au TRE, rapprochant ainsi le domaine activateur de VP16 du promoteur court de CMV situé en aval de la séquence TRE et induire la transcription du gène d'intérêt. Dans le système Tet-off la protéine tTA peut se fixer à la séquence TRE en absence de tetracycline et par la suite activer la transcription du gène d'intérêt. Ces explications sont illustrées par le schéma suivant.





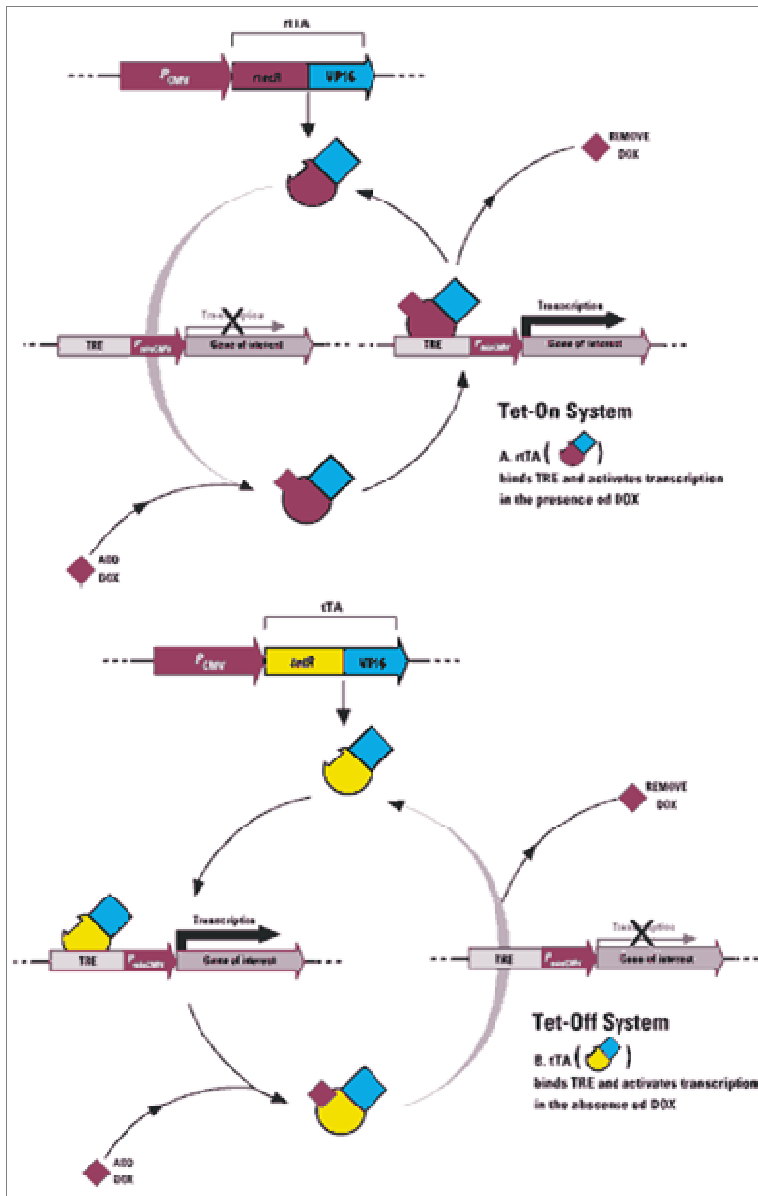
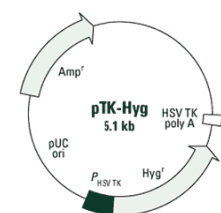
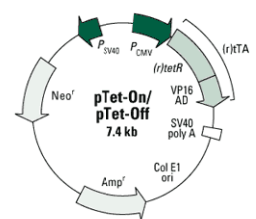


Figure V.1. Schéma représentant les systèmes Tet-On et Tet-Off.

Comme signalé sur le schéma précédent, le premier plasmide pTet-on possède aussi un gène de résistance à la G418 permettant la sélection des cellules ayant incorporé ce vecteur. Par contre, les vecteurs d'expression pTRE ne possèdent aucun gène de résistance à un antibiotique de sélection eucaryote. Ce plasmide doit alors être cotransfecté avec un autre plasmide contenant le gène de résistance à l'hygromycine le pTKHyg. Ce système requiert donc l'intégration génomique de deux plasmides d'expression et d'un plasmide de résistance à l'hygromycine B. Pour une insertion optimale de ces vecteurs, il est conseillé de réaliser deux transfections séparées chaque fois par une sélection sur antibiotiques plutôt que de tenter une triple transfection.



*a) Titration des concentrations en G418 (geneticine; Life Technologies) et hygromycine (Life Technologies) afin de déterminer la concentration optimale à utiliser pour les sélections*

Les MAT Lylu sont placées à raison de  $2 \cdot 10^5$  cellules par boîte de culture de  $75 \text{ cm}^2$  avec 10 ml de milieu complet contenant des concentrations croissantes en G418 (0, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$ ). Le milieu est remplacé tous les 4 jours et le taux de mortalité est estimé par observation au microscope. La plus faible concentration donnant une mort cellulaire massive dans un délai de 5 jours et une mortalité totale après 2 semaines sera utilisée pour sélectionner des transformants stables. La toxicité de l'antibiotique de sélection a été également testée en fonction de la confluence cellulaire. Le même procédé est utilisé pour déterminer la concentration en hygromycine B nécessaire pour sélectionner les doubles transformants stables établis à partir de la lignée MAT Lylu pTet-on.

*b) Développement de la lignée stable pTet-on*

La transfection a été effectuée avec le plasmide pTet-on selon le principe déjà décrit au paragraphe 1.1.5. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont cultivées sur milieu sélectif (milieu complet + 200  $\mu\text{g/ml}$  G418) pendant trois semaines. Les clones résistants ont été isolés par le cytomètre de flux et placés un à un dans les puits (plaques de 96 puits), toujours sur milieu sélectif jusqu'à obtention d'un nombre suffisant de cellules.

*c) Screening des clones stables*

Par transfusions transitoires à l'aide de pBiEGFP et par screening au microscope à fluorescence, nous avons sélectionné les clones stables présentant un niveau basal de fluorescence faible. Afin de quantifier le niveau d'inductibilité de ces clones, nous avons réalisé des transfusions transitoires à l'aide de pTRE-Luc.

*d) Développement des doubles lignées stables pTet-on pTRE*

Les cellules sélectionnées au point c ont été transfectées avec les différentes constructions plamidiques réalisées dans pTRE et dans pBI-EGFP dans des puits de 3 cm de diamètre: 1,1  $\mu\text{g}$  de vecteur pTRE et 0,1  $\mu\text{g}$  du vecteur de sélection pTK-HYG ont été utilisés en suivant le protocole habituel de lipofection déjà décrit (la faible quantité de pTK-HYG employée augmente les chances que les clones positifs pour le gène de résistance à l'hygromycine B aient également incorporé l'autre plasmide). Après 24 heures d'incubation, les cellules sont cultivées sur milieu sélectif (milieu complet + 400  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycine B) pendant trois semaines.



Les clones pTet-on pTRE résistants ont été isolés par le cytomètre de flux et placés un à un dans les puits (plaques de 96 puits) et cultivés sur milieu sélectif pendant 3 semaines.

#### *e) Criblage des clones pTet-on pTRE stables*

Les lignées pTet-on pTRE seront choisies en fonction du niveau d'induction de l'expression des gènes d'intérêt qui sera estimée par la méthode du « *Western Blotting* ».

## 3. LA PROTÉOMIQUE

### 3.1. PRINCIPE

La protéomique permet de définir à la fois l'identité, la quantité, la structure ainsi que la fonction des différentes protéines dans un contexte cellulaire donné (Phizicky et al., 2003).

Elle est basée sur une étape de séparations des protéines et une autre d'identification. La technique séparative la plus couramment utilisée à l'époque du travail est le 2D-PAGE (*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*). Couplée à cette dernière, la spectrométrie de masse et l'identification des protéines grâce à la comparaison des séquences obtenues avec celles présentes dans des bases de données informatiques (Lau et al., 2003).

### 3.2. SÉPARATION DES PROTÉINES PAR 2D-PAGE

La technique 2D-PAGE permet de séparer les protéines en fonction de deux de leurs propriétés : le point isoélectrique (pI) et la masse. La séparation selon le pI constitue la première dimension de migration.

En pratique, la première dimension se réalise sur un gel dans lequel un gradient de pH a été réalisé et fixé sur une bandelette de plastique. Dans un champ électrique, les protéines migrent vers les bornes jusqu'à atteindre la zone du gradient où le pH est égal à leur pI. Là, n'étant plus chargées, elles s'arrêtent ; c'est ce qu'on appelle la focalisation isoélectrique ou IEF (*Isoelectric focusing*).

Une fois la séparation en fonction du point isoélectrique réalisée, on sépare les protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente ce qui constitue la seconde dimension. Celle-ci est réalisée sur un gel de polyacrylamide (de concentration variable) en présence de sodium dodécylsulfate (SDS). A la suite de cette seconde dimension, les gels sont colorés afin de permettre la visualisation des protéines.

### 3.3. HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

Après excision et digestion des spots d'intérêt, les peptides résultants sont séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance ou HPLC afin de les analyser ensuite un à un, par spectrométrie de masse. La colonne analytique dans ce cas est de type phase inverse C18 (« *reverse phase* » ou *RPLC*). Celle-ci est constituée de billes de silice sur lesquelles sont fixées des chaînes hydrophobes de 18 carbones. L'échantillon est appliqué en solution aqueuse, ce qui permet aux peptides de se fixer sur la colonne. Ils sont ensuite élués grâce à un gradient de polarité décroissante (généralement réalisé par un gradient de solvant organique comme le méthanol ou l'acétonitrile) ce qui permet de séparer les peptides selon leur hydrophobicité (les plus hydrophobes sortiront en dernier lieu), c'est la 1D-HPLC.

Dans le cas de mélanges plus complexes on peut réaliser une seconde dimension chromatographique qui est en général réalisée sur une colonne cationique, c'est-à-dire qui échange des cations (dans ce cas, cette colonne constitue la première dimension), c'est la technique de 2D-HPLC (Davis et al., 2001).

### 3.4. DÉTECTION DES PEPTIDES

La détection se fait par spectrométrie de masse, celle-ci étant directement couplée à l'étape précédente (HPLC). Un spectromètre de masse est constitué de trois parties principales :

- a. la source : elle produit les ions en phase gazeuse.
- b. l'analyseur de masse qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ )
- c. le détecteur qui produit le signal final ; c'est-à-dire le rapport  $m/z$  auquel se trouve un pic, ainsi que son intensité.

Dans le cadre de notre étude le spectromètre utilisé est celui à Ion Trap muni d'une source nano ESI: *l'Esquire HCT* (Bruker Daltonics).

#### 3.4.1. SOURCE ÉLECTROSPRAY OU ESI (ELECTROSPRAY IONISATION)

L'échantillon est introduit sous forme liquide dans ce type de source (soit directement, soit en aval d'une HPLC). Il passe par un capillaire terminé par une fine aiguille. Entre cette dernière et une contre-électrode, est appliquée une différence de potentiel dont va résulter un champ électrique qui va donc s'exercer sur le liquide sortant de l'aiguille. Cela va induire une accumulation de charges à la surface du liquide qui va, suite aux répulsions coulombiennes, se rompre et produire de nombreuses petites gouttelettes (De Hoffmann 1999). Celles-ci, suite à l'évaporation du solvant (facilitée par l'injection simultanée d'un gaz chaud et asséchant, en



général l'azote), vont exploser à cause du même phénomène que précédemment. Les gouttelettes vont ainsi se rétrécir jusqu'à atteindre une densité de charge de  $10^8 \text{ V/cm}^3$  (BurkerDaltonics 2002). A ce moment, on assiste à une désorption des ions qui se retrouvent donc en phase gazeuse (Figure V.2). Ces ions sont multichargés (une, deux ou trois charges en général pour un peptide mais une dizaine au moins pour une protéine).

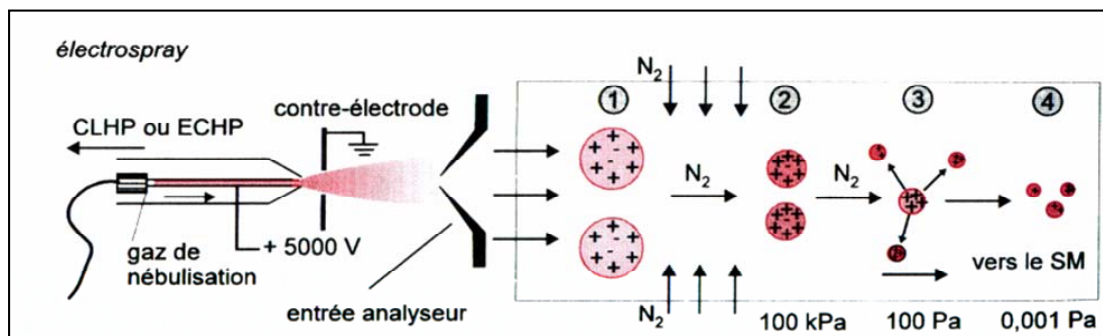
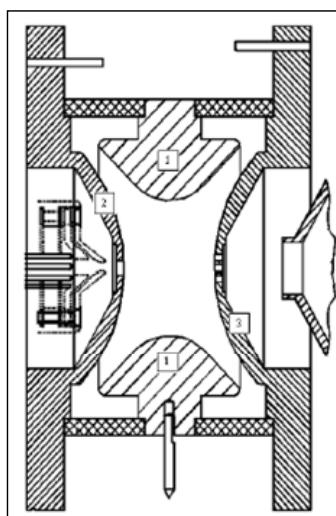


Figure V.2. Illustration de la production des ions dans une source électrospray.

### 3.4.2. ANALYSEUR À TRAPPE À IONS OU ION TRAP

Avant d'entrer dans l'analyseur, les ions sont focalisés grâce à une lentille et deux octopôles. Ceux-ci sont constitués de huit tiges métalliques dans lesquelles sont appliqués des tensions alternatives et continues qui produisent un champ tel que les ions compris dans une certaine gamme de  $m/z$  sont sélectionnés.

La trappe est constituée d'une électrode circulaire en forme de diabololo et de deux « électrodes chapeau » (Figure V.3) (De Hoffman 1999). Les ions sont maintenus captifs sur des trajectoires en forme de huit à trois dimensions par l'application, sur les électrodes, d'une superposition de tensions alternatives et continues. La détection est réalisée en expulsant les ions de masse



choisie en augmentant linéairement le voltage appliqué à l'électrode circulaire. Pour obtenir un spectre, une séquence de plusieurs étapes est réalisée. Dans un premier temps, la trappe se remplit d'ions provenant de la source. Après un certain temps d'accumulation, l'entrée des ions dans la trappe est interrompue. Ceux se trouvant à l'intérieur sont « refroidis » par collision avec des atomes d'hélium afin de n'avoir qu'un petit nuage d'ions au centre de la trappe. Les ions de différentes  $m/z$  vont ensuite être successivement expulsés de la trappe ce qui va permettre d'obtenir un spectre (= scan). Enfin, lorsque le scan est terminé, la trappe est vidée et le cycle peut recommencer (Burker Daltonics, 2002).

Figure V.3. Trappe à ions ; 1.électrode circulaire, 2.et 3.entrée et sortie de la trappe.

### 3.4.3. DÉTECTEUR

Celui-ci est constitué d'une dynode de conversion qui transforme un signal constitué d'ions en un signal constitué d'électrons après amplification.

### 3.4.4. SÉQUENÇAGE DES PEPTIDES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM OU MS/MS

Le principe de cette technique est simple : un ion d'intérêt ou ion parent est isolé puis fragmenté ; les fragments obtenus sont alors analysés. Comme on l'a vu au point précédent, il est possible de faire sortir sélectivement de la trappe un ion d'un rapport  $m/z$  donné. Ici, on va donc éjecter tous les ions sauf celui d'intérêt. Ensuite, l'énergie cinétique de l'ion est augmentée en appliquant un voltage aux électrodes « chapeaux » afin de faire entrer celui-ci en résonance. Les collisions de cet ion « excité » avec l'hélium se trouvant dans la trappe vont induire la fragmentation de celui-ci et donc la formation d'ions produits. En ce qui concerne les peptides, ce sont principalement les liaisons peptidiques qui sont rompues. Par conséquent, la comparaison du spectre MS/MS d'un peptide parent avec un profil théorique de fragmentation permettra d'accéder à la séquence de ce peptide (De Hoffman 1999).

L'ensemble de l'*Ion Trap Esquire HCT* est représenté sur la figure suivante (figure V.4).

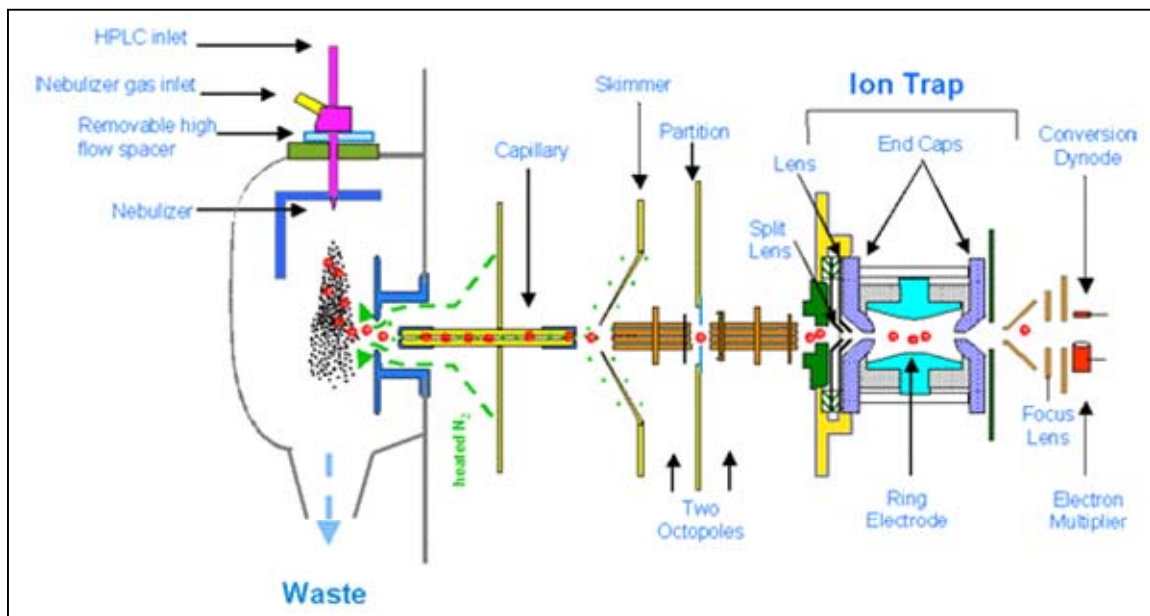


Figure V.4. Schéma général de l'Esquire HCT.



### 3.4.5. IDENTIFICATION DANS UNE BASE DE DONNÉES

Le moteur de recherche utilisé est Mascot. Le principe de fonctionnement de celui-ci est assez simple : les masses des peptides (obtenus après digestion, par la trypsine, des protéines extraites du gel) obtenues expérimentalement par MS/MS sont comparées avec les masses calculées des différents peptides des protéines (par digestion théorique par la trypsine) contenues dans la base de données. En utilisant un algorithme approprié, on peut déterminer avec une certaine probabilité, l'identité de la protéine d'intérêt. Cet algorithme dérive de celui de Mowse en intégrant à ce dernier la notion de probabilité. Ainsi, il est possible d'exclure, à condition de connaître la taille de la base de données, les identifications qui pourraient se réaliser « par chance ». Pratiquement, un score est significatif si la probabilité qu'il se réalise « par chance » est inférieure à 5 %. Par conséquent, la meilleure identification est celle qui a le plus haut score des scores significatifs. Néanmoins, si aucun score n'est significatif, il n'est pas certain que l'identification ayant le score le plus élevé soit fautive ; simplement, les données expérimentales ne sont pas suffisamment précises pour assurer que l'identification n'est pas due au hasard (Matrixscience 2003). Cette partie expérimentale a été réalisée par le Docteur Nicolas Smargiasso au laboratoire de spectrométrie de masse du professeur DePaw à l'Université de Liège. La procédure expérimentale appliquée à notre modèle de lignée inductible est bien détaillée dans l'article 2.

## VI. Bibliographie

### A

- Agarwal, N., Jomary, C., Jones, S.E., O'Rourke, K., Chaitin, M., Wordinger, R.J., and Murphy, B.F.** (1996). Immunocytochemical colocalization of clusterin in apoptotic photoreceptor cells in retinal degeneration slow rds mutant mouse retinas. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 84-91.
- Ahuja, H.S., Tenniswood, M., Lockshin, R., and Zakeri, Z.F.** (1994). Expression of clusterin in cell differentiation and cell death. *Biochem Cell Biol* 72, 523-530.
- Akesson, P., Sjöholm, A.G., and Björck, L.** (1996). Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J Biol Chem* 271, 1081-1088.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J.** (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Altomare, D.A., and Testa, J.R.** (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455-7464.
- Alvarado-Kristensson, M., and Andersson, T.** (2005). Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. *J Biol Chem* 280, 6238-6244.
- Amarante-Mendes, G.P., and Green, D.R.** (1999). The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* 32, 1053-1061.
- Ammar, H., and Closset, J.L.** (2008). Clusterin activates survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 283, 12851-12861.
- Andersen, C.L., Schepeler, T., Thorsen, K., Birkenkamp-Demtroder, K., Mansilla, F., Aaltonen, L.A., Laurberg, S., and Orntoft, T.F.** (2007). Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics* 6, 1039-1048.
- Arnold, J.T., and Isaacs, J.T.** (2002). Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr Relat Cancer* 9, 61-73.
- Aronow, B.J., Lund, S.D., Brown, T.L., Harmony, J.A., and Witte, D.P.** (1993). Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 725-729.
- Astancolle, S., Guidetti, G., Pinna, C., Corti, A., and Bettuzzi, S.** (2000). Increased levels of clusterin (SGP-2) mRNA and protein accompany rat ventral prostate involution following finasteride treatment. *J Endocrinol* 167, 197-204.
- Aumüller, G.** (1989). Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat Embryol (Berl)* 179, 519-531.
- Ayala, G., Thompson, T., Yang, G., Frolov, A., Li, R., Scardino, P., Otori, M., Wheeler, T., and Harper, W.** (2004). High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clin Cancer Res* 10, 6572-6578.
- Ayala, G., Tuxhorn, J.A., Wheeler, T.M., Frolov, A., Scardino, P.T., Otori, M., Wheeler, M., Spittler, J., and Rowley, D.R.** (2003). Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 4792-4801.

### B

- Bach, U.C., Baiersdorfer, M., Klock, G., Cattaruzza, M., Post, A., and Koch-Brandt, C.** (2001). Apoptotic cell debris and phosphatidylserine-containing lipid vesicles induce apolipoprotein J (clusterin) gene expression in vital fibroblasts. *Exp Cell Res* 265, 11-20.
- Bachmann, M., Hennemann, H., Xing, P.X., Hoffmann, I., and Moroy, T.** (2004). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J Biol Chem* 279, 48319-48328.
- Bailey, R.W., Aronow, B., Harmony, J.A., and Griswold, M.D.** (2002). Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. *Biol Reprod* 66, 1042-1053.
- Bailey, R.W., Dunker, A.K., Brown, C.J., Garner, E.C., and Griswold, M.D.** (2001). Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry* 40, 11828-11840.





**Bajari, T.M., Strasser, V., Nimpf, J., and Schneider, W.J.** (2003). A model for modulation of leptin activity by association with clusterin. *FASEB J* 17, 1505-1507.

**Banerjee, P.P., Banerjee, S., and Brown, T.R.** (2002). Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobes. *Endocrinology* 143, 1825-1832.

**Banerjee, P.P., Banerjee, S., Tilly, K.I., Tilly, J.L., Brown, T.R., and Zirkin, B.R.** (1995). Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology* 136, 4368-4376.

**Barti, M.M., Luckenbach, T., Bergner, O., Ullrich, O., and Koch-Brandt, C.** (2001). Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. *Exp Cell Res* 271, 130-141.

**Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., and Green, D.R.** (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2, 469-475.

**Beg, A.A., and Baltimore, D.** (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.

**Bello-DeOcampo, D., and Tindall, D.J.** (2003). TGF-beta1/Smad signaling in prostate cancer. *Curr Drug Targets* 4, 197-207.

**Bemelmans, M.H., van Tits, L.J., and Buurman, W.A.** (1996). Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 16, 1-11.

**Bentel, J.M., and Tilley, W.D.** (1996). Androgen receptors in prostate cancer. *J Endocrinol* 151, 1-11.

**Berges, R.R., Vukanovic, J., Epstein, J.I., CarMichel, M., Cisek, L., Johnson, D.E., Veltri, R.W., Walsh, P.C., and Isaacs, J.T.** (1995). Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1, 473-480.

**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.

**Bettuzzi, S.** (2009). Chapter 1: Introduction. *Adv Cancer Res* 104, 1-8.

**Bettuzzi, S., Davalli, P., Davoli, S., Chayka, O., Rizzi, F., Belloni, L., Pellacani, D., Fregni, G., Astancolle, S., Fassin, M., et al.** (2009). Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumorigenesis and metastatic spread. *Oncogene* 28, 4344-4352.

**Bettuzzi, S., Hiipakka, R.A., Gilna, P., and Liao, S.T.** (1989). Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis. *Biochem J* 257, 293-296.

**Bettuzzi, S., and Rizzi, F.** (2009). Chapter 5: Nuclear CLU (nCLU) and the fate of the cell. *Adv Cancer Res* 104, 59-88.

**Bettuzzi, S., Scorcioni, F., Astancolle, S., Davalli, P., Scaltriti, M., and Corti, A.** (2002). Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene* 21, 4328-4334.

**Bettuzzi, S., Troiano, L., Davalli, P., Tropea, F., Ingletti, M.C., Grassilli, E., Monti, D., Corti, A., and Franceschi, C.** (1991). In vivo accumulation of sulfated glycoprotein 2 mRNA in rat thymocytes upon dexamethasone-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 175, 810-815.

**Bhutia, S.K., Das, S.K., Azab, B., Dash, R., Su, Z.Z., Lee, S.G., Dent, P., Curiel, D.T., Sarkar, D., and Fisher, P.B.** (2011). Autophagy switches to apoptosis in prostate cancer cells infected with melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24). *Autophagy* 7, 1076-1077.

**Bhutia, S.K., Das, S.K., Kegelman, T.P., Azab, B., Dash, R., Su, Z.Z., Wang, X.Y., Rizzi, F., Bettuzzi, S., Lee, S.G., et al.** (2012). mda-7/IL-24 differentially regulates soluble and nuclear clusterin in prostate cancer. *J Cell Physiol* 227, 1805-1813.

**Bhutia, S.K., Dash, R., Das, S.K., Azab, B., Su, Z.Z., Lee, S.G., Grant, S., Yacoub, A., Dent, P., Curiel, D.T., et al.** (2010). Mechanism of autophagy to apoptosis switch triggered in prostate cancer cells by antitumor cytokine melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin-24. *Cancer Res* 70, 3667-3676.

**Bi, J., Guo, A.L., Lai, Y.R., Li, B., Zhong, J.M., Wu, H.Q., Xie, Z., He, Y.L., Lv, Z.L., Lau, S.H., et al.** (2010). Overexpression of clusterin correlates with tumor progression, metastasis in gastric cancer: a study on tissue microarrays. *Neoplasia* 57, 191-197.

**Bicknell, G.R., and Cohen, G.M.** (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 40-47.

**Birkenmeier, E.H., Letts, V.A., Frankel, W.N., Magenheimer, B.S., and Calvet, J.P.** (1993). Sulfated glycoprotein-2 (Sgp-2) maps to mouse chromosome 14. *Mamm Genome* 4, 131-132.

**Blaschuk, O., Burdzy, K., and Fritz, I.B.** (1983). Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 258, 7714-7720.

- Blaschuk, O.W., and Fritz, I.B.** (1984). Isoelectric forms of clusterin isolated from ram rete testis fluid and from secretions of primary cultures of ram and rat Sertoli-cell-enriched preparations. *Can J Biochem Cell Biol* 62, 456-461.
- Boggs, L.N., Fuson, K.S., Baez, M., Churgay, L., McClure, D., Becker, G., and May, P.C.** (1996). Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. *J Neurochem* 67, 1324-1327.
- Bonkhoff, H.** (1996). Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: a stem cell concept for the development of prostate cancer. *Eur Urol* 30, 201-205.
- Bonkhoff, H., and Remberger, K.** (1996). Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 28, 98-106.
- Boulay, P.L., Cotton, M., Melancon, P., and Claing, A.** (2008). ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 36425-36434.
- Bowen, C., Voeller, H.J., Kikly, K., and Gelmann, E.P.** (1999). Synthesis of procaspases-3 and -7 during apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 6, 394-401.
- Brady, S.C., Allan, L.A., and Clarke, P.R.** (2005). Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Mol Cell Biol* 25, 10543-10555.
- Brazil, D.P., and Hemmings, B.A.** (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26, 657-664.
- Brodin, G., ten Dijke, P., Funa, K., Heldin, C.H., and Landstrom, M.** (1999). Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* 59, 2731-2738.
- 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.
- Budd, R.C., Yeh, W.C., and Tschopp, J.** (2006). cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* 6, 196-204.
- Bruker Daltonics** (2002). Esquire series - User Manual Volume 1 Theory - version 5.1.
- Burkey, B.F., Stuart, W.D., and Harmony, J.A.** (1992). Hepatic apolipoprotein J is secreted as a lipoprotein. *J Lipid Res* 33, 1517-1526.
- Bursch, W., Gleeson, T., Kleine, L., and Tenniswood, M.** (1995). Expression of clusterin (testosterone-repressed prostate message-2) mRNA during growth and regeneration of rat liver. *Arch Toxicol* 69, 253-258.
- Buttyan, R., Olsson, C.A., Pintar, J., Chang, C., Bandyk, M., Ng, P.Y., and Sawczuk, I.S.** (1989). Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol* 9, 3473-3481.
- Buttyan, R., Shabsigh, A., Perlman, H., and Colombel, M.** (1999). Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids. *Trends Endocrinol Metab* 10, 47-54.
- Buttyan, R., Zakeri, Z., Lockshin, R., and Wolgemuth, D.** (1988). Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol Endocrinol* 2, 650-657.

## C

- Caccamo, A.E., Desenzani, S., Belloni, L., Borghetti, A.F., and Bettuzzi, S.** (2006). Nuclear clusterin accumulation during heat shock response: implications for cell survival and thermo-tolerance induction in immortalized and prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 207, 208-219.
- Caccamo, A.E., Scaltriti, M., Caporali, A., D'Arca, D., Corti, A., Corvetta, D., Sala, A., and Bettuzzi, S.** (2005). Ca<sup>2+</sup> depletion induces nuclear clusterin, a novel effector of apoptosis in immortalized human prostate cells. *Cell Death Differ* 12, 101-104.
- Caccamo, A.E., Scaltriti, M., Caporali, A., D'Arca, D., Scorcioni, F., Astancolle, S., Mangiola, M., and Bettuzzi, S.** (2004). Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin. *Biochem J* 382, 157-168.
- Caccamo, A.E., Scaltriti, M., Caporali, A., D'Arca, D., Scorcioni, F., Candiano, G., Mangiola, M., and Bettuzzi, S.** (2003). Nuclear translocation of a clusterin isoform is associated with induction of anoikis in SV40-immortalized human prostate epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 514-519.
- Cai, C., Hsieh, C.L., Omwancha, J., Zheng, Z., Chen, S.Y., Baert, J.L., and Shemshedini, L.** (2007). ETV1 is a novel androgen receptor-regulated gene that mediates prostate cancer cell invasion. *Mol Endocrinol* 21, 1835-1846.
- Cain, K., Bratton, S.B., and Cohen, G.M.** (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-214.



- Camparo, P., and Vieillefond, A.** (2007). [Molecular aspects of prostate cancer: recent data from the literature]. *Bull Cancer* 94, F77-88.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G.** (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84, 215-222.
- Cantley, L.C.** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Cantley, L.C., and Neel, B.G.** (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245.
- Cappello, F., Palma, A., Martorana, A., Rappa, F., Cabibi, D., Barresi, E., Melloni, D., Farina, F., and Aragona, F.** (2003). Biological aggressiveness evaluation in prostate carcinomas: immunohistochemical analysis of PCNA and p53 in a series of Gleason 6 (3+3) adenocarcinomas. *Eur J Histochem* 47, 129-132.
- Carroll, M.C.** (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5, 981-986.
- Carver, J.A., Rekas, A., Thorn, D.C., and Wilson, M.R.** (2003). Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB Life* 55, 661-668.
- Cervellera, M., Raschella, G., Santilli, G., Tanno, B., Ventura, A., Mancini, C., Sevigani, C., Calabretta, B., and Sala, A.** (2000). Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J Biol Chem* 275, 21055-21060.
- Chang, H.Y., and Yang, X.** (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 821-846.
- Chang, S.W., Su, C.H., Chen, H.H., Huang, C.W., Tsao, L.P., Tsao, Y.P., and Chen, S.L.** (2012). DDB2 is a novel AR interacting protein and mediates AR ubiquitination/degradation. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1952-1961.
- Chen, C.D., Welsbie, D.S., Tran, C., Baek, S.H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M.G., and Sawyers, C.L.** (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10, 33-39.
- Chen, S., Bu, G., Takei, Y., Sakamoto, K., Ikematsu, S., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K.** (2007). Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *J Cell Sci* 120, 4009-4015.
- Cheng, C.Y., Chen, C.L., Feng, Z.M., Marshall, A., and Bardin, C.W.** (1988). Rat clusterin isolated from primary Sertoli cell-enriched culture medium is sulfated glycoprotein-2 (SGP-2). *Biochem Biophys Res Commun* 155, 398-404.
- Cheng, J., Watkins, S.C., and Walker, W.H.** (2007). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *Endocrinology* 148, 2066-2074.
- Chi, K.N., Eisenhauer, E., Fazli, L., Jones, E.C., Goldenberg, S.L., Powers, J., Tu, D., and Gleave, M.E.** (2005). A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 97, 1287-1296.
- Chi, K.N., Zoubeidi, A., and Gleave, M.E.** (2008). Custirsen (OGX-011): a second-generation antisense inhibitor of clusterin for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 17, 1955-1962.
- Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., and Green, D.R.** (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20327-20332.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R.** (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157-164.
- Choi-Miura, N.H., Takahashi, Y., Nakano, Y., Tobe, T., and Tomita, M.** (1992). Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). *J Biochem* 112, 557-561.
- Choi, N.H., Mazda, T., and Tomita, M.** (1989). A serum protein SP40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes. *Mol Immunol* 26, 835-840.
- Chopra, D.P., Menard, R.E., Januszewski, J., and Mattingly, R.R.** (2004). TNF-alpha-mediated apoptosis in normal human prostate epithelial cells and tumor cell lines. *Cancer Lett* 203, 145-154.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H., and Ballard, D.W.** (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10057-10062.
- Chung, L.W., Gleave, M.E., Hsieh, J.T., Hong, S.J., and Zhau, H.E.** (1991). Reciprocal mesenchymal-epithelial interaction affecting prostate tumour growth and hormonal responsiveness. *Cancer Surv* 11, 91-121.
- Clark, J.P., and Cooper, C.S.** (2009). ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 6, 429-439.
- Closset, J., Ammar, H., Nguyen, V.H., Cornet, A., and Reiter, E.** (2004). New features in the treatment of androgen-independent prostate cancer. *Curr Pharm Des* 10, 513-522.

- Cochrane, D.R., Wang, Z., Muramaki, M., Gleave, M.E., and Nelson, C.C.** (2007). Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells. *J Biol Chem* 282, 2278-2287.
- Collard, M.W., and Griswold, M.D.** (1987). Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry* 26, 3297-3303.
- Collins, A.T., and Maitland, N.J.** (2006). Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer* 42, 1213-1218.
- Colombel, M., Olsson, C.A., Ng, P.Y., and Buttyan, R.** (1992). Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res* 52, 4313-4319.
- Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K.M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C.A., Korsmeyer, S., and Buttyan, R.** (1993). Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 143, 390-400.
- Cornforth, A.N., Davis, J.S., Khanifar, E., Nastiuk, K.L., and Krolewski, J.J.** (2008). FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* 27, 4422-4433.
- Cory, S., and Adams, J.M.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Craft, N., Chhor, C., Tran, C., Belldegrun, A., DeKernion, J., Witte, O.N., Said, J., Reiter, R.E., and Sawyers, C.L.** (1999a). Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. *Cancer Res* 59, 5030-5036.
- Craft, N., Shostak, Y., Carey, M., and Sawyers, C.L.** (1999b). A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 5, 280-285.
- Criswell, T., Beman, M., Araki, S., Leskov, K., Cataldo, E., Mayo, L.D., and Boothman, D.A.** (2005). Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor. *J Biol Chem* 280, 14212-14221.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A.** (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Cato, A.C., Hittmair, A., Radmayr, C., Eberle, J., Bartsch, G., and Klocker, H.** (1993). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* 7, 1541-1550.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G., and Klocker, H.** (1994). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 54, 5474-5478.
- Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Cooke, P.S., Mee, S., Bigsby, R.M., Higgins, S.J., and Sugimura, Y.** (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8, 338-362.

## D

- D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P.** (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 347-358.
- Danik, M., Chabot, J.G., Mercier, C., Benabid, A.L., Chauvin, C., Quirion, R., and Suh, M.** (1991). Human gliomas and epileptic foci express high levels of a mRNA related to rat testicular sulfated glycoprotein 2, a purported marker of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8577-8581.
- Das, R., Mahabeleshwar, G.H., and Kundu, G.C.** (2003). Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* 278, 28593-28606.
- Dash, R., Dmitriev, I., Su, Z.Z., Bhutia, S.K., Azab, B., Vozhilla, N., Yacoub, A., Dent, P., Curiel, D.T., Sarkar, D., et al.** (2010). Enhanced delivery of mda-7/IL-24 using a serotype chimeric adenovirus (Ad.5/3) improves therapeutic efficacy in low CAR prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther* 17, 447-456.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E.** (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6, 41-51.
- Davis, J.S., Nastiuk, K.L., and Krolewski, J.J.** (2011). TNF is necessary for castration-induced prostate regression, whereas TRAIL and FasL are dispensable. *Mol Endocrinol* 25, 611-620.
- Davis, M.T., Beierle, J., Bures, E.T., McGinley, M.D., Mort, J., Robinson, J.H., Spahr, C.S., Yu, W., Luethy, R., and Patterson, S.D.** (2001). Automated LC-LC-MS-MS platform using binary ion-exchange and gradient reversed-phase chromatography for improved proteomic analyses. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 752, 281-291.



- DeHoffmann, C.-S.** ed. (1999). Spectrométrie de masse, Cours et exercices corrigés DUNOD, 2ème édition edn.
- de la Taille, A., Chen, M.W., Shabsigh, A., Bagiella, E., Kiss, A., and Buttyan, R.** (1999). Fas antigen/CD-95 upregulation and activation during castration-induced regression of the rat ventral prostate gland. *Prostate* *40*, 89-96.
- De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G.** (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* *7*, 256-269.
- de Silva, H.V., Harmony, J.A., Stuart, W.D., Gil, C.M., and Robbins, J.** (1990). Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* *29*, 5380-5389.
- Dehm, S.M., Schmidt, L.J., Heemers, H.V., Vessella, R.L., and Tindall, D.J.** (2008). Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* *68*, 5469-5477.
- Dehm, S.M., and Tindall, D.J.** (2005). Regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* *5*, 63-74.
- Delos, S., Carsol, J.L., Ghazarossian, E., Raynaud, J.P., and Martin, P.M.** (1995). Testosterone metabolism in primary cultures of human prostate epithelial cells and fibroblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* *55*, 375-383.
- Denmeade, S.R., and Isaacs, J.T.** (2002). A history of prostate cancer treatment. *Nat Rev Cancer* *2*, 389-396.
- Desai, K.V., and Kondaiah, P.** (2000). Androgen ablation results in differential regulation of transforming growth factor-beta isoforms in rat male accessory sex organs and epididymis. *J Mol Endocrinol* *24*, 253-260.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., and Liu, Z.** (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* *12*, 419-429.
- Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M.** (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* *412*, 822-826.
- Diemer, V., Hoyle, M., Baglioni, C., and Millis, A.J.** (1992). Expression of porcine complement cytolysis inhibitor mRNA in cultured aortic smooth muscle cells. Changes during differentiation in vitro. *J Biol Chem* *267*, 5257-5264.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M., and Venkatachalam, M.A.** (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* *151*, 1205-1213.
- Dote, H., Burgan, W.E., Camphausen, K., and Tofilon, P.J.** (2006). Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation. *Cancer Res* *66*, 9211-9220.
- Drake, C.G., Sharma, P., and Gerritsen, W.** (2013). Metastatic castration-resistant prostate cancer: new therapies, novel combination strategies and implications for immunotherapy. *Oncogene*.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* *102*, 33-42.
- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S., and Toussaint, O.** (2002). Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones* *7*, 23-35.

## E, F, G

- Ellem, S.J., and Risbridger, G.P.** (2007). Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. *Nat Rev Cancer* *7*, 621-627.
- Ellem, S.J., Schmitt, J.F., Pedersen, J.S., Frydenberg, M., and Risbridger, G.P.** (2004). Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* *89*, 2434-2441.
- Ellis, R.J., and van der Vies, S.M.** (1991). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* *60*, 321-347.
- Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong le, A., Rawlinson, L., Mason, J.C., Haskard, D.O., Dean, J.L., and Evans, P.C.** (2008). NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J Biol Chem* *283*, 7036-7045.
- English, H.F., Kyprianou, N., and Isaacs, J.T.** (1989). Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* *15*, 233-250.
- English, H.F., Santen, R.J., and Isaacs, J.T.** (1987). Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate* *11*, 229-242.
- Essabani, A., Margottin-Goguet, F., and Chiochia, G.** (2010). Identification of clusterin domain involved in NF-kappaB pathway regulation. *J Biol Chem* *285*, 4273-4277.

- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M.** (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
- Feldman, B.J., and Feldman, D.** (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
- Fischer-Colbrie, R., Zangerle, R., Frischenschlager, I., Weber, A., and Winkler, H.** (1984). Isolation and immunological characterization of a glycoprotein from adrenal chromaffin granules. *J Neurochem* 42, 1008-1016.
- Fishman, J., and Goto, J.** (1981). Mechanism of estrogen biosynthesis. Participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. *J Biol Chem* 256, 4466-4471.
- French, L.E., Chonn, A., Ducrest, D., Baumann, B., Belin, D., Wohlwend, A., Kiss, J.Z., Sappino, A.P., Tschopp, J., and Schifferli, J.A.** (1993). Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis. *J Cell Biol* 122, 1119-1130.
- Fritz, I.B., Burdzy, K., Setchell, B., and Blaschuk, O.** (1983). Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod* 28, 1173-1188.
- Furuya, Y., Krajewski, S., Epstein, J.I., Reed, J.C., and Isaacs, J.T.** (1996). Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. *Clin Cancer Res* 2, 389-398.
- Gabai, V.L., Budagova, K.R., and Sherman, M.Y.** (2005). Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene* 24, 3328-3338.
- Gao, J., Arnold, J.T., and Isaacs, J.T.** (2001). Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. *Cancer Res* 61, 5038-5044.
- Gasparian, A.V., Yao, Y.J., Kowalczyk, D., Lyakh, L.A., Karseladze, A., Slaga, T.J., and Budunova, I.V.** (2002). The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 115, 141-151.
- Gelissen, I.C., Hochgrebe, T., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B., Jessup, W., Dean, R.T., and Brown, A.J.** (1998). Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J* 331 ( Pt 1), 231-237.
- Ghiso, J., Matsubara, E., Koudinov, A., Choi-Miura, N.H., Tomita, M., Wisniewski, T., and Frangione, B.** (1993). The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J* 293 ( Pt 1), 27-30.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., and Adjei, A.A.** (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 55, 178-194.
- Gioeli, D., Black, B.E., Gordon, V., Spencer, A., Kesler, C.T., Eblen, S.T., Paschal, B.M., and Weber, M.J.** (2006). Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol Endocrinol* 20, 503-515.
- 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.
- Gleave, M., and Chi, K.N.** (2005). Knock-down of the cytoprotective gene, clusterin, to enhance hormone and chemosensitivity in prostate and other cancers. *Ann N Y Acad Sci* 1058, 1-15.
- Gleave, M., and Miyake, H.** (2005). Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. *World J Urol* 23, 38-46.
- Gleave, M.E., Miyake, H., Zellweger, T., Chi, K., July, L., Nelson, C., and Rennie, P.** (2001). Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer. *Urology* 58, 39-49.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., and Green, D.R.** (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2, 156-162.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H.** (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Goyal, L.** (2001). Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell* 104, 805-808.
- Green, D.R., and Kroemer, G.** (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Gregory, C.W., Hamil, K.G., Kim, D., Hall, S.H., Pretlow, T.G., Mohler, J.L., and French, F.S.** (1998). Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer is associated with increased expression of androgen-regulated genes. *Cancer Res* 58, 5718-5724.



- Gregory, C.W., Johnson, R.T., Jr., Mohler, J.L., French, F.S., and Wilson, E.M.** (2001). Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res* 61, 2892-2898.
- Gross, A.** (2001). BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life* 52, 231-236.
- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J.** (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
- Guenette, R.S., Mooibroek, M., Wong, K., Wong, P., and Tenniswood, M.** (1994). Cathepsin B, a cysteine protease implicated in metastatic progression, is also expressed during regression of the rat prostate and mammary glands. *Eur J Biochem* 226, 311-321.
- Guo, Y., and Kyprianou, N.** (1999). Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 59, 1366-1371.
- Guo, Z., Yang, X., Sun, F., Jiang, R., Linn, D.E., Chen, H., Kong, X., Melamed, J., Tepper, C.G., Kung, H.J., 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.
- Gutacker, C., Klock, G., Diel, P., and Koch-Brandt, C.** (1999). Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells. *Biochem J* 339 ( Pt 3), 759-766.

## H

- Han, B.H., DeMattos, R.B., Dugan, L.L., Kim-Han, J.S., Brendza, R.P., Fryer, J.D., Kierson, M., Cirrito, J., Quick, K., Harmony, J.A., et al.** (2001). Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nat Med* 7, 338-343.
- Hara, I., Miyake, H., Gleave, M.E., and Kamidono, S.** (2001). Introduction of clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their resistance to cytotoxic chemotherapy through inhibition of apoptosis both in vitro and in vivo. *Jpn J Cancer Res* 92, 1220-1224.
- Harris, W.P., Mostaghel, E.A., Nelson, P.S., and Montgomery, B.** (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol* 6, 76-85.
- Hartmann, K., Rauch, J., Urban, J., Parczyk, K., Diel, P., Pilarsky, C., Appel, D., Haase, W., Mann, K., Weller, A., et al.** (1991). Molecular cloning of gp 80, a glycoprotein complex secreted by kidney cells in vitro and in vivo. A link to the reproductive system and to the complement cascade. *J Biol Chem* 266, 9924-9931.
- Hatzoglou, A., Kampa, M., Kogia, C., Charalampopoulos, I., Theodoropoulos, P.A., Anezinis, P., Dambaki, C., Papakonstanti, E.A., Stathopoulos, E.N., Stournaras, C., et al.** (2005). Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 893-903.
- Hedlund, T.E., Duke, R.C., Schleicher, M.S., and Miller, G.J.** (1998). Fas-mediated apoptosis in seven human prostate cancer cell lines: correlation with tumor stage. *Prostate* 36, 92-101.
- Heikus, S., Winterhager, E., Traub, O., and Grummer, R.** (2002). Responsiveness of endometrial genes Connexin26, Connexin43, C3 and clusterin to primary estrogen, selective estrogen receptor modulators, phyto- and xenoestrogens. *J Mol Endocrinol* 29, 239-249.
- Hengartner, M.O.** (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hillen, W., and Berens, C.** (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48, 345-369.
- Hjalm, G., Murray, E., Crumley, G., Harazim, W., Lundgren, S., Onyango, I., Ek, B., Larsson, M., Juhlin, C., Hellman, P., et al.** (1996). Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur J Biochem* 239, 132-137.
- Holt, S.K., Karyadi, D.M., Kwon, E.M., Stanford, J.L., Nelson, P.S., and Ostrander, E.A.** (2008). Association of megalin genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Clin Cancer Res* 14, 3823-3831.
- Hsing, A.W., Chu, L.W., and Stanczyk, F.Z.** (2008). Androgen and prostate cancer: is the hypothesis dead? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 2525-2530.
- Hsing, A.W., Tsao, L., and Devesa, S.S.** (2000). International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 85, 60-67.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., and Goeddel, D.V.** (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.

- 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.** (2009a). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 69, 16-22.
- Hu, X.F., Li, J., Vandervalk, S., Wang, Z., Magnuson, N.S., and Xing, P.X.** (2009b). PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *J Clin Invest* 119, 362-375.
- Huggins, C., and Hodges, C.V.** (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 168, 9-12.
- Humphrey, P.A.** (2007). Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *J Clin Pathol* 60, 35-42.
- Humphreys, D., Hochgrebe, T.T., Easterbrook-Smith, S.B., Tenniswood, M.P., and Wilson, M.R.** (1997). Effects of clusterin overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-mediated death of L929 cells. *Biochemistry* 36, 15233-15243.
- Humphreys, D.T., Carver, J.A., Easterbrook-Smith, S.B., and Wilson, M.R.** (1999). Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem* 274, 6875-6881.

I, J

- Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L., and De Maria, R.** (2008). Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 66, 42-51.
- Igney, F.H., and Krammer, P.H.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288.
- Ilio, K.Y., Sensibar, J.A., and Lee, C.** (1995). Effect of TGF-beta 1, TGF-alpha, and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture. *J Androl* 16, 482-490.
- Imperato-McGinley, J., Gautier, T., Zirinsky, K., Hom, T., Palomo, O., Stein, E., Vaughan, E.D., Markisz, J.A., Ramirez de Arellano, E., and Kazam, E.** (1992). Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1022-1026.
- Imperato-McGinley, J., and Zhu, Y.S.** (2002). Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 198, 51-59.
- Inoue, J., Gohda, J., Akiyama, T., and Semba, K.** (2007). NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 98, 268-274.
- Isaacs, J.T., and Coffey, D.S.** (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 2, 33-50.
- Isaacs, J.T., Lundmo, P.I., Berges, R., Martikainen, P., Kyprianou, N., and English, H.F.** (1992). Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl* 13, 457-464.
- Ischia, J., Saad, F., and Gleave, M.** (2013). The promise of heat shock protein inhibitors in the treatment of castration resistant prostate cancer. *Curr Opin Urol*.
- Itoh, N., and Nagata, S.** (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.
- Iwata, A., Browne, K.D., Chen, X.H., Yuguchi, T., and Smith, D.H.** (2005). Traumatic brain injury induces biphasic upregulation of ApoE and ApoJ protein in rats. *J Neurosci Res* 82, 103-114.
- Jaattela, M.** (1993). Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 151, 4286-4294.
- James, S.Y., Mackay, A.G., and Colston, K.W.** (1996). Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58, 395-401.
- Jenne, D.E., Lowin, B., Peitsch, M.C., Bottcher, A., Schmitz, G., and Tschopp, J.** (1991). Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *J Biol Chem* 266, 11030-11036.
- Jenne, D.E., and Tschopp, J.** (1989). Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxic inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7123-7127.
- Jesik, C.J., Holland, J.M., and Lee, C.** (1982). An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3, 81-97.
- Jin, G., and Howe, P.H.** (1997). Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 272, 26620-26626.
- Jin, G., and Howe, P.H.** (1999). Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos. *Eur J Biochem* 263, 534-542.





**Jin, R.J., Lho, Y., Connelly, L., Wang, Y., Yu, X., Saint Jean, L., Case, T.C., Ellwood-Yen, K., Sawyers, C.L., Bhowmick, N.A., et al.** (2008). The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth. *Cancer Res* 68, 6762-6769.

**Jomary, C., Chatelain, G., Michel, D., Weston, A., Neal, M.J., and Jones, S.E.** (1999). Effect of targeted expression of clusterin in photoreceptor cells on retinal development and differentiation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 10), 1455-1464.

**Jones, E.L., Zhao, M.J., Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K.** (2004). The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in prostate cancer. *Int J Hyperthermia* 20, 835-849.

**Jones, S.E., and Jomary, C.** (2002). Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 427-431.

**Jost, A., Vigier, B., Prepin, J., and Perchellet, J.P.** (1973). Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 29, 1-41.

**Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al.** (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

**July, L.V., Akbari, M., Zellweger, T., Jones, E.C., Goldenberg, S.L., and Gleave, M.E.** (2002). Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy. *Prostate* 50, 179-188.

**July, L.V., Beraldi, E., So, A., Fazli, L., Evans, K., English, J.C., and Gleave, M.E.** (2004). Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 3, 223-232.

**Jun, H.O., Kim, D.H., Lee, S.W., Lee, H.S., Seo, J.H., Kim, J.H., Yu, Y.S., Min, B.H., and Kim, K.W.** (2011). Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Exp Mol Med* 43, 53-61.

## K

**Kaarbo, M., Klokk, T.I., and Saatcioglu, F.** (2007). Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *Bioessays* 29, 1227-1238.

**Kalka, K., Ahmad, N., Criswell, T., Boothman, D., and Mukhtar, H.** (2000). Up-regulation of clusterin during phthalocyanine 4 photodynamic therapy-mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouse skin tumors. *Cancer Res* 60, 5984-5987.

**Kallergi, G., Agelaki, S., Markomanolaki, H., Georgoulas, V., and Stournaras, C.** (2007). Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 20, 977-986.

**Kampa, M., Papakonstanti, E.A., Hatzoglou, A., Stathopoulos, E.N., Stournaras, C., and Castanas, E.** (2002). The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J* 16, 1429-1431.

**Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., and Weiss, A.** (1999). Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9, 601-604.

**Kang, S.W., Lim, S.W., Choi, S.H., Shin, K.H., Chun, B.G., Park, I.S., and Min, B.H.** (2000). Antisense oligonucleotide of clusterin mRNA induces apoptotic cell death and prevents adhesion of rat ASC-17D Sertoli cells. *Mol Cells* 10, 193-198.

**Kang, S.W., Shin, Y.J., Shim, Y.J., Jeong, S.Y., Park, I.S., and Min, B.H.** (2005). Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells. *Exp Cell Res* 309, 305-315.

**Kapron, J.T., Hilliard, G.M., Lakins, J.N., Tenniswood, M.P., West, K.A., Carr, S.A., and Crabb, J.W.** (1997). Identification and characterization of glycosylation sites in human serum clusterin. *Protein Sci* 6, 2120-2133.

**Karin, M.** (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.

**Katdare, M., Efimova, E.V., Labay, E., Khodarev, N.N., Darga, T.E., Garofalo, M., Nakamura, S., Kufe, D.W., Posner, M.C., and Weichselbaum, R.R.** (2007). Diverse TNFalpha-induced death pathways are enhanced by inhibition of NF-kappaB. *Int J Oncol* 31, 1519-1528.

**Kennedy, S.G., Kandel, E.S., Cross, T.K., and Hay, N.** (1999). Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 19, 5800-5810.

**Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

**Kim, H.J., Yoo, E.K., Kim, J.Y., Choi, Y.K., Lee, H.J., Kim, J.K., Jeoung, N.H., Lee, K.U., Park, I.S., Min, B.H., et al.** (2009). Protective role of clusterin/apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect

on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1558-1564.

**Kim, I.Y., Ahn, H.J., Lang, S., Oefelein, M.G., Oyasu, R., Kozlowski, J.M., and Lee, C.** (1998). Loss of expression of transforming growth factor-beta receptors is associated with poor prognosis in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 4, 1625-1630.

**Kim, I.Y., Ahn, H.J., Zelner, D.J., Park, L., Sensibar, J.A., and Lee, C.** (1996a). Expression and localization of transforming growth factor-beta receptors type I and type II in the rat ventral prostate during regression. *Mol Endocrinol* 10, 107-115.

**Kim, I.Y., Ahn, H.J., Zelner, D.J., Shaw, J.W., Lang, S., Kato, M., Oefelein, M.G., Miyazono, K., Nemeth, J.A., Kozlowski, J.M., et al.** (1996b). Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Clin Cancer Res* 2, 1255-1261.

**Kim, N., and Choi, W.S.** (2011). Proapoptotic role of nuclear clusterin in brain. *Anat Cell Biol* 44, 169-175.

**Kim, N., Yoo, J.C., Han, J.Y., Hwang, E.M., Kim, Y.S., Jeong, E.Y., Sun, C.H., Yi, G.S., Roh, G.S., Kim, H.J., et al.** (2012). Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain. *J Cell Physiol* 227, 1157-1167.

**Kirszbaum, L., Sharpe, J.A., Murphy, B., d'Apice, A.J., Classon, B., Hudson, P., and Walker, I.D.** (1989). Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems. *EMBO J* 8, 711-718.

**Klock, G., Baiersdorfer, M., and Koch-Brandt, C.** (2009). Chapter 7: Cell protective functions of secretory Clusterin (sCLU). *Adv Cancer Res* 104, 115-138.

**Klokov, D., Criswell, T., Leskov, K.S., Araki, S., Mayo, L., and Boothman, D.A.** (2004). IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutat Res* 568, 97-110.

**Kounnas, M.Z., Loukinova, E.B., Stefansson, S., Harmony, J.A., Brewer, B.H., Strickland, D.K., and Argraves, W.S.** (1995a). Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. *J Biol Chem* 270, 13070-13075.

**Kounnas, M.Z., Moir, R.D., Rebeck, G.W., Bush, A.I., Argraves, W.S., Tanzi, R.E., Hyman, B.T., and Strickland, D.K.** (1995b). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82, 331-340.

**Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J.I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., and Reed, J.C.** (1996). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 148, 1567-1576.

**Krijnen, P.A., Cillessen, S.A., Manoe, R., Muller, A., Visser, C.A., Meijer, C.J., Musters, R.J., Hack, C.E., Aarden, L.A., and Niessen, H.W.** (2005). Clusterin: a protective mediator for ischemic cardiomyocytes? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2193-2202.

**Kulik, G., Carson, J.P., Vomastek, T., Overman, K., Gooch, B.D., Srinivasula, S., Alnemri, E., Nunez, G., and Weber, M.J.** (2001). Tumor necrosis factor alpha induces BID cleavage and bypasses antiapoptotic signals in prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res* 61, 2713-2719.

**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.

**Kurokawa, M., and Kornbluth, S.** (2009). Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138, 838-854.

**Kyprianou, N., English, H.F., and Isaacs, J.T.** (1988). Activation of a Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate* 13, 103-117.

**Kyprianou, N., and Isaacs, J.T.** (1988a). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122, 552-562.

**Kyprianou, N., and Isaacs, J.T.** (1988b). Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* 123, 2124-2131.

## L

**Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., Lefebvre, F.A., Cusan, L., Raynaud, J.P., Husson, J.M., and Fazekas, A.T.** (1983). New hormonal therapy in prostate cancer: combined use of a pure antiandrogen and an LHRH agonist. *Horm Res* 18, 18-27.

**Labrie, F., Luu-The, V., Belanger, A., Lin, S.X., Simard, J., Pelletier, G., and Labrie, C.** (2005). Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol* 187, 169-196.



- LaDu, M.J., Gilligan, S.M., Lukens, J.R., Cabana, V.G., Reardon, C.A., Van Eldik, L.J., and Holtzman, D.M.** (1998). Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *J Neurochem* *70*, 2070-2081.
- Lakins, J., Bennett, S.A., Chen, J.H., Arnold, J.M., Morrissey, C., Wong, P., O'Sullivan, J., and Tenniswood, M.** (1998). Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate. *J Biol Chem* *273*, 27887-27895.
- Lakins, J.N., Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Tenniswood, M.P., and Wilson, M.R.** (2002). Evidence that clusterin has discrete chaperone and ligand binding sites. *Biochemistry* *41*, 282-291.
- Lamoureux, F., Thomas, C., Yin, M.J., Kuruma, H., Fazli, L., Gleave, M.E., and Zoubeidi, A.** (2011). A novel HSP90 inhibitor delays castrate-resistant prostate cancer without altering serum PSA levels and inhibits osteoclastogenesis. *Clin Cancer Res* *17*, 2301-2313.
- Landstrom, M., Heldin, N.E., Bu, S., Hermansson, A., Itoh, S., ten Dijke, P., and Heldin, C.H.** (2000). Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells. *Curr Biol* *10*, 535-538.
- Lau, A.T., He, Q.Y., and Chiu, J.F.** (2003). Proteomic technology and its biomedical applications. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* *35*, 965-975.
- Laudet, V.** (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* *19*, 207-226.
- Lee, C., Atanelov, L., Modrek, B., and Xing, Y.** (2003). ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Res* *31*, 101-105.
- Lee, C., and Sensibar, J.A.** (1987). Proteins of the rat prostate. II. Synthesis of new proteins in the ventral lobe during castration-induced regression. *J Urol* *138*, 903-908.
- Lee, C.T.** (2004). Re: Racial differences in mortality among Medicare recipients after treatment for localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* *96*, 718-719.
- Leger, J.G., Le Guellec, R., and Tenniswood, M.P.** (1988). Treatment with antiandrogens induces an androgen-repressed gene in the rat ventral prostate. *Prostate* *13*, 131-142.
- Leger, J.G., Montpetit, M.L., and Tenniswood, M.P.** (1987). Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem Biophys Res Commun* *147*, 196-203.
- 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.
- Leskov, K.S., Klokov, D.Y., Li, J., Kinsella, T.J., and Boothman, D.A.** (2003). Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* *278*, 11590-11600.
- Li, J., and Al-Azzawi, F.** (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* *63*, 142-148.
- Lin, H.K., Wang, L., Hu, Y.C., Altuwajri, S., and Chang, C.** (2002). Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J* *21*, 4037-4048.
- Linja, M.J., Savinainen, K.J., Saramaki, O.R., Tammela, T.L., Vessella, R.L., and Visakorpi, T.** (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* *61*, 3550-3555.
- Liston, P., Fong, W.G., and Korneluk, R.G.** (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* *22*, 8568-8580.
- Litvinov, I.V., De Marzo, A.M., and Isaacs, J.T.** (2003). Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J Clin Endocrinol Metab* *88*, 2972-2982.
- Liu, J., Pascal, L.E., Isharwal, S., Metzger, D., Ramos Garcia, R., Pilch, J., Kasper, S., Williams, K., Basse, P.H., Nelson, J.B., et al.** (2011). Regenerated luminal epithelial cells are derived from preexisting luminal epithelial cells in adult mouse prostate. *Mol Endocrinol* *25*, 1849-1857.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147-157.
- Locke, J.A., Guns, E.S., Lubik, A.A., Adomat, H.H., Hendy, S.C., Wood, C.A., Ettinger, S.L., Gleave, M.E., and Nelson, C.C.** (2008). Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* *68*, 6407-6415.
- Loison, F., Debure, L., Nizard, P., le Goff, P., Michel, D., and le Drean, Y.** (2006). Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem J* *395*, 223-231.
- Long, R.M., Morrissey, C., Fitzpatrick, J.M., and Watson, R.W.** (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci (Lond)* *108*, 1-11.
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sullivan, P.M., Willard, H.F., French, F.S., and Wilson, E.M.** (1988). Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* *240*, 327-330.

## M

- Ma, X., and Bai, Y.** (2012). IGF-1 activates the P13K/AKT signaling pathway via upregulation of secretory clusterin. *Mol Med Rep* 6, 1433-1437.
- Ma, X., Ziel-van der Made, A.C., Autar, B., van der Korput, H.A., Vermeij, M., van Duijn, P., Cleutjens, K.B., de Krijger, R., Krimpenfort, P., Berns, A., et al.** (2005). Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res* 65, 5730-5739.
- Mahon, K.L., Henshall, S.M., Sutherland, R.L., and Horvath, L.G.** (2011). Pathways of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 18, R103-123.
- Mahon, M.G., Lindstedt, K.A., Hermann, M., Nimpf, J., and Schneider, W.J.** (1999). Multiple involvement of clusterin in chicken ovarian follicle development. Binding to two oocyte-specific members of the low density lipoprotein receptor gene family. *J Biol Chem* 274, 4036-4044.
- Maitland, N.J., Bryce, S.D., Stower, M.J., and Collins, A.T.** (2006). Prostate cancer stem cells: a target for new therapies. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 155-179.
- Maitland, N.J., and Collins, A.** (2005). A tumour stem cell hypothesis for the origins of prostate cancer. *BJU Int* 96, 1219-1223.
- Majumder, P.K., and Sellers, W.R.** (2005). Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 24, 7465-7474.
- Makela, S., Strauss, L., Kuiper, G., Valve, E., Salmi, S., Santti, R., and Gustafsson, J.A.** (2000). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol* 170, 219-229.
- Marcelli, M., Cunningham, G.R., Walkup, M., He, Z., Sturgis, L., Kagan, C., Mannucci, R., Nicoletti, I., Teng, B., and Denner, L.** (1999). Signaling pathway activated during apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP: overexpression of caspase-7 as a new gene therapy strategy for prostate cancer. *Cancer Res* 59, 382-390.
- Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R., and Cunha, G.R.** (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253, 165-174.
- Martin, D.A., Siegel, R.M., Zheng, L., and Lenardo, M.J.** (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* 273, 4345-4349.
- Martin, M.C., Allan, L.A., Lickrish, M., Sampson, C., Morrice, N., and Clarke, P.R.** (2005). Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem* 280, 15449-15455.
- Matrixscience** (2003). Scoring Schemes
- Matsubara, E., Frangione, B., and Ghiso, J.** (1995). Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J Biol Chem* 270, 7563-7567.
- May, P., Bock, H.H., and Herz, J.** (2003). Integration of endocytosis and signal transduction by lipoprotein receptors. *Sci STKE* 2003, PE12.
- May, P., Herz, J., and Bock, H.H.** (2005). Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci* 62, 2325-2338.
- May, P.C., Johnson, S.A., Poirier, J., Lampert-Etchells, M., and Finch, C.E.** (1989). Altered gene expression in Alzheimer's disease brain tissue. *Can J Neurol Sci* 16, 473-476.
- McDonald, J.F., and Nelsestuen, G.L.** (1997). Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: characterization of its impact on C9 polymerization. *Biochemistry* 36, 7464-7473.
- McHattie, S., and Edington, N.** (1999). Clusterin prevents aggregation of neuropeptide 106-126 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 336-340.
- McLaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-Ebert, C., Stuart, W.D., Florio, C.J., Groen, P.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Witte, D.P., et al.** (2000). Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest* 106, 1105-1113.
- McNeal, J.E.** (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 12, 619-633.
- McNeal, J.E., Redwine, E.A., Freiha, F.S., and Stamey, T.A.** (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 12, 897-906.
- McPherson, S.J., Ellem, S.J., Simpson, E.R., Patchev, V., Fritzscheier, K.H., and Risbridger, G.P.** (2007). Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 148, 566-574.



- McPherson, S.J., Wang, H., Jones, M.E., Pedersen, J., Iismaa, T.P., Wreford, N., Simpson, E.R., and Risbridger, G.P.** (2001). Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology* *142*, 2458-2467.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J.** (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* *21*, 5299-5305.
- Michel, D., Chatelain, G., North, S., and Brun, G.** (1997a). Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J* *328* ( Pt 1), 45-50.
- Michel, D., Gillet, G., Volovitch, M., Pessac, B., Calothy, G., and Brun, G.** (1989). Expression of a novel gene encoding a 51.5 kD precursor protein is induced by different retroviral oncogenes in quail neuroretinal cells. *Oncogene Res* *4*, 127-136.
- Michel, D., Moyse, E., Trembleau, A., Jourdan, F., and Brun, G.** (1997b). Clusterin/ApoJ expression is associated with neuronal apoptosis in the olfactory mucosa of the adult mouse. *J Cell Sci* *110* ( Pt 14), 1635-1645.
- Michels, G., and Hoppe, U.C.** (2008). Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* *29*, 182-198.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A., and Yuan, J.** (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* *75*, 653-660.
- Miyake, H., Chi, K.N., and Gleave, M.E.** (2000a). Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* *6*, 1655-1663.
- Miyake, H., Hara, I., and Gleave, M.E.** (2005a). Antisense oligodeoxynucleotide therapy targeting clusterin gene for prostate cancer: Vancouver experience from discovery to clinic. *Int J Urol* *12*, 785-794.
- Miyake, H., Hara, I., Gleave, M.E., and Eto, H.** (2004). Protection of androgen-dependent human prostate cancer cells from oxidative stress-induced DNA damage by overexpression of clusterin and its modulation by androgen. *Prostate* *61*, 318-323.
- Miyake, H., Hara, S., Zellweger, T., Kamidono, S., Gleave, M.E., and Hara, I.** (2001). Acquisition of resistance to Fas-mediated apoptosis by overexpression of clusterin in human renal-cell carcinoma cells. *Mol Urol* *5*, 105-111.
- Miyake, H., Muramaki, M., Furukawa, J., Kurahashi, T., and Fujisawa, M.** (2010). Serum level of clusterin and its density in men with prostate cancer as novel biomarkers reflecting disease extension. *Urology* *75*, 454-459.
- Miyake, H., Muramaki, M., Kurahashi, T., Yamanaka, K., Hara, I., Gleave, M., and Fujisawa, M.** (2006). Expression of clusterin in prostate cancer correlates with Gleason score but not with prognosis in patients undergoing radical prostatectomy without neoadjuvant hormonal therapy. *Urology* *68*, 609-614.
- Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P.S., and Gleave, M.E.** (2000b). Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res* *60*, 2547-2554.
- Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P.S., and Gleave, M.E.** (2000c). Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. *Cancer Res* *60*, 170-176.
- Miyake, H., Pollak, M., and Gleave, M.E.** (2000d). Castration-induced up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 potentiates insulin-like growth factor-I activity and accelerates progression to androgen independence in prostate cancer models. *Cancer Res* *60*, 3058-3064.
- Miyake, H., Yamanaka, K., Muramaki, M., Kurahashi, T., Gleave, M., and Hara, I.** (2005b). Enhanced expression of the secreted form of clusterin following neoadjuvant hormonal therapy as a prognostic predictor in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *Oncol Rep* *14*, 1371-1375.
- Miyata, M., Biro, S., Kaieda, H., Eto, H., Orihara, K., Kihara, T., Obata, H., Matsushita, N., Matsuyama, T., and Tei, C.** (2001). Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury. *Circulation* *104*, 1407-1412.
- Mizutani, K., Matsumoto, K., Hasegawa, N., Deguchi, T., and Nozawa, Y.** (2006). Expression of clusterin, XIAP and survivin, and their changes by camptothecin (CPT) treatment in CPT-resistant PC-3 and CPT-sensitive LNCaP cells. *Exp Oncol* *28*, 209-215.
- Mocellin, S., Rossi, C.R., Pilati, P., and Nitti, D.** (2005). Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* *16*, 35-53.
- Mohler, J.L., Gregory, C.W., Ford, O.H., 3rd, Kim, D., Weaver, C.M., Petrusz, P., Wilson, E.M., and French, F.S.** (2004). The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* *10*, 440-448.

- 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.
- Montpetit, M.L., Lawless, K.R., and Tenniswood, M.** (1986). Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate. *Prostate* 8, 25-36.
- Moretti, R.M., Mai, S., Montagnani Marelli, M., Rizzi, F., Bettuzzi, S., and Limonta, P.** (2011). Molecular mechanisms of the antimetastatic activity of nuclear clusterin in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 39, 225-234.
- Moretti, R.M., Marelli, M.M., Mai, S., Cariboni, A., Scaltriti, M., Bettuzzi, S., and Limonta, P.** (2007a). Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 10325-10333.
- Moretti, R.M., Montagnani Marelli, M., Mai, S., Cariboni, A., Scaltriti, M., Bettuzzi, S., and Limonta, P.** (2007b). Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 10325-10333.
- Murphy, B.F., Kirszbaum, L., Walker, I.D., and d'Apice, A.J.** (1988). SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *J Clin Invest* 81, 1858-1864.

## N, O

- Naito, S., Sakamoto, N., Kotoh, S., Goto, K., Koga, H., Hasegawa, S., Matsumoto, T., and Kumazawa, J.** (1994). Proliferating cell nuclear antigen in needle biopsy specimens of prostatic carcinoma. *Eur Urol* 26, 164-169.
- Nastiuk, K.L., Kim, J.W., Mann, M., and Krolewski, J.J.** (2003). Androgen regulation of FLICE-like inhibitory protein gene expression in the rat prostate. *J Cell Physiol* 196, 386-393.
- Nastiuk, K.L., and Krolewski, J.J.** (2008). FLIP-ping out: death receptor signaling in the prostate. *Cancer Biol Ther* 7, 1171-1179.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C., and Levrero, M.** (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* 275, 200-203.
- Nemeth, J.A., Sensibar, J.A., White, R.R., Zelner, D.J., Kim, I.Y., and Lee, C.** (1997). Prostatic ductal system in rats: tissue-specific expression and regional variation in stromal distribution of transforming growth factor-beta 1. *Prostate* 33, 64-71.
- Nemoto, R., Kawamura, H., Miyakawa, I., Uchida, K., Hattori, K., Koiso, K., and Harada, M.** (1993). Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in human prostate adenocarcinoma. *J Urol* 149, 165-169.
- Nesterov, A., Ivashchenko, Y., and Kraft, A.S.** (2002). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* 21, 1135-1140.
- Ng, C.P., Zisman, A., and Bonavida, B.** (2002). Synergy is achieved by complementation with Apo2L/TRAIL and actinomycin D in Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis of prostate cancer cells: role of XIAP in resistance. *Prostate* 53, 286-299.
- Nhan, T.Q., Liles, W.C., and Schwartz, S.M.** (2006). Physiological functions of caspases beyond cell death. *Am J Pathol* 169, 729-737.
- Nizard, P., Tetley, S., Le Drean, Y., Watrin, T., Le Goff, P., Wilson, M.R., and Michel, D.** (2007). Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic* 8, 554-565.
- Nylandsted, J., Brand, K., and Jaattela, M.** (2000a). Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 926, 122-125.
- Nylandsted, J., Rohde, M., Brand, K., Bastholm, L., Elling, F., and Jaattela, M.** (2000b). Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7871-7876.
- Oda, T., Wals, P., Osterburg, H.H., Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Stine, W.B., Snyder, S.W., Holzman, T.F., et al.** (1995). Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 136, 22-31.
- Ohlson, N., Bergh, A., Persson, M.L., and Wikstrom, P.** (2006). Castration rapidly decreases local insulin-like growth factor-1 levels and inhibits its effects in the ventral prostate in mice. *Prostate* 66, 1687-1697.
- Ohlson, N., Bergh, A., Stattin, P., and Wikstrom, P.** (2007). Castration-induced epithelial cell death in human prostate tissue is related to locally reduced IGF-1 levels. *Prostate* 67, 32-40.
- Olanow, C.W.** (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord* 22 Suppl 17, S335-342.



**Olson, M., and Kornbluth, S.** (2001). Mitochondria in apoptosis and human disease. *Curr Mol Med* 1, 91-122.

## P, Q

**Pajak, B., and Orzechowski, A.** (2007). Ethylenediaminetetraacetic acid affects subcellular expression of clusterin protein in human colon adenocarcinoma COLO 205 cell line. *Anticancer Drugs* 18, 55-63.

**Palmer, D.J., and Christie, D.L.** (1992). Identification of molecular aggregates containing glycoproteins III, J, K (carboxypeptidase H), and H (Kex2-related proteases) in the soluble and membrane fractions of adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem* 267, 19806-19812.

**Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., et al.** (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19, 4310-4322.

**Pankhurst, G.J., Bennett, C.A., and Easterbrook-Smith, S.B.** (1998). Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. *Biochemistry* 37, 4823-4830.

**Papadopoulou, N., Papakonstanti, E.A., Kallergi, G., Alevizopoulos, K., and Stournaras, C.** (2009). Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life* 61, 56-61.

**Parkin, D.M., Pisani, P., and Ferlay, J.** (1999). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49, 33-64, 31.

**Partridge, S.R., Baker, M.S., Walker, M.J., and Wilson, M.R.** (1996). Clusterin, a putative complement regulator, binds to the cell surface of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Infect Immun* 64, 4324-4329.

**Patterson, S.G., Wei, S., Chen, X., Sallman, D.A., Gilvary, D.L., Zhong, B., Pow-Sang, J., Yeatman, T., and Djeu, J.Y.** (2006). Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells. *Oncogene* 25, 6113-6122.

**Pearl, L.H., and Prodromou, C.** (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75, 271-294.

**Penninger, J.M., and Kroemer, G.** (2003). Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 5, 97-99.

**Perlman, H., Zhang, X., Chen, M.W., Walsh, K., and Buttyan, R.** (1999). An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 48-54.

**Petropoulou, C., Trougakos, I.P., Kolettas, E., Toussaint, O., and Gonos, E.S.** (2001). Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts. *FEBS Lett* 509, 287-297.

**Petrylak, D.P., Tangen, C.M., Hussain, M.H., Lara, P.N., Jr., Jones, J.A., Taplin, M.E., Burch, P.A., Berry, D., Moinpour, C., Kohli, M., et al.** (2004). Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 351, 1513-1520.

**Pfeil, K., Eder, I.E., Putz, T., Ramoner, R., Culig, Z., Ueberall, F., Bartsch, G., and Klocker, H.** (2004). Long-term androgen-ablation causes increased resistance to PI3K/Akt pathway inhibition in prostate cancer cells. *Prostate* 58, 259-268.

**Phizicky, E., Bastiaens, P.I., Zhu, H., Snyder, M., and Fields, S.** (2003). Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422, 208-215.

**Pins, M.R., Fiadjoe, J.E., Korley, F., Wong, M., Rademaker, A.W., Jovanovic, B., Yoo, T.K., Kozlowski, J.M., Raji, A., Yang, X.J., et al.** (2004). Clusterin as a possible predictor for biochemical recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy with intermediate Gleason scores: a preliminary report. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7, 243-248.

**Pinthus, J.H., Bryskin, I., Trachtenberg, J., Lu, J.P., Singh, G., Fridman, E., and Wilson, B.C.** (2007). Androgen induces adaptation to oxidative stress in prostate cancer: implications for treatment with radiation therapy. *Neoplasia* 9, 68-80.

**Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Rybchyn, M.S., Carver, J.A., and Wilson, M.R.** (2000). Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 39, 15953-15960.

**Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Morishima, Y., and Murphy, P.J.** (2004). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40, 41-58.

**Pucci, S., Bonanno, E., Pichiorri, F., Angeloni, C., and Spagnoli, L.G.** (2004). Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 23, 2298-2304.

**Purvis, K., Attramad, A., Rui, H., Tollefsrud, A., Abyholm, T., and Magnus, O.** (1988). [Sperm motility. Physiology, analytical methods and clinical aspects]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 108, 1128-1132.

**Quarmany, V.E., Beckman, W.C., Jr., Cooke, D.B., Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Wilson, E.M., and French, F.S.** (1990). Expression and localization of androgen receptor in the R-3327 Dunning rat prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 50, 735-739.

**Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., el-Awady, M.K., Wilson, E.M., and French, F.S.** (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16, 271-321.

## R

**Rangaswami, H., Bulbule, A., and Kundu, G.C.** (2006). Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol* 16, 79-87.

**Rath, P.C., and Aggarwal, B.B.** (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19, 350-364.

**Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., et al.** (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3, 839-843.

**Reddy, K.B., Jin, G., Karode, M.C., Harmony, J.A., and Howe, P.H.** (1996a). Transforming growth factor beta (TGF beta)-induced nuclear localization of apolipoprotein J/clusterin in epithelial cells. *Biochemistry* 35, 6157-6163.

**Reddy, K.B., Karode, M.C., Harmony, A.K., and Howe, P.H.** (1996b). Interaction of transforming growth factor beta receptors with apolipoprotein J/clusterin. *Biochemistry* 35, 309-314.

**Reiter, E., Bonnet, P., Sente, B., Dombrowicz, D., de Leval, J., Closset, J., and Hennen, G.** (1992). Growth hormone and prolactin stimulate androgen receptor, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor levels in the prostate of immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 88, 77-87.

**Reiter, E., Hennuy, B., Bruyninx, M., Cornet, A., Klug, M., McNamara, M., Closset, J., and Hennen, G.** (1999). Effects of pituitary hormones on the prostate. *Prostate* 38, 159-165.

**Rennie, P.S., Bruchovsky, N., Akakura, K., Goldenberg, S.L., Otal, N., Akakura, S., Wong, P., and Tenniswood, M.** (1994). Effect of tumour progression on the androgenic regulation of the androgen receptor, TRPM-2 and YPT1 genes in the Shionogi carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 50, 31-40.

**Risbridger, G.P., Ellem, S.J., and McPherson, S.J.** (2007). Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol* 39, 183-188.

**Rizzi, F., and Bettuzzi, S.** (2008). Targeting Clusterin in prostate cancer. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 9, 265-274.

**Rizzi, F., Coletta, M., and Bettuzzi, S.** (2009). Chapter 2: Clusterin (CLU): From one gene and two transcripts to many proteins. *Adv Cancer Res* 104, 9-23.

**Robertson, B.W., and Chellaiah, M.A.** (2010). Osteopontin induces beta-catenin signaling through activation of Akt in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 316, 1-11.

**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.

**Rocchi, P., So, A., Kojima, S., Signaevsky, M., Beraldi, E., Fazli, L., Hurtado-Coll, A., Yamanaka, K., and Gleave, M.** (2004). Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 64, 6595-6602.

**Rosenberg, M.E., and Silksen, J.** (1995). Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 633-645.

**Rouleau, M., Leger, J., and Tenniswood, M.** (1990). Ductal heterogeneity of cytokeratins, gene expression, and cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 4, 2003-2013.

## S

**Saez, J.M.** (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15, 574-626.

**Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A.K., and Farquhar, M.G.** (1994). Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9725-9729.

**Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., and Alnemri, E.S.** (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2, 476-483.





**Santilli, G., Aronow, B.J., and Sala, A.** (2003). Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for I $\kappa$ B expression and regulation of NF- $\kappa$ B activity. *J Biol Chem* 278, 38214-38219.

**Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T.** (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10832-10837.

**Scaltriti, M., Bettuzzi, S., Sharrard, R.M., Caporali, A., Caccamo, A.E., and Maitland, N.J.** (2004a). Clusterin overexpression in both malignant and nonmalignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer* 91, 1842-1850.

**Scaltriti, M., Santamaria, A., Paciucci, R., and Bettuzzi, S.** (2004b). Intracellular clusterin induces G2-M phase arrest and cell death in PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 6174-6182.

**Schafer, Z.T., and Kornbluth, S.** (2006). The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* 10, 549-561.

**Schepeler, T., Mansilla, F., Christensen, L.L., Orntoft, T.F., and Andersen, C.L.** (2007). Clusterin expression can be modulated by changes in TCF1-mediated Wnt signaling. *J Mol Signal* 2, 6.

**Scher, H.I., Buchanan, G., Gerald, W., Butler, L.M., and Tilley, W.D.** (2004). Targeting the androgen receptor: improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11, 459-476.

**Schulte, T.W., Blagosklonny, M.V., Ingui, C., and Neckers, L.** (1995). Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J Biol Chem* 270, 24585-24588.

**Schwochau, G.B., Nath, K.A., and Rosenberg, M.E.** (1998). Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties. *Kidney Int* 53, 1647-1653.

**Sensibar, J.A., Alger, B., Tseng, A., Berg, L., and Lee, C.** (1990). Proteins of the rat prostate. III. Effect of testosterone on protein synthesis by the ventral prostate of castrated rats. *J Urol* 143, 161-166.

**Sensibar, J.A., Qian, Y., Griswold, M.D., Sylvester, S.R., Bardin, C.W., Cheng, C.Y., and Lee, C.** (1993). Localization and molecular heterogeneity of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) among ventral prostate, seminal vesicle, testis, and epididymis of rats. *Biol Reprod* 49, 233-242.

**Sensibar, J.A., Sutkowski, D.M., Raffo, A., Buttyan, R., Griswold, M.D., Sylvester, S.R., Kozlowski, J.M., and Lee, C.** (1995). Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 55, 2431-2437.

**Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W., and Reichrath, J.** (2006). Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 13, 12-19.

**Shen, M.M., and Abate-Shen, C.** (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 24, 1967-2000.

**Shi, X.B., Xue, L., Yang, J., Ma, A.H., Zhao, J., Xu, M., Tepper, C.G., Evans, C.P., Kung, H.J., and deVere White, R.W.** (2007). An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19983-19988.

**Shim, J.H., Choi, C.S., Lee, E.C., Kim, M.Y., and Chun, Y.J.** (2009). Tamoxifen suppresses clusterin level through Akt inactivation and proteasome degradation in human prostate cancer cells. *Biomolecules and therapeutics* 17, 25-31.

**Shukla, S., MacLennan, G.T., Marengo, S.R., Resnick, M.I., and Gupta, S.** (2005). Constitutive activation of p13K-Akt and NF- $\kappa$ B during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model. *Prostate* 64, 224-239.

**Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., Tenniswood, M., and Welsh, J.** (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58, 367-376.

**Singla, D.K., and McDonald, D.E.** (2007). Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H1590-1595.

**Sintich, S.M., Steinberg, J., Kozlowski, J.M., Lee, C., Pruden, S., Sayeed, S., and Sensibar, J.A.** (1999). Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor- $\alpha$  in PC3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP-2 (clusterin). *Prostate* 39, 87-93.

**Sowery, R.D., Hadaschik, B.A., So, A.I., Zoubeydi, A., Fazli, L., Hurtado-Coll, A., and Gleave, M.E.** (2008). Clusterin knockdown using the antisense oligonucleotide OGX-011 re-sensitizes docetaxel-refractory prostate cancer PC-3 cells to chemotherapy. *BJU Int* 102, 389-397.

**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.

- Stathopoulos, E.N., Dambaki, C., Kampa, M., Theodoropoulos, P.A., Anezinis, P., Delakas, D., Delides, G.S., and Castanas, E.** (2003). Membrane androgen binding sites are preferentially expressed in human prostate carcinoma cells. *BMC Clin Pathol* 3, 1.
- Steinberg, J., Oyasu, R., Lang, S., Sintich, S., Rademaker, A., Lee, C., Kozlowski, J.M., and Sensibar, J.A.** (1997). Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1707-1711.
- Stuart, W.D., Krol, B., Jenkins, S.H., and Harmony, J.A.** (1992). Structure and stability of apolipoprotein J-containing high-density lipoproteins. *Biochemistry* 31, 8552-8559.
- Sugimura, Y., Cunha, G.R., and Donjacour, A.A.** (1986). Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34, 961-971.
- Suh, E., Wang, Z., Swain, G.P., Tenniswood, M., and Traber, P.G.** (2001). Clusterin gene transcription is activated by caudal-related homeobox genes in intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G149-156.
- Sun, A., Tang, J., Hong, Y., Song, J., Terranova, P.F., Thrasher, J.B., Svojanovsky, S., Wang, H.G., and Li, B.** (2008). Androgen receptor-dependent regulation of Bcl-xL expression: Implication in prostate cancer progression. *Prostate* 68, 453-461.
- Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroemer, G.** (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366, 151-165.
- Sylvester, S.R., Morales, C., Oko, R., and Griswold, M.D.** (1991). Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol Reprod* 45, 195-207.
- Sylvester, S.R., Skinner, M.K., and Griswold, M.D.** (1984). A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biol Reprod* 31, 1087-1101.

## T

- Takada, H., Chen, N.J., Mirtsos, C., Suzuki, S., Suzuki, N., Wakeham, A., Mak, T.W., and Yeh, W.C.** (2003). Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol* 23, 4026-4033.
- Takase, O., Minto, A.W., Puri, T.S., Cunningham, P.N., Jacob, A., Hayashi, M., and Quigg, R.J.** (2008). Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis. *Kidney Int* 73, 567-577.
- Takayama, S., Reed, J.C., and Homma, S.** (2003). Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22, 9041-9047.
- Tannock, I.F., de Wit, R., Berry, W.R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K.N., Oudard, S., Theodore, C., James, N.D., Turesson, I., et al.** (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351, 1502-1512.
- Taplin, M.E., Rajeshkumar, B., Halabi, S., Werner, C.P., Woda, B.A., Picus, J., Stadler, W., Hayes, D.F., Kantoff, P.W., Vogelzang, N.J., et al.** (2003). Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol* 21, 2673-2678.
- Tartaglia, L.A., and Goeddel, D.V.** (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today* 13, 151-153.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J.** (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.
- Tenniswood, M.P., Guenette, R.S., Lakins, J., Mooibroek, M., Wong, P., and Welsh, J.E.** (1992). Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metastasis Rev* 11, 197-220.
- Thornberry, N.A.** (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 5, R97-103.
- 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* 2, 277-285.
- Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., et al.** (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644-648.
- Tostain, J., Rossi, D., and Martin, P.M.** (2004). [Physiology of androgens in adult men]. *Prog Urol* 14, 639-660.
- Trougakos, I.P., Djeu, J.Y., Gonos, E.S., and Boothman, D.A.** (2009a). Advances and challenges in basic and translational research on clusterin. *Cancer Res* 69, 403-406.
- Trougakos, I.P., and Gonos, E.S.** (2002). Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1430-1448.
- Trougakos, I.P., and Gonos, E.S.** (2006). Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res* 40, 1324-1334.



- Trougakos, I.P., Lourda, M., Agiostratidou, G., Kletsas, D., and Gonos, E.S.** (2005). Differential effects of clusterin/apolipoprotein J on cellular growth and survival. *Free Radic Biol Med* 38, 436-449.
- Trougakos, I.P., Lourda, M., Antonelou, M.H., Kletsas, D., Gorgoulis, V.G., Papassideri, I.S., Zou, Y., Margaritis, L.H., Boothman, D.A., and Gonos, E.S.** (2009b). Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex. *Clin Cancer Res* 15, 48-59.
- Trougakos, I.P., So, A., Jansen, B., Gleave, M.E., and Gonos, E.S.** (2004). Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. *Cancer Res* 64, 1834-1842.
- Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S., and French, L.E.** (1993). Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol* 151, 2159-2165.
- Tsuruta, J.K., Wong, K., Fritz, I.B., and Griswold, M.D.** (1990). Structural analysis of sulphated glycoprotein 2 from amino acid sequence. Relationship to clusterin and serum protein 40,40. *Biochem J* 268, 571-578.

## V, W

- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., and Vandenabeele, P.** (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* 17, 922-930.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G.** (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 700-714.
- Viard, I., Wehrli, P., Jornot, L., Bullani, R., Vechietti, J.L., Schifferli, J.A., Tschopp, J., and French, L.E.** (1999). Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *J Invest Dermatol* 112, 290-296.
- Vis, A.N., and Schroder, F.H.** (2009). Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: the androgen receptor and steroidogenic pathways. *BJU Int* 104, 438-448.
- Visakorpi, T.** (1992). Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J Pathol* 168, 7-13.
- Vitale, D.C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., and Salomone, S.** (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 38, 15-25.
- Wai, P.Y., and Kuo, P.C.** (2004). The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res* 121, 228-241.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., and Baldwin, A.S., Jr.** (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang, H., Sun, D., Ji, P., Mohler, J., and Zhu, L.** (2008a). An AR-Skp2 pathway for proliferation of androgen-dependent prostate-cancer cells. *J Cell Sci* 121, 2578-2587.
- Wang, L., Du, F., and Wang, X.** (2008b). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693-703.
- 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.
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H., Halili, M.V., Hu, Y.P., Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M.** (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 461, 495-500.
- Wang, Z., Bhattacharya, N., Weaver, M., Petersen, K., Meyer, M., Gapter, L., and Magnuson, N.S.** (2001). Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* 2, 167-179.
- Waters, K.M., Safe, S., and Gaido, K.W.** (2001). Differential gene expression in response to methoxychlor and estradiol through ERalpha, ERbeta, and AR in reproductive tissues of female mice. *Toxicol Sci* 63, 47-56.
- Webb, S.J., Harrison, D.J., and Wyllie, A.H.** (1997). Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol* 41, 1-34.
- Wehrli, P., Charnay, Y., Vallet, P., Zhu, G., Harmony, J., Aronow, B., Tschopp, J., Bouras, C., Viard-Leveugle, I., French, L.E., et al.** (2001). Inhibition of post-ischemic brain injury by clusterin overexpression. *Nat Med* 7, 977-979.
- Wei, L., Xue, T., Wang, J., Chen, B., Lei, Y., Huang, Y., Wang, H., and Xin, X.** (2009). Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer. *Int J Cancer* 125, 791-806.

- Wen, Y., Hu, M.C., Makino, K., Spohn, B., Bartholomeusz, G., Yan, D.H., and Hung, M.C.** (2000). HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res* 60, 6841-6845.
- West, K.A., Castillo, S.S., and Dennis, P.A.** (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 5, 234-248.
- Wikstrom, P., Ohlson, N., Stattin, P., and Bergh, A.** (2007). Nuclear androgen receptors recur in the epithelial and stromal compartments of malignant and non-malignant human prostate tissue several months after castration therapy. *Prostate* 67, 1277-1284.
- Williams, R.H., Stapleton, A.M., Yang, G., Truong, L.D., Rogers, E., Timme, T.L., Wheeler, T.M., Scardino, P.T., and Thompson, T.C.** (1996). Reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II in human prostate cancer: an immunohistochemical study. *Clin Cancer Res* 2, 635-640.
- Wilson, M.R., and Easterbrook-Smith, S.B.** (2000). Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* 25, 95-98.
- Wilson, M.R., Roeth, P.J., and Easterbrook-Smith, S.B.** (1991). Clusterin enhances the formation of insoluble immune complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 985-990.
- Wilson, M.R., Yerbury, J.J., and Poon, S.** (2008). Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol Biosyst* 4, 42-52.
- Wong, P., Borst, D.E., Farber, D., Danciger, J.S., Tenniswood, M., Chader, G.J., and van Veen, T.** (1994a). Increased TRPM-2/clusterin mRNA levels during the time of retinal degeneration in mouse models of retinitis pigmentosa. *Biochem Cell Biol* 72, 439-446.
- Wong, P., Pineault, J., Lakins, J., Taillefer, D., Leger, J., Wang, C., and Tenniswood, M.** (1993). Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J Biol Chem* 268, 5021-5031.
- Wong, P., Taillefer, D., Lakins, J., Pineault, J., Chader, G., and Tenniswood, M.** (1994b). Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 221, 917-925.
- Wu, A.J., Park, II, Zhaung, L., and Lee, C.** (2002). Response to a lethal dose of heat shock by a transient up-regulation of clusterin expression followed by down-regulation and apoptosis in prostate and bladder cancer cells. *Prostate* 53, 277-285.
- Wunsche, W., Tenniswood, M.P., Schneider, M.R., and Vollmer, G.** (1998). Estrogenic regulation of clusterin mRNA in normal and malignant endometrial tissue. *Int J Cancer* 76, 684-688.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R.** (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., and Dunlop, D.** (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.

## X, Y, Z

- Xu, Y., Chen, S.Y., Ross, K.N., and Balk, S.P.** (2006). Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res* 66, 7783-7792.
- Xue, H.Y., and Wong, H.L.** (2012). Targeting megalin to enhance delivery of anti-clusterin small-interfering RNA nanomedicine to chemo-treated breast cancer. *Eur J Pharm Biopharm* 81, 24-32.
- Yamanaka, K., Gleave, M.E., Hara, I., Muramaki, M., and Miyake, H.** (2005). Synergistic antitumor effect of combined use of adenoviral-mediated p53 gene transfer and antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in an androgen-independent human prostate cancer model. *Mol Cancer Ther* 4, 187-195.
- Yan, Y., Luo, K., Zhang, H., and Chai, W.** (2013). RNA interference-mediated secretory clusterin gene silencing inhibits proliferation and promotes apoptosis of human non-small cell lung cancer cells. *Hepatogastroenterology* 60, 70-75.
- Yang, C.R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J.J., Kinsella, T.J., and Boothman, D.A.** (2000). Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5907-5912.
- Yeh, S., Chang, H.C., Miyamoto, H., Takatera, H., Rahman, M., Kang, H.Y., Thin, T.H., Lin, H.K., and Chang, C.** (1999a). Differential induction of the androgen receptor transcriptional activity by selective androgen receptor coactivators. *Keio J Med* 48, 87-92.



- Yeh, S., Lin, H.K., Kang, H.Y., Thin, T.H., Lin, M.F., and Chang, C.** (1999b). From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 5458-5463.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J.** (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* *369*, 321-323.
- Yoo, K.S., Nastiuk, K.L., and Krolewski, J.J.** (2009). Transforming growth factor beta1 induces apoptosis by suppressing FLICE-like inhibitory protein in DU145 prostate epithelial cells. *Int J Cancer* *124*, 834-842.
- Yoshimoto, M., Cutz, J.C., Nuin, P.A., Joshua, A.M., Bayani, J., Evans, A.J., Zielenska, M., and Squire, J.A.** (2006). Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet* *169*, 128-137.
- Zellweger, T., Chi, K., Miyake, H., Adomat, H., Kiyama, S., Skov, K., and Gleave, M.E.** (2002). Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by inhibition of the cell survival protein clusterin. *Clin Cancer Res* *8*, 3276-3284.
- Zellweger, T., Miyake, H., Cooper, S., Chi, K., Conklin, B.S., Monia, B.P., and Gleave, M.E.** (2001a). Antitumor activity of antisense clusterin oligonucleotides is improved in vitro and in vivo by incorporation of 2'-O-(2-methoxy)ethyl chemistry. *J Pharmacol Exp Ther* *298*, 934-940.
- Zellweger, T., Miyake, H., July, L.V., Akbari, M., Kiyama, S., and Gleave, M.E.** (2001b). Chemosensitization of human renal cell cancer using antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene clusterin. *Neoplasia* *3*, 360-367.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J.** (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* *87*, 619-628.
- Zhang, H., Kim, J.K., Edwards, C.A., Xu, Z., Taichman, R., and Wang, C.Y.** (2005). Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol* *7*, 909-915.
- Zhang, Q., Zhou, W., Kundu, S., Jang, T.L., Yang, X., Pins, M., Smith, N., Jovanovic, B., Xin, D., Liang, L., et al.** (2006). The leader sequence triggers and enhances several functions of clusterin and is instrumental in the progression of human prostate cancer in vivo and in vitro. *BJU Int* *98*, 452-460.
- Zhong, B., Sallman, D.A., Gilvary, D.L., Pernazza, D., Sahakian, E., Fritz, D., Cheng, J.Q., Trougakos, I., Wei, S., and Djeu, J.Y.** (2010). Induction of clusterin by AKT--role in cytoprotection against docetaxel in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther* *9*, 1831-1841.
- Zhou, X.M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R.J., and Chittenden, T.** (2000). Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *J Biol Chem* *275*, 25046-25051.
- Zhu, B., and Kyprianou, N.** (2005). Transforming growth factor beta and prostate cancer. *Cancer Treat Res* *126*, 157-173.
- Zhu, Y.S.** (2005). Molecular Basis of Steroid Action in the Prostate. *Cellscience* *1*, 27-55.
- Zielinski, R.R., Eigl, B.J., and Chi, K.N.** (2013). Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *Cancer J* *19*, 79-89.
- Zlokovic, B.V.** (1996). Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci* *59*, 1483-1497.
- Zornig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G.** (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* *1551*, F1-37.
- Zoubeidi, A., Chi, K., and Gleave, M.** (2010). Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* *16*, 1088-1093.

## VII. ANNEXES



# New Features in the Treatment of Androgen-Independent Prostate Cancer

Jean Closset<sup>1,\*</sup>, Hayet Ammar<sup>1</sup>, Viet-Ha Nguyen<sup>1</sup>, Anne Cornet<sup>1</sup> and Eric Reiter<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biochimie, Laboratoire d'Endocrinologie, Institut de Pathologie B23, avenue de l'Hôpital, 3, Université de Liège, 4000 Liège, Belgique and <sup>2</sup>Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6073, INRA/CNRS/Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

**Abstract:** Prostate cancer develops from clones that are already present as early as thirty-five years of age, when circulating concentrations of androgens are high. The progression of the disease is low and the cancer is diagnosed at a more advanced age. Prostate cancer evolves from an androgen dependant stage to stage where it escapes from all anti-androgenic treatments. The patient usually dies within two years following the diagnosis of advanced cancer. Therefore, it is of great interest to develop new therapies for androgen independent prostate cancer. The androgen independent evolution of prostate cancer is a complex phenomenon at the cellular and molecular levels. It includes an increased sensitivity to growth factors, the control of proliferation pathways, apoptotic and survival pathways as well as the control of angiogenesis. Epidemiological studies have also suggested that certain vitamins or phyto-estrogens could protect against prostate cancer development. The present review attempts to present an overview of the fundamental research in cellular signalling which could be interesting as target for the treatment of androgen independent prostate cancer. Also the potential interest of non-androgenic steroids was reviewed for the same goal.

**Key Words:** Prostate, cancer, androgen, genes, molecular therapy.

## INTRODUCTION

Located beneath the bladder, the prostate is a gland whose development and function are controlled by androgens.

At different periods in life the prostate functions in different contexts as regards androgens [1]. During foetal life, it develops in the context of low androgen levels that are nevertheless sufficient to promote morphogenesis of the gland. In the adult, androgen levels are high but growth of the gland is slow, and androgens regulate the synthesis of proteins composing the prostatic secretions. In older men, the prostate continues to grow although androgen levels are dropping.

During ageing, the prostate is subject to two major pathologies: cancer and benign hyperplasia. The past decade has seen the advent of systematic screening for prostatic cancer. With the development of socio-economic conditions having increased life expectancy, prostate cancer has become the second cause of death from cancer in man [2]. Although often diagnosed late in life, prostate cancer results from the development of tumour foci already present. The evolution of prostate cancer can thus be seen as a progression from androgen-dependent tumour foci to advanced stages where tumour cells become totally refractory to anti-androgen therapy. Once the cancer reaches such an advanced stage, the patient's survival is limited for lack of any effective treatment, at the present time, against androgen-independent tumour development [3]. At this point patient treatment is mostly palliative, aiming merely to reduce bone pain and urinary obstructions. There is thus a need for innovative

therapies based on a better understanding of the mechanisms and molecules responsible for androgen-independent tumour progression. Such new therapies might act by interfering with the proliferation of androgen-independent tumour cells, by restoring the mechanisms of apoptosis within them, by countering the action of survival factors involved in resistance to cell death, by modifying the expression of genes responsible for cell differentiation, or by inhibiting tumour-related angiogenesis.

This review aims to present the mechanisms and molecules that intervene in androgen-independent tumour progression and which thus constitute interesting potential targets for the treatment of cancer that has become refractory to androgen deprivation.

## HORMONE REFRACTORY PROSTATE CANCER

Over 30% of all androgen-independent prostate cancers show uncontrolled amplification and overexpression of their androgen receptors. This suggests that the cancer cell might tend to compensate for the diminished effect of androgens.

In another third of these androgen-independent tumours, the androgen receptor is mutated. Such mutations may cause receptor inactivation, an altered response to androgens, or even activation of the receptor by other steroids or growth factors [4]. "Cross talk" has been demonstrated between the androgen receptor pathway and those stimulated by other factors such as the epidermal growth factor (EGF).

In the remaining third of these cancers, investigators have detected no mutation and no amplification of the receptor. This suggests that other stimulation pathways are used to promote the proliferation and differentiation of cancer cells.

Several growth factors such as EGF, the platelet-derived growth factor (PDGF), the fibroblast growth factor (FGF),

\*Address correspondence to this author at the Institut de Pathologie B23, avenue de l'Hôpital, 3, Université de Liège, 4000 Liège, Belgique; E-mail: jclosset@ulg.ac.be

the insulin-like growth factor I (IGF-I), and transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) have been implicated in the growth of prostate cancer and its progression towards androgen independence [5, 6].

These factors act by binding to membrane receptors having intrinsic tyrosine kinase activity (TKR). The main action of this type of receptor is to stimulate cell proliferation. Activation of these TKRs, either by specific ligands or by mechanisms that no longer depend on binding of a specific ligand, is certainly involved in the progression and development of androgen-independent prostate cancer [7].

Other peptide factors capable of acting on tumour growth include bradykinin, endothelin-1, and the vasointestinal peptide (VIP) [8-10]. Neuroendocrine cells can secrete these factors. Interestingly, it has recently been shown that such cells change their secretion spectrum when deprived of androgen through castration [11]. The peptide factors concerned act via G-protein-coupled receptors (GPCR) [12]. This family of receptors possessing 7 transmembrane segments is abundantly represented in the human body [6], and the prostate expresses many of such receptors. It has been shown that GPCR activation can act on cell proliferation via many mechanisms, and notably by transactivating TKR. This transactivation involves both TKR phosphorylation and activation of the cascade of MAP kinases involved in mitogenesis and survival of prostate cancer cells. GPCR and the corresponding ligands are certainly potential targets for the treatment of androgen-independent tumours.

In the progression of prostate cancer, local factors are probably not alone involved. Systemic factors like the pituitary hormones (growth hormone [GH] and prolactin [Prl]) can also stimulate proliferation and differentiation of cancer cells [15]. Such effects can be direct, via receptors present on the gland, or indirect and mediated by growth factors like IGF-I [16]. It is thus necessary to consider not only the autocrine/paracrine action of the hormones but also the action of their mediators on the development of this type of cancer.

During evolution towards an advanced stage, cancer cells become resistant to androgen deprivation. They no longer die by apoptosis, although they continue to express most of the constituents required to take this pathway [17, 18]. There are many molecular mechanisms that might promote the emergence of this evolutionary advantage, possibly involving inducers or executors of apoptosis, [19] caspase inhibitors, or expression of survival factors interacting directly or indirectly with apoptosis pathways [20, 21].

Lastly, progression of androgen-independent prostate cancer also involves angiogenic factors such as VEGF (vascular endothelial growth factor) or factors produced by the vascular endothelium. Endothelial cells are at the heart of a vast communication network. They secrete many activating substances that directly or indirectly influence tumour growth.

A key to influencing the development of androgen-independent prostate cancer is most certainly to identify this broad spectrum of factors, to determine their roles in the

context of the prostate, and to find ways to promote or counter their effects. This should lead to the development of new therapies.

### MODULATION OF TUMOUR GROWTH BY TKRs

In the adult, most mitogenic signals produced in the prostate act via TKRs. Some 80% of all mitogenic effects are attributable to EGF and FGF [23, 24].

### EGF

Under normal physiological conditions, the prostate abundantly expresses EGF and its receptor in the stroma and epithelium [25], but in prostate tumours, expression of both partners is even higher, and there appear aberrant signalling pathways for this growth factor [26, 27]. When EGF is bound to its receptor, the receptor's tyrosine kinase domain is activated. This leads to a cascade of intracellular events involving the activation of Ras and of the MAP kinases. Activation of these pathways increases cell proliferation, prevents apoptosis, and stimulates cell mobility and tumour adhesion [28, 29] and invasion. On the other hand, stimulation of the EGF receptor pathway allows transactivation of the androgen receptor by phosphorylation [30]. This transactivation favours tumour growth independently of the steroid ligand. EGF and its receptor thus contribute to the autonomous growth of prostatic cells, making this signal transduction pathway an interesting target for new therapies for androgen-independent cancer.

Two possibilities for interfering at the molecular level with EGF signalling have been described: one is to interact with the extracellular part of the receptor; the other is to intervene at the level of the various partners of the transduction pathway.

Several molecules are currently undergoing preclinical trials. A chimeric monoclonal antibody that binds to the extracellular portion of the EGF receptor has notably been used to inhibit the signalling pathway of this growth factor. The antibody developed has been humanised, i.e. certain murine sequences in the Fc portion have been replaced with the corresponding human sequences so as to prevent production of anti-mouse-IgG antibodies in patients. Encouragingly, *in vitro* studies on cell cultures have shown that when used in conjunction with hydroxyflutamide (an anti-androgen), this anti-receptor markedly inhibits the growth of tested cancer cells [31]. Treatments using antisense nucleotides targeting EGF transcripts in combination with anti-EGF-receptors have been found to inhibit the development of prostate cancer and thus also appear therapeutically promising.

### HER-2/NEU Receptors

The receptors HER-2/NEU, HER-3, and HER-4 belong to the EGF receptor family. HER-2/NEU is differentially expressed in normal and cancerous prostates, being expressed by cancerous epithelial cells but not by the healthy epithelium. HER-2/NEU activation causes proliferation of cancer cells and increases their invasive power. The precise function of HER-2/NEU in tumour development has not yet been fully elucidated. It has been suggested that HER-2/NEU



might act as a co-receptor for various growth factors such as EGF and TGF- $\alpha$  [33]. It has also been proposed that activation of HER-2/NEU could take place independently of ligand binding. Such activation would involve homologous dimerisation of HER-2/NEU. This receptor has also been implicated in the progression of androgen-dependent cancers, as a co-activator of the signalling pathway used by androgens. In addition, HER-2/NEU has been shown to activate the androgen receptor via the MAP kinase signalling pathway [34]. In the absence of androgens, HER-2/NEU increases the growth and survival of cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway [35].

Akt transactivates the androgen receptor by binding to it and phosphorylating its residues 213 and 791. This observation provides molecular-level support to the proposed role of HER-2/NEU in the progression of prostatic cancer towards androgen independence. In this context it is worth adding that overexpression and amplification of the HER-2/NEU gene accompany progression of androgen-independent prostate tumours.

A monoclonal antibody against HER-2/NEU (TRASTUZUMAB) [36, 37] has been used successfully in the treatment of breast cancer, whose hormone dependence is well established [38]. Similar treatment should be applicable to prostate cancer, since HER-2/NEU is expressed in over 30% of cases. On the other hand, anti-HER-2/NEU antibodies have also been used to target the action of cellular toxins like Pseudomonas exotoxin A. This toxin has been coupled to fragments of a monovalent antibody against HER-2/NEU, and the resulting toxin-antibody pair has already been used successfully to treat prostate cancer [39].

## FGF

FGF proteins form a nine-member protein family (FGF1 - FGF9). The first two members of this family, initially called acidic FGF and basic FGF, have been the most extensively studied. There exists a well-documented correlation between basic FGF and prostate cancer growth. Basic FGF has been detected in both the stroma and the epithelium of the normal prostate. Vascular endothelial cells like smooth muscle cells and fibroblasts synthesise basic FGF. Generally speaking, basic FGF is an effective stimulator of mesodermal and ectodermal cell proliferation. The FGF proteins are mitogenic for the prostate and support *in vitro* the growth of epithelial prostate cells. In addition, it has been shown that basic FGF is present in greater quantity in hyperplastic tissue [40].

There are four FGF receptors FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, and FGF-R4. Three of them have been detected in the prostate [41]. FGF-R1 is located principally in the stroma, FGF-R2 in the epithelium, and FGF-R3 in both compartments.

As prostate cancer progresses, there occur changes in both the affinity [42] and the cellular localisation of the FGF and FGF-R molecules expressed. Acidic FGF and basic FGF have been implicated in the androgen-independent growth of LNCaP cells [43]. Yet the role of FGF in tumour progression is not yet fully understood. The prevailing opinion is that in the androgen-dependent stages of the tumour, FGFs exert

paracrine action, while at more advanced stages, the cells synthesise FGFs, which can thus exert autocrine action. In addition, because of major angiogenic effects, FGFs and their receptors are certainly interesting targets for researchers aiming to counter tumour growth. Yet because of their very broad spectrum of expression in healthy tissues, therapies involving FGF and its receptors are likely to require techniques for targeting cancer cells.

## PDGF

PDGF is a 30kD protein consisting of two subunits, A and B. The A and B chains are 60% identical and have conserved 8 cysteinyl residues (types HA, BB, and AB have been observed in both healthy and cancer tissues). The PDGF receptor also exists both as a heterodimer of subunits  $\alpha$  and  $\beta$  and as  $\alpha\alpha$  and  $\beta\beta$  homodimers.

The  $\alpha$  receptor binds all PDGF isoforms, whereas the  $\beta$  receptor preferentially binds BB homodimers. The different isoforms of PDGF and its receptor are present in both healthy and cancerous prostate tissue and in metastases [44].

Immunohistochemical studies of bone biopsies from prostate cancer patients have shown PDGF to be confined to the tumour cells and not to be expressed by the stroma. This confirms the PDGF receptor as a potential target for treatment of prostate cancer at various stages of its progression. In this context Buchdunger *et al.* have shown that an Abl tyrosine kinase inhibitor inhibits the transduction pathway mediated by the PDGF receptor [45]. This type of inhibitor might thus find an application in the treatment of advanced-stage prostate cancer, but to date, there is no publication mentioning a clinical use of this inhibitor.

## MODULATION OF TUMOUR GROWTH BY GPCRs

Receptors with 7 transmembrane segments constitute the largest receptor family in the mammalian genome. Upon binding of their specific ligands, they undergo a conformational change enabling them to interact with a membrane protein complex consisting of three different G proteins [G  $\alpha\beta\gamma$ ]. When GDP is replaced with GTP, the heterotrimer dissociates and its proteins initiate different intracellular cascades that mediate biological responses to many stimuli. Many systemic factors such as pituitary gonadotrophins, and particularly LH, act on the prostate via this type of receptors [46, 47].

In the prostate, lysophosphatidic acid [48], bradykinin, and endothelin act via GPCRs present on endothelial cells. These various ligands can be produced by prostatic epithelial cells [49, 47]. Some GPCRs are differentially regulated in prostate cancer. This is the case of endothelin receptors, which have been shown to increase in number during androgen-independent prostate cancer [50].

It is accepted that some GPCRs and their ligands promote accelerated growth and enhanced survival of cancer cells. Activation of the survival programme seems to involve the PKB/Akt pathway, as is also the case of other activation pathways. On the other hand, GPCRs act on cell proliferation by transactivating receptors with tyrosine kinase activity and/or via activation of the extracellular signal regulated kinase [ERK]. ERK plays a central role in controlling

GPCR-dependent cell proliferation, in the case of many different GPCRs. It acts by inducing expression of early-response genes and by controlling cell-cycle regulators like cyclins and protein p27<sup>kip</sup>.

Given their wide distribution in healthy tissues and their involvement in controlling capital biological functions, GPCRs cannot be interesting targets unless tissue-specific inhibitors of receptor activation or of key transduction-pathway enzymes are developed. In this context, sufficiently specific low-molecular-weight inhibitors of ERK kinase have been synthesised. Because of their undeniable therapeutic interest, these molecules have recently been tested in preliminary clinical trials [51].

## PITUITARY HORMONES

It has long been known that prostate regression is more pronounced and rapid after hypophysectomy combined with castration than after castration alone. It is now clearly demonstrated that some pituitary hormones can act directly on the prostate in an androgen-independent manner. Transgenic models have been used to determine the role of these hormones on normal prostatic growth, and recent studies have shown the role of certain pituitary hormones in the development of prostatic pathologies.

Special attention has focused on prolactin (Prl). This hormone can affect the proliferation and differentiation of prostatic cells by activating specific receptors expressed in the gland [52, 53]. The prostates of transgenic Prl-overexpressing mice are about 20 times heavier than those of normal animals [54], an effect attributed both to the action of Prl on Leydigian steroidogenesis and to direct effects on prostatic cells. The action of Prl on gene expression in the prostate is mediated by STAT activation [55].

Prl is also produced by prostatic cells themselves and may thus exert autocrine/paracrine effects on the gland [52]. In this context, it has been shown that Prl acts as a survival factor of epithelial cells in culture [56]. In the tumour cell lines PC-3, DU145, and LNCaP, prolactin stimulates cell proliferation upon binding to specific receptors [57].

The pituitary produces a natural prolactin antagonist, a form of the hormone that is phosphorylated on serine 179 [58]. Recombinant technology has been used to produce a prolactin that is mutated at this residue (S179D) [59]. This form has been shown to inhibit tumour growth and to reduce the occurrence of tumours in nude mice receiving Du145 cell grafts [60]. The same Prl antagonist would also appear to inhibit the growth of normal mammary cells in rats, while exerting on these cells differentiating effects characterised by increased  $\beta$  casein expression. In the prostate, Prl and its S179D antagonist appear to exert opposite effects on the expression of certain prostatic proteins such as probasin and prostatein [61]. Given its particular inhibitory action on the prostate, the S179D antagonist might constitute an interesting therapeutic option.

In transgenic mice overexpressing bovine GH, a major increase in prostatic growth is observed. Interestingly, bovine GH has no prolactin-like activity in mice. Moreover, GH receptors have been detected in the rodent prostate.

These receptors mediate effects that are partially androgen-independent [62]. In man, it has been shown that in young acromegaly patients whose condition is not treated, the prostate is overdeveloped as compared to healthy subjects [63]. GH receptors have also been detected in prostate tumour tissues, and they have been shown to be overexpressed in certain cell lines derived from prostate tumours as compared to normal prostatic cells. This implies that GH might act directly, or indirectly via IGF-I, on the growth of prostate tumours. This hypothesis is supported by the work of Jungwirth *et al.* [64], showing inhibitory effects of a somatostatin analogue *in vivo* on xenografts from prostate tumours.

## APOPTOSIS PATHWAYS AS TARGETS IN THE TREATMENT OF PROSTATE CANCER

During progression of androgen-independent prostate cancer, resistance to antiandrogen treatments is often accompanied by an inability of the tumour cells to die by apoptosis. This loss of apoptosis occurs in cells that have conserved most of the molecular machinery required for programmed cell death. It is thus important to identify the main mechanisms involved in androgen-deprivation-induced apoptosis of prostatic cells and the deregulations contributing to the appearance of resistance to programmed death. Such an effort could have important implications for the treatment of androgen-independent prostate cancer.

Androgen-deprivation-triggered apoptosis of prostate cells is both fast and spectacular. The rat prostate loses 80% of its weight over the eight-day period following castration [65]. Two mechanisms have been identified to date in androgen-deprivation-triggered apoptosis. One involves TGF $\beta$ -1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) [66] and the other, the Fas ligand [67].

### TGF $\beta$

TGF $\beta$ -1 is produced by the fibromuscular stroma of the prostate after castration. It acts via its type-II receptor expressed by epithelial cells, inducing apoptosis of these cells via mechanisms that have only been partially elucidated [68].

In cell lines it has been shown that resistance to apoptosis sometimes results from the loss of receptor TGF-RII. Overexpression of this receptor restores the sensitivity of cells to TGF $\beta$ -1 and suppresses their tumorigenicity by inducing apoptosis [69]. It has recently been shown that in the LNCaP cell line, TGF $\beta$ -1 induces expression of Bcl-2 and an increase in Bax, cyclins, and p27<sup>kip</sup> [69, 70].

### Fas Ligand

Castration-triggered prostate regression also involves Fas-Fas ligand interactions, as shown in animal studies [67, 71]. Immunohistochemical studies, moreover, have shown overexpression of the Fas receptor by epithelial cells in androgen-deprived animals, and in IPR  $-/-$  mice having lost a functional Fas, there is no prostate regression after castration [72]. Interestingly, Fas-mediated apoptosis is diminished in biopsies of prostatic metastases and cell lines issued from metastases [73].

The possibility of increasing the sensitivity of cancer cells to Fas-mediated apoptosis has been investigated [74-75]. Immunotherapy involving Fas has also been proposed as a therapeutic option in the treatment of prostate cancer refractory to androgens. Yet although prostate cancers are theoretically favourable because of the tissue specificity of PSA and PSMA, most of them have proved non-immunoreactive. It has been suggested that these cancers might have developed resistance to Fas-induced cell death. The hypothesis has been formulated that Fas-mediated apoptosis is strongly diminished during the development of metastases, but that responsiveness is maintained in non-metastasising cancers. Gene therapy of prostate cancer has been attempted with adenoviral vectors [76]. Such an approach might prove useful as an adjuvant to immunotherapy [77].

### Tumour Necrosis Factor $\alpha$

Like the Fas ligand, TNF $\alpha$  mediates apoptosis of prostatic epithelial cells via its type-1 receptor, but the involvement of TNF  $\alpha$  and its receptor in castration-induced prostate regression and in prostate cancer progression towards androgen independence is less clearly established.

TNF $\alpha$  acts by recruiting a TRADD death-domain protein. This protein interacts with FADD to activate the common pathway leading to apoptosis initiated by Fas and TNF $\alpha$ . Although both of these factors are inducers of apoptosis in prostate cancer cells, their therapeutic interest is limited because of unacceptable systemic toxicity: administration of TNF $\alpha$  induces a severe inflammatory response, whereas the Fas ligand has pronounced hepatotoxicity [78].

For these reasons, interest focused very soon after its discovery on the TRAIL protein (Tumour necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand), an analogue of TNF  $\alpha$ . TRAIL is a 291-amino-acid transmembrane protein sharing 28% homology with the Fas ligand. TRAIL acts by binding to at least five types of receptors (DR4, DR5, DeR1, DeR2, and FR1) [79, 80]. Binding of TRAIL to DR4 or DR5 induces trimerisation of the receptor, leading to caspase activation and apoptosis. The 'decoy receptors' DeR1 and DeR2 have truncated intracellular domains that do not allow transduction of the death signal. TRAIL induces apoptosis of many transformed cells, and particularly prostate cancer cells, while apparently sparing normal cells in the various tissues. Unlike Fas and TNF $\alpha$ , TRAIL displays no systemic cytotoxicity. It induces apoptosis of androgen-independent prostate cancer cells by activating the caspase pathway in a TNF $\alpha$ -independent manner [78].

From these observations has stemmed the opinion that TRAIL could be an effective anticancer agent that is non-toxic for the organism's healthy cells. This opinion, however, has recently been corrected by Nesterov *et al.* [81]. These authors have shown that TRAIL also induces apoptosis of normal prostatic epithelial cells, which possess too few DeR1 and DeR2 receptors capable of protecting them from TRAIL-triggered apoptosis by serving as decoys for the ligand. In addition, certain prostate tumour cells have been shown to resist TRAIL-triggered apoptosis. This resistance might result from factors such as XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) [82]. Yet such proteins have a rather short

intracellular half-life, as suggested by the efficacy of treatment combining TRAIL with actinomycin D [83].

### CELL SURVIVAL FACTORS

It is currently accepted that permanent androgen deprivation through chemical or surgical castration favours within a prostate tumour the emergence of apoptosis-resistant cell phenotypes with many selective advantages at the level of cell differentiation and proliferation. These cell phenotypes are characterised by the expression of genes involved in a survival program affecting androgen-deprived prostate cells. Several of the corresponding gene products have been identified. They constitute as many potential targets for fighting the progression of androgen-independent prostate cancer. The most important of these factors are Bcl-2, Bcl-XL, IGF-BP5, IGF-BP1, clusterin, PARM-1, and the IAPs [84-88].

#### Bcl-2 and Bcl-XL

The Bcl-2 and Bcl-XL proteins are regulators of apoptosis in many tissues. They belong to a family of proteins displaying both apoptosis-favouring and apoptosis-counteracting properties. The accepted view seems to be that the balance between agonists and antagonists is what determines how cells respond to an apoptosis signal [89]. Bcl-2 and other members of its family are involved in the acquisition of androgen-independence by prostate cancer cells, and they participate in the emergence of a multiresistance phenotype within the tumour [90].

Because of their major role and therapeutic interest, Bcl-2 and its family members are certainly among the most extensively studied survival factors. Therapeutic strategies have been developed in which antisense Bcl-2 mRNA is used alone or in association with different drugs. For a comprehensive review on this subject, see Newton and Strasser [91].

#### Clusterin

Clusterin or TRPM-2 (Testosterone repressed message 2) was isolated over fifteen years ago from rete testis fluid [92]. It is widely distributed throughout the organism, where it seems to have multiple functions. Clusterin is the protein most highly overexpressed during castration-induced prostatic apoptosis, but until recently, there subsisted considerable doubt as to the pro-apoptotic role of clusterin in the prostate. The current view is that clusterin is likely to act as a chaperone, stabilising proteins subject to various cellular stresses such as apoptosis or heat shock [93]. Clusterin may also be involved in cell survival, favouring the progression of prostatic cancer towards androgen-independence [94-95]. When the androgen-sensitive cell line LNCaP is stably transformed to clusterin expression and then grafted onto nude mice, tumour development in the animals post-castration is much more pronounced than that observed with the wild-type LNCaP cell line [96]. Thus, clusterin expression by the tumour does favour tumour progression towards androgen independence. In the same context, it was further shown that when androgen-dependent Shionogi tumours are grafted onto mice, the formation of clusterin RNA/DNA heteroduplexes in the tumour promotes faster and more intense tumour regression than in mice infected

with the initial tumour. In addition, it takes much longer for androgen-resistant clones to appear in the antisense-treated tumour than in the descent of control cells [97].

At least two forms of clusterin have been identified: a presumably pro-apoptotic 49kDa nuclear form resulting from a frame shift [98] and a native form that would appear to be involved in cell survival. How the transcription mechanisms involved in producing the shorter and the longer form are regulated is not known. Therapeutically it would be most interesting to induce expression of the shorter protein within prostatic tumours.

### PARM-1 (Prostatic Androgen Repressed Message 1)

The PARM-1 factor has been newly cloned from the same model of androgen-deprivation-induced prostate regression. Like clusterin, PARM-1 seems to be involved in the survival of prostatic cells that are resisting or trying to resist androgen deprivation. Recent results have supplied interesting information regarding the molecular mechanism of prostatic cell survival. MatLyLu cells inducibly overexpressing PARM-1 show increased telomerase activity and TLP-1 (Telomerase Protein component 1) expression [88]. In similar experiments, interestingly, clusterin also stimulates telomerase activity, suggesting that these two factors might act via a common mechanism [H. Ammar, personal communication].

### Apoptosis Inhibitors (IAPs)

IAPs have recently been identified as a group of antiapoptotic proteins interacting directly with caspases, the central effectors of the apoptosis pathways [82]. Seven IAP family members have been identified to date (NAIP, CIAP-1, CIAP-2, X-IAP, surviving [99], APPOLON [100], and livin [101]). Their presence in prostate cancer cells seems to correlate with the emergence of androgen-independent phenotypes in prostate tumours. Their exact role remains to be established. It has recently been shown [102] that IAPs are expressed in all three of the cell lines most used in this field of research: LNCaP, DU145, and PC-3.

## NON-ANDROGENIC STEROID HORMONES

### Vitamin D

Vitamin D is a steroid hormone that regulates homeostasis of the calcium concentration through action on the kidneys, bones, and intestinal tract [103]. It is synthesised in the skin from 7-dehydrocholesterol upon action of UV radiation. The intermediate is converted in the liver to 25-dehydroxycalciferol and then hydroxylated at position 1, forming 1- $\alpha$ -25 dehydroxycholecalciferol (calcitriol), the active form of the hormone. In addition to its action on mineral metabolism, calcitriol controls the proliferation of many cell types.

Epidemiological data suggest that vitamin D reduces the cancer risk in man, and particularly the risk of prostate cancer. High vitamin D concentrations are associated with a diet rich in fish oil and with prolonged exposure to UV light. These factors reduce the risk of prostate cancer in man [104, 105]. On the other hand, low vitamin D levels are observed in the populations of North America and Europe, where UV

exposure is lower. In these populations, the risk of developing prostate cancer is high.

Vitamin D acts by binding to an intracellular receptor belonging to the steroid hormone receptor family. This receptor acts as a transcription factor binding to regulatory sequences (Vit. D responsive elements). Phosphorylations of the receptor are involved in its regulatory action on target genes. In parallel, the proliferation-enhancing action of vitamin D seems to involve protein kinase C and to modulate phospholipid metabolism [106-107].

In the context of prostate cancer, it has been shown that calcitriol exerts antiproliferative effects on various human cell lines [108] and on the androgen-sensitive cell line LNCaP [109]. In these models, calcitriol stops cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and modulates p21<sup>waf 1/cip 1</sup> and p27<sup>kip</sup>. It also increases the Bax/Bcl-2 ratio, decreases MAP kinase (mitogen activated protein kinase) phosphorylation [110, 111], and stimulates expression of apoptosis markers. Calcitriol has been used in a phase II preclinical study to treat androgen-independent prostate cancer [112] and in another study in association with dexamethasone treatment [113]. In these treatments applied to 35 patients, 80% of the patients showed a delayed rise in the PSA level and 34% showed stabilisation of the disease and a more than 50% decrease in the PSA level. These results suggest that calcitriol could be an interesting therapeutic approach for androgen-independent prostate cancer, probably in association with other agents.

### Oestrogens

As mentioned above, the risk of prostate cancer can be higher or lower according to the geographic area. It has been hypothesised that these geographic differences notably depend on differences in the diets of the populations concerned [114]. In particular, it has been suggested that the low level of prostate cancer in Asian populations is due to a diet rich in phyto-oestrogens. In Asia, soy is the main source of phyto-oestrogens. It contains isoflavones and flavones like genistein and apigenin. These phyto-oestrogens can be viewed as partial agonists of the  $\alpha$  and  $\beta$  oestrogen receptors, and they act as protectors against prostate cancer. The  $\alpha$  and  $\beta$  oestrogen receptors are widely distributed throughout the organism and are differentially expressed at different periods of life.

The foetal rodent prostate is particularly sensitive to oestrogens. When a rat is treated with large doses of oestrogens during neonatal life, dysplasia and hyperplasia of the gland are observed in the adult, with an altered concentration of  $\beta$  receptors in the gland [115]. In man, circulating levels of oestrogens increase with age. This rise is due to increased prostatic or peripheral aromatisation. The  $\alpha$  receptor is mainly stromal whereas the  $\beta$  receptor is located in the prostatic epithelial cells. Because of their preferential localisations, the  $\alpha$  receptor has been implicated more in the appearance of benign hyperplasia, and the  $\beta$  receptor more in prostate cancer. Yet the respective roles of these two receptors in prostatic pathologies are not yet clearly understood, as shown by results obtained with knock-out mice [116].

In the context of prostate cancer therapy, it is important both to measure expression of these two types of receptors during tumour progression and to study how drugs with oestrogenic activity affect them. Tamoxifen and genistein appear to be agonists of the  $\alpha$  receptor but to behave as antagonists of the  $\beta$  receptor [117]. On the other hand it is worth mentioning that prostate cancer cells may express mutated androgen receptors capable of binding oestrogens. This has notably been observed with androgen-sensitive LNCaP cells [118]. Yet it seems more likely that oestrogens act via oestrogen and androgen receptor co-activators like ARA 70 [119]. Another way oestrogens might act on the development of prostate tumours is by favouring tumour angiogenesis. In keeping with this view, genistein has been shown to inhibit tumour neovascularisation. By what mechanism? This has not yet been elucidated, but oestrogens have been shown to stimulate VEGF expression, notably in endometriotic lesions, and thus favour tumour development [120].

Whatever the mechanism of action of oestrogens, it remains true that antioestrogens might be useful in the treatment of prostate cancer. Tamoxifen, with its antagonistic properties in the context of breast cancer, might also be used to fight prostate cancer. Tamoxifen seems to act by restoring the missing E-Cadherin function of tumour cells and suppressing their invasive character [121]. Such effects are also observed with Tangeretin, a methoxyflavone isolated from lemon, whose *in vitro* effects on tumours are promising [122].

Another anti-oestrogenic option is the use of Mepartricin, a polyene favouring faecal elimination of oestrogens and thus significantly reducing the plasma level of  $17\beta$  oestradiol. Mepartricin seems promising in the treatment of benign hyperplasia [123].

## CONCLUSION

Progression of prostate cancer towards stages that are refractory to anti-androgen treatment is an evolutive process. At molecular level it includes several events whose sequence is not yet clear. Many genes and intracellular pathways are involved in tumour progression. Their expression or inhibition confers to cancer cells a selective advantage over healthy cells, thus promoting a more or less rapid development of the tumour.

The identification of new targets for therapy is difficult because different intracellular signalling pathways are often interconnected and because local or systemic factors can stimulate these pathways. Furthermore, tumour cells respond differently to these factors in the course of their evolution.

Despite the complexity of the mechanism of tumour progression, several new potentially active agents have been identified. Some of these are described in this review.

Exploring the effects of active agents requires an understanding of what goes on during tumour progression. Such knowledge is needed to determine the optimal timing of drug administration. Stopping or slowing down tumour progression remains the prime objective of any anti-tumour therapy, but it seems illusory, given the complexity of the

mechanism, to hope to achieve this by inhibiting a single factor.

The therapeutic potential of different combinations of new agents should be tested. The cocktails would target different facets of this complex process involving cell proliferation, survival, apoptosis, and angiogenesis.

The different cocktails should also be assessed in the general context of anti-androgen therapy of prostate cancer, which causes massive death of cancer cells but which can also favour the emergence within the tumour of androgen-independent clones.

The development of new systemic anticancer therapies will depend on integrating these different approaches and exploiting results from different disciplines.

## ABBREVIATIONS

Abl	=	Abelson
ARA	=	Androgen receptor associated protein
DeR	=	Decoy receptor
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EGF	=	Epidermal growth factor
Erk	=	Extracellular regulated kinase
FADD	=	Fas associated death domain
Fas	=	CD95
FGF	=	Fibroblast growth factor
FGF-R	=	Fibroblast growth factor receptor
GDP	=	Guanosine diphosphate
GH	=	Growth hormone
GPCR	=	G protein-coupled receptor
GTP	=	Guanosine triphosphate
IAP	=	Inhibitor of apoptosis
IGF-BP	=	Insulin-like growth factor binding protein
IGF-I	=	Insulin-like growth factor-I
LH	=	Luteinizing hormone
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
PARM-1	=	Prostatic androgen repressed message 1
PDGF	=	Platelet-derived growth factor
PI-3 K	=	Phosphatidylinositol-3 kinase
PKB	=	Protein kinase B
Prl	=	Prolactin
PSA	=	Prostate specific antigen
PSMA	=	Prostate specific membrane antigen
RNA	=	Ribonucleic acid
STAT	=	Signal transducer and activator of transcription
TGF	=	Transforming growth factor
TGF-R	=	Transforming growth factor receptor

TKR = Tyrosine kinase receptor  
 TLP-1 = Telomerase Protein component 1  
 TNF = Tumor necrosis factor  
 TRADD = TNF receptor 1-associated death domain  
 TRAIL = Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand  
 TRPM-2 = Testosterone repressed prostate message 2  
 VEGF = Vascular endothelial growth factor  
 VIP = Very important peptide

## REFERENCES

References 124-126 are related articles recently published in *Current Pharmaceutical Design*.

- [1] Krieg M, Nass R, Tunn S. Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(2): 375-81.
- [2] Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51(1): 15-36.
- [3] Wingo PA, Ries LA, Parker SL, Heath CW, Jr. Long-term cancer patient survival in the united states. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(4): 271-82.
- [4] Gnanapragasam VJ, Robson CN, Leung HY, Neal DE. Androgen receptor signalling in the prostate. *BJU Int* 2000; 86(9): 1001-13.
- [5] Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Hittmair A, Zhang J, et al. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* 1996; 28(6): 392-405.
- [6] Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000; 100(1): 113-27.
- [7] Djakiew D. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate* 2000; 42(2): 150-60.
- [8] Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA, et al. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* 1995; 1(9): 944-9.
- [9] Pirtskhalaishvili G, Nelson JB. Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate* 2000; 44(1): 77-87.
- [10] Barki-Harrington L, Daaka Y. Bradykinin induced mitogenesis of androgen independent prostate cancer cells. *J Urol* 2001; 165(6 Pt 1): 2121-5.
- [11] Ismail AH, Landry F, Aprikian AG, Chevalier S. Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *Prostate* 2002; 51(2): 117-25.
- [12] van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via g protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 1996; 17(6): 698-714.
- [13] Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by g-protein-coupled receptors. *Nature* 1996; 379(6565): 557-60.
- [14] Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, et al. EGF receptor transactivation by g-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proh-EGF. *Nature* 1999; 402(6764): 884-8.
- [15] Reiter E, Hennuy B, Bruyninx M, Cornet A, Klug M, McNamara M, et al. Effects of pituitary hormones on the prostate. *Prostate* 1999; 38(2): 159-65.
- [16] Topping N, Vinter-Jensen L, Pedersen SB, Sorensen FB, Flyvbjerg A, Nexø E. Systemic administration of insulin-like growth factor I (IGF-I) causes growth of the rat prostate. *J Urol* 1997; 158(1): 222-7.
- [17] Gschwend JE. [apoptosis--principles and importance of programmed cell death for prostatic carcinoma]. *Urologe A* 1996; 35(5): 390-9.
- [18] Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999; 187(1): 127-37.
- [19] Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 533-73.
- [20] Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobes. *Endocrinology* 2002; 143(5): 1825-32.
- [21] Boise LH, Thompson CB. Bcl-XL can inhibit apoptosis in cells that have undergone fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8): 3759-64.
- [22] di Sant'Agnes PA. Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 287-296.
- [23] Steiner MS. Role of peptide growth factors in the prostate: A review. *Urology* 1993; 42(1): 99-110.
- [24] Jacobs SC, Story MT, Sasse J, Lawson RK. Characterization of growth factors derived from the rat ventral prostate. *J Urol* 1988; 139(5): 1106-10.
- [25] Kim HG, Kassis J, Souto JC, Turner T, Wells A. Egf receptor signaling in prostate morphogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 1999; 14(4): 1175-82.
- [26] Green S, Furr B. Prospects for the treatment of endocrine-responsive tumours. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6(3): 349-71.
- [27] Sherwood ER, Lee C. Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate. *World J Urol* 1995; 13(5): 290-6.
- [28] Barton J, Blackledge G, Wakeling A. Growth factors and their receptors: New targets for prostate cancer therapy. *Urology* 2001; 58(2 Suppl 1): 114-22.
- [29] Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R, Taneja S, Pang S, de Kernion JB, et al. In vitro modulation of tumour progression associated properties of hormone refractory prostate carcinoma cell lines by cytokines. *Cancer* 1996; 77(9): 1862-72.
- [30] Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumour cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994; 54(20): 5474-8.
- [31] Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Androgen and epidermal growth factor down-regulate cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 and costimulate proliferation of mda pca 2a and mda pca 2b prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8): 2171-7.
- [32] Reese DM, Small EJ, Magrane G, Waldman FM, Chew K, Sudilovsky D. Her2 protein expression and gene amplification in androgen-independent prostate cancer. *Am J Clin Pathol* 2001; 116(2): 234-9.
- [33] Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, et al. The erbB-2/her2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(9): 4995-5000.
- [34] Yeh S, Lin HK, Kang HY, Thin TH, Lin MF, Chang C. From her2/neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: A novel pathway by induction of androgen target genes through map kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(10): 5458-63.
- [35] Wen Y, Hu MC, Makino K, Spohn B, Bartholomeusz G, Yan DH, et al. Her-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the akt pathway. *Cancer Res* 2000; 60(24): 6841-5.
- [36] Mellon K, Thompson S, Charlton RG, Marsh C, Robinson M, Lane DP, et al. P53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J Urol* 1992; 147(2): 496-9.
- [37] Kuhn EJ, Kurnot RA, Sesterhenn IA, Chang EH, Moul JW. Expression of the c-erbB-2 (her-2/neu) oncoprotein in human prostatic carcinoma. *J Urol* 1993; 150(5 Pt 1): 1427-33.
- [38] Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-her2 monoclonal antibody in women who have her2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17(9): 2639-48.
- [39] King CR, Kasprzyk PG, Fischer PH, Bird RE, Turner NA. Preclinical testing of an anti-erbB-2 recombinant toxin. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 38(1): 19-25.
- [40] Hellawell GO, Brewster SF. Growth factors and their receptors in prostatic cancer. *BJU. International* 2002; 89: 230-40.
- [41] Itman M, Mansukhani A. Expression of fibroblast growth factors (fgfs) and fgf receptors in human prostate. *J Urol* 1997; 157(1): 351-6.
- [42] Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, McKeehan WL. Exon switching and activation of stromal and embryonic

- fibroblast growth factor (fgf)-fgf receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* 1993; 13(8): 4513-22.
- [43] Hierowski MT, McDonald MW, Dunn L, Sullivan JW. The partial dependency of human prostatic growth factor on steroid hormones in stimulating thymidine incorporation into DNA. *J Urol* 1987; 138(4): 909-12.
- [44] Chott A, Sun Z, Morganstern D, Pan J, Li T, Susani M, et al. Tyrosine kinases expressed in vivo by human prostate cancer bone marrow metastases and loss of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Am J Pathol* 1999; 155(4): 1271-9.
- [45] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor sti571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(1): 139-45.
- [46] Reiter E, McNamara M, Closset J, Hennen G. Expression and functionality of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in the rat prostate. *Endocrinology* 1995; 136(3): 917-23.
- [47] Ben-Josef E, Yang SY, Ji TH, Bidart JM, Garde SV, Chopra DP, et al. Hormone-refractory prostate cancer cells express functional follicle-stimulating hormone receptor (fshr). *J Urol* 1999; 161(3): 970-6.
- [48] Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, et al. Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol* 2000; 57(4): 753-9.
- [49] Ray GV, Barki-Harrington L, Kue PF, Daaka Y. Guanosine phosphate binding protein coupled receptors in prostate cancer: a review. *J Urol* 2002; 167: 1458-63.
- [50] Nelson JB, Chan-Tack K, Hedicon, SP, Magnuson SR, Oppenorth TJ, Bova GS, et al. Endothelin 1 production and decrease endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 663-68.
- [51] Gibbs JB. Anticancer drug targets: Growth factors and growth factor signaling. *J Clin Invest* 2000; 105(1): 9-13.
- [52] Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest* 1997; 99(4): 618-27.
- [53] Reiter E, Lardinois S, Klug M, Sente B, Hennuy B, Bruyninx M, et al. Androgen-independent effects of prolactin on the different lobes of the immature rat prostate. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 112(1): 113-22.
- [54] Wennbo H, Kindblom J, Isaksson OG, Tornell J. Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology* 1997; 138(10): 4410-5.
- [55] Hair WM, Gubbay O, Jabbour HN, Lincoln GA. Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function. *Mol Hum Reprod* 2002 Jul; 8(7): 606-11.
- [56] Ahonen TJ, Harkonen PL, Laine J, Rui H, Martikainen PM, Nevalainen MT. Prolactin is a survival factor for androgen-deprived rat dorsal and lateral prostate epithelium in organ culture. *Endocrinology* 1999; 140(11): 5412-21.
- [57] Janssen T, Darro F, Petein M, Raviv G, Pasteels JL, Kiss R, et al. In vitro characterization of prolactin-induced effects on proliferation in the neoplastic Incap, du145, and pc3 models of the human prostate. *Cancer* 1996; 77(1): 144-9.
- [58] Sinha YN. Structural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16(3): 354-69.
- [59] Chen TJ, Kuo CB, Tsai KF, Liu JW, Chen DY, Walker AM. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. *Endocrinology* 1998; 139(2): 609-16.
- [60] Xu X, Kreye E, Kuo CB, Walker AM. A molecular mimic of phosphorylated prolactin markedly reduced tumour incidence and size when DU145 human prostate cancer cells were grown in nude mice. *Cancer Res* 2001; 61(16): 6098-104.
- [61] Xu X, Wu W, Williams V, Khong A, Chen YH, Deng C, et al. Opposite effects of unmodified prolactin and a molecular mimic of phosphorylated prolactin on morphology and the expression of prostate specific genes in the normal rat prostate. *Prostate* 2003; 54(1): 25-33.
- [62] Reiter E, Kecha O, Hennuy B, Lardinois S, Klug M, Bruyninx M, et al. Growth hormone directly affects the function of the different lobes of the rat prostate. *Endocrinology* 1995; 136(8): 3338-45.
- [63] Colao A, Marzullo P, Ferone D, Spiezia S, Cerbone G, Marino V, et al. Prostatic hyperplasia: an unknown feature of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3): 775-9.
- [64] Jungwirth A, Schally AV, Pinski J, Halmos G, Groot K, Armatas P, et al. Inhibition of in vivo proliferation of androgen-independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Br J Cancer* 1997; 75(11): 1585-92.
- [65] Isaacs JT, Furuya Y, Berges R. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. *Semin Cancer Biol* 1994; 5(5): 391-400.
- [66] Martikainen P, Kyprianou N, Isaacs JT. Effect of transforming growth factor-beta 1 on proliferation and death of rat prostatic cells. *Endocrinology* 1990; 127(6): 2963-8.
- [67] de la Taille A, Chen MW, Shabsigh A, Bagiella E, Kiss A, Buttyan R. Fas antigen/cd-95 upregulation and activation during castration-induced regression of the rat ventral prostate gland. *Prostate* 1999; 40(2): 89-96.
- [68] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381): 1305-8.
- [69] Guo Y, Kyprianou N. Overexpression of transforming growth factor TGF-beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ* 1998; 9(2): 185-93.
- [70] Guo Y, Kyprianou N. Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59(6): 1366-71.
- [71] Stattin P, Westin P, Damber JE, Bergh A. Short-term cellular effects induced by castration therapy in relation to clinical outcome in prostate cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(4): 670-5.
- [72] Suzuki T, Tahara H, Narula S, Moore KW, Robbins PD, Lotze MT. Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local energy to allogeneic and syngeneic tumours. *J Exp Med* 1995; 182(2): 477-86.
- [73] Hedlund TE, Duke RC, Schleicher MS, Miller GJ. Fas-mediated apoptosis in seven human prostate cancer cell lines: Correlation with tumour stage. *Prostate* 1998; 36(2): 92-101.
- [74] Costa-Pereira AP, Cotter TG. Camptothecin sensitizes androgen-independent prostate cancer cells to anti-fas-induced apoptosis. *Br J Cancer* 1999; 80(3-4): 371-8.
- [75] Uslu R, Borsellino N, Frost P, Garban H, Ng CP, Mizutani Y, et al. Chemosensitization of human prostate carcinoma cell lines to anti-fas-mediated cytotoxicity and apoptosis. *Clin Cancer Res* 1997; 3(6): 963-72.
- [76] Hyer ML, Sudarshan S, Schwartz DA, Hannun Y, Dong JY, Norris JS. Quantification and characterization of the bystander effect in prostate cancer cells following adenovirus-mediated FasL expression. *Cancer Gene Ther* 2003; 10(4): 330-9.
- [77] Frost P, Ng CP, Belledgrun A, Bonavida B. Immunosensitization of prostate carcinoma cell lines for lymphocytes (ctl, til, lak)-mediated apoptosis via the fas-fas-ligand pathway of cytotoxicity. *Cell Immunol* 1997; 180(1): 70-83.
- [78] Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumouricidal activity of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999; 5(2): 157-63.
- [79] Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, et al. Trailr-2: A novel apoptosis-mediating receptor for trail. *EMBO J* 1997; 16(17): 5386-97.
- [80] Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the tnfr family, and dr4 induce fadd-dependent apoptosis and activate the nf-kappab pathway. *Immunity* 1997; 7(6): 821-30.
- [81] Nesterov A, Ivashchenko Y, Kraft AS. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21(7): 1135-40.
- [82] Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995; 83(7): 1253-62.
- [83] Ng CP, Zisman A, Bonavida B. Synergy is achieved by complementation with Apo2l/TRAIL and actinomycin D in Apo2l/TRAIL-mediated apoptosis of prostate cancer cells: Role of xiap in resistance. *Prostate* 2002; 53(4): 286-99.
- [84] Newton K, Strasser A. The bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8(1): 68-75.

- [85] Lee C, Sensibar JA. Proteins of the rat prostate. II. Synthesis of new proteins in the ventral lobe during castration-induced regression. *J Urol* 1987; 138(4): 903-8.
- [86] Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, et al. Prevention of cell death induced by tumour necrosis factor  $\alpha$  in LNCaP cells by overexpression of sulphated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 1995; 55: 2431-2437.
- [87] Cornet A, Reiter E, Bruyninx M, Nguyen VH, Hennuy B, Hennen G, et al. Prostatic androgen repressed message-1 (PARM-1) may play a role in prostatic cell immortalisation. *Prostate* 2003; 56(3): 220-30.
- [88] Bruyninx M, Hennuy B, Cornet A, Houssa P, Daukandt M, Reiter E, et al. A novel gene overexpressed in the prostate of castrated rats: Hormonal regulation, relationship to apoptosis and to acquired prostatic cell androgen independence. *Endocrinology* 1999; 140(10): 4789-99.
- [89] Perlman H, Zhang X, Chen MW, Walsh K, Buttyan R. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6(1): 48-54.
- [90] Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabai A, Sauvageot J, Song K, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-x, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148(5): 1567-76.
- [91] Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8(1): 68-75.
- [92] Blaschuk OO, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in Ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 1983; 258(12): 7714-20.
- [93] Wilson MR, Easterbrook-Smith SB. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(3): 95-8.
- [94] Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, et al. Prevention of cell death induced by tumour necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 1995; 55(11): 2431-7.
- [95] Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res* 2000; 60(9): 2547-54.
- [96] Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the anti-apoptotic gene testosterone repressed message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer* 2000; 60(9): 2547-54.
- [97] Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60(1): 170-6.
- [98] Reddy KB, Jin G, Karode MC, Harmony JA, Howe PH. Transforming growth factor beta (TGF  $\beta$ )-induced nuclear localization of apolipoprotein j/clusterin in epithelial cells. *Biochemistry* 1996; 35(19): 6157-63.
- [99] LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (iaps) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17(25): 3247-59.
- [100] Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. A human iap-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264(3): 847-54.
- [101] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276(5): 3238-46.
- [102] McEleny KR, Watson RW, Coffey RN, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM. Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines. *Prostate* 2002; 51(2): 133-40.
- [103] Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin d endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320(15): 980-91.
- [104] Corder EH, Guess HA, Hulka BS, Friedman GD, Sadler M, Vollmer RT, et al. Vitamin d and prostate cancer: A prediagnostic study with stored sera. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2(5): 467-72.
- [105] Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin d deficiency a risk factor for prostate cancer? (hypothesis). *Anticancer Res* 1990; 10(5A): 1307-11.
- [106] Norman AW, Nemere I, Zhou LX, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC, et al. 1, 25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41(3-8): 231-40.
- [107] Slater SJ, Kelly MB, Taddeo FJ, Larkin JD, Yeager MD, McLane JA, et al. Direct activation of protein kinase c by 1,  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Biol Chem* 1995; 270(12): 6639-43.
- [108] de Vos S, Holden S, Heber D, Elstner E, Binderup L, Uskokovic M, et al. Effects of potent vitamin d<sub>3</sub> analogs on clonal proliferation of human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1997; 31(2): 77-83.
- [109] Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin d and prostate cancer: 1, 25 dihydroxyvitamin d<sub>3</sub> receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 1993; 132(5): 1952-60.
- [110] Xu HM, Tepper CG, Jones JB, Fernandez CE, Studzinski GP. 1, 25-dihydroxyvitamin d<sub>3</sub> protects hl60 cells against apoptosis but down-regulates the expression of the bcl-2 gene. *Exp Cell Res* 1993; 209(2): 367-74.
- [111] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through map kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.
- [112] Ahmed S, Johnson CS, Rueger RM, Trump DL. Calcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol) potentiates activity of mitoxantrone/dexamethaxone in an androgen. *J Urol* 2002; 168(2): 756-61.
- [113] Johnson CS, Hershberger PA, Trump DL. Vitamin D-related therapies in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2002; 21(2): 147-58.
- [114] Aldercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and diseases. *Ann Med* 1997; 29(2): 95-120.
- [115] Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland. *Biol Reprod* 2001; 65(5): 1496-505.
- [116] Kregel JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(26): 15677-82.
- [117] Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  at ap1 sites. *Science* 1997; 277(5331): 1508-10.
- [118] Veldscholte J, Voorhorst-Ogink MM, Bolt-de Vries J, van Rooij HC, Trapman J, Mulder E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumour cell line LNCaP: High affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052(1): 187-94.
- [119] Yeh S, Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(11): 5517-21.
- [120] McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98(2): 482-9.
- [121] Bracke ME, Charlier C, Bruyneel EA, Labit C, Mareel MM, Castronovo V. Tamoxifen restores the e-cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype. *Cancer Res* 1994; 54(17): 4607-9.
- [122] Bracke ME, Depypere HT, Boterberg T, Van Marck VL, Vennekens KM, Vanluchene E, et al. Influence of tangeretin on tamoxifen's therapeutic benefit in mammary cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(4): 354-9.
- [123] Shakutou S, Bandoh K, Yoshinaka Y, Kobayashi H, Yamanaka H. Effects of mepartricin, a polyene macrolide agent, on fecal excretion and serum concentration of estrogen and number of prostatic estrogen receptors in immature rats. *Prostate* 1999; 38(1): 17-27.
- [124] Cassell DJ, Choudhri S, Humphrey R, Martell RE, Reynolds T, Shanafelt A. B. Therapeutic enhancement of IL-2 through molecular design. *Curr Pharm Design* 2002; 8(24): 2171-83.
- [125] Hackney AC. Endurance exercise training and reproductive endocrine dysfunction in men: alterations in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Curr Pharm Design* 2001; 7(4): 261-73.
- [126] Patterson LH, Murray GI. Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr Pharm Design* 2002; 8(15): 1335-47.



## Genes upregulated during castration-induced rat prostatic apoptosis: cloning and characterization of new cDNAs

M. BRUYNINX, H. AMMAR, E. REITER, A. CORNET and J. CLOSSET

Department of Biochemistry, Laboratory of Endocrinology, Institute of Pathology B23, University of Liege, Belgium

**Objective** To isolate new cDNAs corresponding to genes whose expression is increased during castration-induced rat prostate apoptosis.

**Materials and methods** Differential display of mRNAs from 3-day castrated and normal rat ventral prostates was used to identify differentially expressed clones. Northern blots were hybridized to confirm the positive regulation of the candidates and to follow the change in their expression in the involuting rat prostate, and in thymocytes of dexamethazone-treated rats.

**Results** Five cDNAs were cloned: one encoding ribosomal protein L7, one coding for the insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), and three whose products are unknown. After castration, all five genes had expression kinetics that closely paralleled the

proportion of prostatic epithelial cells undergoing apoptosis. The gene encoding L7 and two of the unknown genes were also upregulated in glucocorticoid-induced programmed death in thymocytes. In addition to the IGFBP-3 gene, those coding for proteins IGFBP-4, -5 and -6 were also overexpressed in the involuting prostate of androgen-deprived rats.

**Conclusion** Five new genes were identified that are upregulated during castration-induced rat prostate apoptosis, three of which are potentially involved in the common intracellular pathway leading to programmed cell death.

**Keywords** Programmed cell death, castration, prostate, thymus, IGFBP, differential display

### Introduction

The structural and functional integrity of the mammalian prostate requires a sufficient level of circulating androgens. These androgens control the rates of cell proliferation and cell death, so that neither overgrowth nor involution occur [1]. After androgen withdrawal by castration, the prostate undergoes severe regression, losing up to 80% of its weight within 7 days [2,3]. Prostate size decreases because an apoptotic programme is activated which mainly affects the glandular epithelial cells. The nonsecretory epithelial, basal and stromal cells, which are less sensitive to androgen, are maintained [4–6]. Currently the signalling pathway(s) leading to prostatic apoptosis is not yet well understood. Indeed, in addition to contradictory reports about the potential implication of Fas in this pathway [7,8], the only recent data available indicate the involvement of epithelium/stroma in the onset of androgen deprivation-induced prostatic regression. In rats, castration causes increased expression of the gene coding for TGF- $\beta$ 1 in stromal cells [9] and of the genes encoding type-I and type-II TGF- $\beta$  receptors (T $\beta$ RI and T $\beta$ RII, respectively) in epithelial cells [10,11]. This pathway also includes: (i) a significant

increase of phosphorylated Smad-2, -3 and -4, which are implicated in the translocation of the induction signal from the activated T $\beta$ R1 to the nucleus [12]; (ii) overexpression of the gene encoding the IGF binding protein-3 (IGFBP-3) [13]; and (iii) the induction of caspase-1 [14]. While not required, the activation of caspase-3, -7 and -10 has also been reported during drug-induced prostate tumour cell apoptosis [15–17]. Several genes whose expression is increased in the involuting prostate upon androgen deprivation have also been described. Among others are those coding for factors such as clusterin [18] or glutathione S-transferase subunit Yb<sub>1</sub> [19], for proteases (cathepsin B, matrilysin) [20,21] and for endonucleases (DNase I) [22]. However, it is likely that the process involves many other proteins not yet identified.

In the present study, we used the differential display technique [23] to identify additional genes whose expression is upregulated during rat prostatic apoptosis. As programmed cell death peaks on the fourth day after androgen deprivation [1], we chose ventral prostates from 3-day castrated rats as a model of apoptosis, to clone cDNAs corresponding to genes potentially involved in the onset of apoptosis. Northern blotting was then used to characterize the induction kinetics of the candidate genes after castration and to study transcript distribution in

Accepted for publication 16 February 2000

different rat tissues. We also investigated the expression of these genes in thymocyte apoptosis induced by glucocorticoid administration. The expression profiles of several genes encoding members of the IGFBP family were also studied, to determine whether any are over-expressed in ventral rat prostates undergoing apoptosis.

## Materials and methods

Normal adult male Wistar rats (250–300 g body weight) were purchased from IFFA Credo (Brussels, Belgium). The animals were housed under standard light and temperature conditions, with water and food *ad libitum*. An initial set of rats were castrated through a scrotal incision under ether anaesthesia. Groups of animals were killed by cervical dislocation 1, 2, 3, 5 and 7 days after surgery (four per group). Ventral prostates were rapidly harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until further processing.

A second set of rats received a single intraperitoneal injection of dexamethazone (Sigma, St Louis, MO, USA; 5 mg/kg) solubilized in PBS (10 mmol/L phosphate, 15 mmol/L NaCl). Animals were killed 2, 4 and 8 h after injection (four per group) and the thymus gland removed and placed in PBS. The tissue was minced with scissors and the cell suspension filtered through gauze and centrifuged at 800 *g* for 5 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in PBS, re-filtered and centrifuged again as described. The pelleted cells were resuspended in PBS and the cell concentration determined with a Burker's cell. Thymocytes were then kept frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until RNA isolation.

A third set of rats were neither castrated nor treated with dexamethasone; these constituted the control group (four). Prostates and thymocytes were harvested and preserved as described above.

### Probes

A 1.5-kb fragment of human IGFBP-1 cDNA was donated by Dr E. Ehrenborg (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden). Dr M. Rechler (National Institutes of Health, USA) provided a 1.6-kb fragment of rat IGFBP-2 cDNA while the rat IGFBP-4, -5 and -6 cDNA probes were from the laboratory of Dr S. Shimasaki (The Whittier Institute, La Jolla, CA, USA; 444-bp, 300-bp and 245-bp fragments, respectively).

### Differential display

Total cellular RNA was isolated from prostate tissue and thymocytes using the single-step guanidium-phenol-chloroform protocol described by Chomczynski and Sacchi [24].

The method used for differential display of RNA was adapted from the original protocol of Liang and Pardee [23]; 25  $\mu\text{g}$  of total RNA from the ventral prostates of intact and 3-day castrated rats was treated for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with 20 units of ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) and 120 units of DNase I (GIBCO-BRL Europe, Gent, Belgium) in 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 5 mmol/L KCl, and 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ . RNA was extracted with phenol/chloroform, ethanol precipitated in the presence of 0.3 mol/L NaOAc and dissolved in 10  $\mu\text{L}$  diethyl-pyrocyanate-treated water. Single-strand cDNA was synthesized by incubating 300 ng denatured DNA-free total RNA for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in the presence of one of the downstream primers (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ; Display Systems, Tandil S.A., Paris, France; Table 1), 20  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 10 mmol/L dithiothreitol, 30 units of ribonuclease inhibitor (Promega) and 300 units of Moloney-Murine leukaemia virus reverse transcriptase (MoMuLV) transcriptase (GIBCO-BRL) in a final volume of 30  $\mu\text{L}$  of 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 75 mmol/L KCl and 3 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ . Aliquots of the different cDNA preparations (1  $\mu\text{L}$ ) were amplified by 40 cycles of PCR (30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $40^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , and a final 5-min extension at  $72^{\circ}\text{C}$ ) with 2.5  $\mu\text{mol/L}$  downstream primer, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  of one upstream primer (Table 1), 1.5  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 3.7 kBq [ $\alpha$   $^{32}\text{P}$ ]dATP (NEN, Boston, MA, USA), and 1 unit of AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA), in a total volume of 20  $\mu\text{L}$  of 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  buffer. PCR-generated products were lyophilized and redissolved in 7  $\mu\text{L}$  loading dye (10 mmol/L EDTA, 0.2% v/v bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol and 20% glycerol). Half of each sample was then electrophoresed for 2 h on a nondenaturing 6% polyacrylamide gel, which was subsequently dried and autoradiographed with Hyperfilm- $\beta$ max (Amersham, Aylesbury, UK; exposure 48 h at  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

Bands containing cDNAs corresponding to differentially regulated transcripts were cut from the gel. The cDNAs were eluted by soaking slices for 30 min in 100  $\mu\text{L}$  water, then boiling them for 10 min. They were centrifuged for 15 min at 10 000 *g* to remove debris. One-third of each eluate was re-amplified by PCR under the same conditions described above, except that 50  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs and 0.2  $\mu\text{mol/L}$  of each primer was used with 2.5 units of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer).

cDNA probes obtained from the differential display experiments were labelled using 15 cycles of PCR amplification in the same buffers and primers as described for re-amplification, except that 1.11 MBq of [ $\alpha$   $^{32}\text{P}$ ]dATP (NEN) was used instead of unradioactive dATP.

IGFBP cDNA probes were labelled with [ $\alpha$   $^{32}\text{P}$ ]dCTP (NEN) as recommended in the Boehringer random priming kit (Boehringer, Mannheim, Germany).

**Table 1** Primers used in the study

Upstream primers	Downstream primers
A: 5' TCGATACAGG 3'	1: 5' TTTTTTTTTTTAC 3'
B: 5' TGGATGGTC 3'	2: 5' TTTTTTTTTTAG 3'
C: 5' TACAACGAGG 3'	3: 5' TTTTTTTTTTCA 3'
D: 5' CTTTCTACCC 3'	4: 5' TTTTTTTTTTCC 3'
	5: 5' TTTTTTTTTTCG 3'
	6: 5' TTTTTTTTTTGA 3'
	7: 5' TTTTTTTTTTGC 3'

Radiolabelled cDNAs were separated from unincorporated dNTPs by chromatography on Sephadex G50 columns (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

#### Northern blot analysis

Total RNA preparations from ventral prostates or thymocytes were denatured in 1 × MOPS buffer (pH 7.0) containing 6% formaldehyde and 50% deionized formamide by heating at 65°C for 15 min. RNA samples were then separated by electrophoresis on a 1% formaldehyde-agarose gel and transferred to reinforced nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) in a Vacugene blotting apparatus (Pharmacia); 28S and 18S ribosomal RNAs were used as size indicators. After baking at 80°C for 2 h in a vacuum oven, filters were pre-hybridized in 50% formamide, 5 × SSC, 5 × Denhardt's, 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 250 µg/mL heat-denatured salmon sperm DNA (Sigma) for 2 h at 42°C. Hybridizations were performed overnight at 42°C in the same solution containing the <sup>32</sup>P-labelled cDNA probe. The membranes were then washed successively in 2 × SSC, 0.1% SDS at room temperature and in 0.1 × SSC, 0.1% SDS at 52°C. The blots were sealed in plastic bags and autoradiographed on Hyperfilm-βmax (Amersham) with an intensifying screen at -70°C. The signals obtained were quantified by scanning the autoradiograms (Ultrogel-Scan, LKB). The variability of both loading and transfer was monitored by ethidium bromide staining of the gel.

#### Cloning and identification of differentially expressed cDNAs

Re-amplified PCR products corresponding to differentially produced cDNAs (confirmed by Northern blot analysis) were cloned in the pGEM<sup>®</sup>-T vector (Promega) according to the manufacturer's indications. Insert-containing colonies were screened by Northern blotting. Clones with the same hybridization patterns as the originals obtained after the first Northern blot analysis were sequenced with an automated sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) and the PRISM Ready Reaction Dideoxy Terminator Cycle Sequencing kit

(Applied Biosystems). cDNAs were then identified by comparing the sequences with those listed in the GenBank and EMBL bank databases using the BLAST program.

#### Results

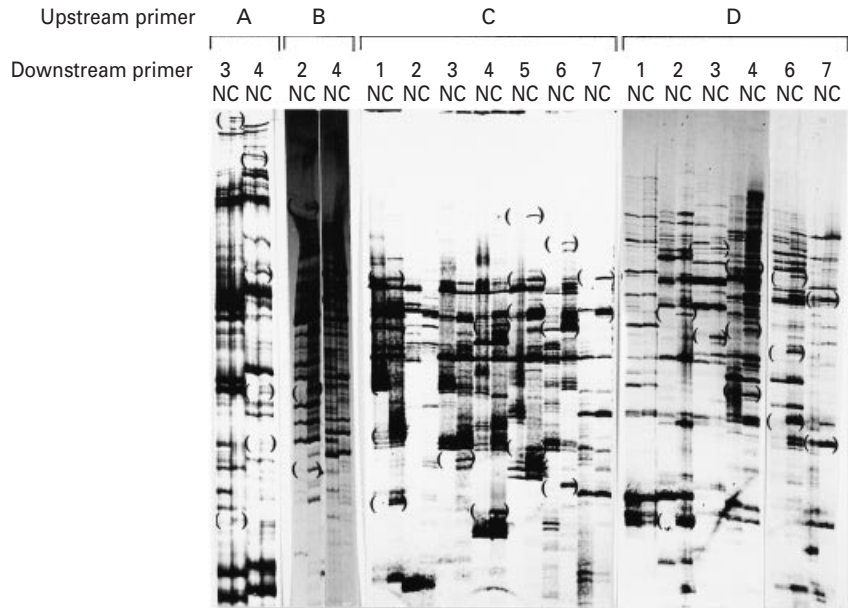
In the differential display experiments, using total mRNA from the ventral prostates of 3-day castrated rats as a model of apoptosis and total mRNA from normal rat prostates as a control, the 17 combinations of the four upstream primers and seven downstream primers (Table 1) should yield (in theory) ≈ 2550 cDNA fragments (17 × 150) (Fig. 1). As mammalian cells are supposed to contain about 50 000 mRNA transcripts [25], these fragments probably represent ≈ 5% of the total mRNA transcripts present in the prostate. Of the 2550 cDNA bands examined, 59 were present exclusively in the 'apoptosis model' lane or were more intense in this latter than in the 'normal prostate' lane. The bands for which the difference was most marked appear in brackets in Fig. 1. All candidate cDNAs were cut from the gel, eluted and re-amplified with the same combination of primers. The use of [<sup>32</sup>P]dATP allowed them to be used as probes in Northern blotting analyses to confirm differential regulation of the corresponding genes.

Most of the 59 cDNA probes yielded hybridization signals on Northern blots. However, only 10 showed transcripts whose mean level was significantly higher in the ventral prostates of 3-day castrated rats than in the glands of normal animals (Fig. 2). Densitometric analysis of the signals obtained on the autoradiograms gave stimulation factors of 2, 3, 2.7, 3.5, 4, 3.5, 2, 1.5, 2.2 and 7.8, respectively, for transcripts corresponding to cDNAs 3 A-2, 4 A-4, 2B-2, 5C-2, 5C-3, 6C-3, 7C-2, 2D-2, 4D-2 and 7D-1. Surprisingly, although many of these cDNAs (i.e. 3 A-2, 4 A-4, 2B-2, 6C-3, 2D-2) were undetected in the 'normal prostate' lane of the differential display gel, each gave rise to a more or less intense signal on the Northern blot, even when the mRNA was extracted from prostates of intact rats.

#### Identification of the regulated genes

Attention was focused on the five genes with either the highest stimulation factors or the clearest expression patterns (3 A-2, 4 A-4, 2B-2, 5C-2 and 7D-1). The corresponding cDNA fragments were subcloned and completely sequenced. Comparisons of the sequences with existing databases showed ≈ 95% and 93% sequence identity between clones 5C-2 and 7D-1 and, respectively, rat L7 large ribosomal subunit protein and the rat IGFBP-3 cDNAs. Two of the remaining clones

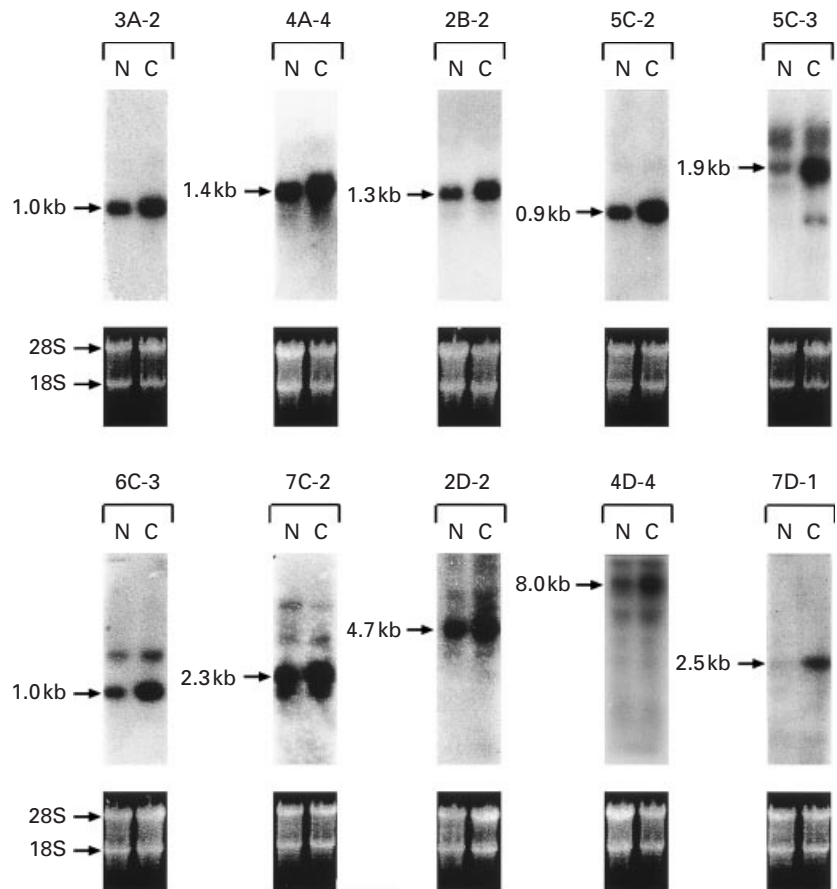
**Fig. 1.** Differential display of total mRNA from ventral prostates of 3-day castrated (C) and normal (N) rats. The different combinations of primers used are indicated on the top of each lane. After PCR amplifications in the presence of [ $\alpha$   $^{32}$ P]dATP, samples were run on a nondenaturing 6% gel then revealed by a 48-h autoradiograph. The bands corresponding to the most regulated transcripts are shown in brackets.



(3A-2 and 2B-2) shared 89% and 97% identity, respectively, with 111 bp and 119 bp of a human expressed sequence tag (EST T90693) and the cDNA corresponding to the human KIAA0314 gene, whose

function is unknown [26]. The 122-bp sequence corresponding to the last clone (4A-4) was not similar to any EMBL or GenBank entry, and was registered in GenBank under access number AJ224441.

**Fig. 2.** Northern blot analysis showing the transcripts corresponding to the 10 genes upregulated during rat prostatic apoptosis. The candidate cDNA fragments were eluted from the differential display gel, re-amplified by PCR in the presence of [ $\alpha$   $^{32}$ P]dATP and used as probes to hybridize Northern blots loaded with 10  $\mu$ g of normal (N) and 3-day castrated (C) rat prostate total RNA. The equal amount of RNA loaded in each well was confirmed by ethidium bromide staining of the gel. The size of the transcripts was determined by comparison with the migration of 18S and 28S rRNA.



### Induction kinetics of the genes corresponding to the upregulated transcripts

In the regressing rat prostate, the first signs of apoptosis (appearance of DNA ladders and apoptotic bodies) appear at the beginning of the second day after castration [1]. While apoptosis reaches a maximum on day 4 after castration, regression continues until day 7, when up to 80% of the epithelial cells have been lost [2,3]. Apoptosis continues until day 14, but with no further weight loss. To determine whether expression of the present regulated genes correlates with the onset of apoptosis, the corresponding cDNAs were used as probes in Northern blotting experiments. The wells were loaded with total mRNA extracted from the ventral prostates of intact and 1-, 2-, 3-, 5- and 7-day castrated rats (Fig. 3). All five genes had similar induction kinetics; their transcripts were present at fairly low levels in the prostates of normal animals and the mRNA levels increased progressively after androgen deprivation, peaking on day 3 (3A-2, 4A-4), day 5 (2B-2, L7 cDNA), or day 7 (IGFBP-3 cDNA) after castration, then started to decrease.

### Possible regulation of the genes in glucocorticoid-induced rat thymocyte apoptosis

The expression levels of the genes were examined in thymocytes from glucocorticoid-treated rats, to assess whether these genes might be involved in one of the best-known steroid-induced apoptosis models [27]. Total mRNAs extracted from the thymocytes of untreated rats and of animals treated for 2, 4 or 8 h with glucocorticoid were probed with the different radiolabelled cDNA fragments (Fig. 4). No signal was detected

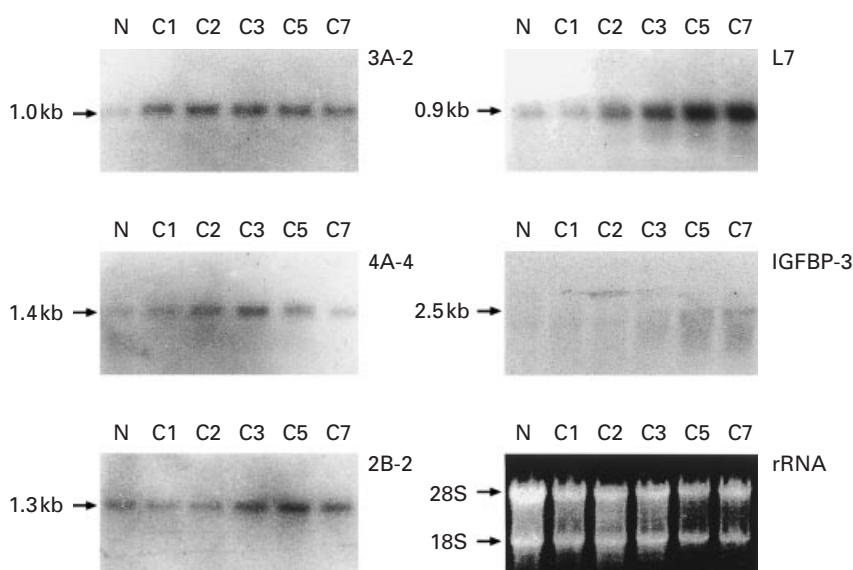
with the IGFBP-3 probe, either in apoptotic or normal thymocytes. The 3A-2 signal decreased slightly but constantly after glucocorticoid administration, while apoptotic thymocytes had much stronger 4A-4, 2B-2 and L7 signals than normal thymocytes. However, the induction kinetics differed slightly according to the transcript studied; the 4A-4 signal peaked (1.8-fold induction) in the second hour after dexamethazone injection, the 2B-2 signal in the fourth hour (8-fold induction) and the L7 signal in the eighth hour (15-fold induction).

### Tissue distribution of transcripts of the unknown regulated genes

The expression of the genes corresponding to the three unknown cDNAs (3A-2, 4A-4 and 2B-2) was examined in different tissues of the urogenital tract (i.e. testis, seminal vesicle, epididymis) and in the adrenal glands, kidneys, spleen and brain of intact rats. The level measured in normal prostate tissue was used as a control. Figure 5 shows that the three genes were expressed in almost all tissues studied, but at a very low levels, close to those in the normal prostate.

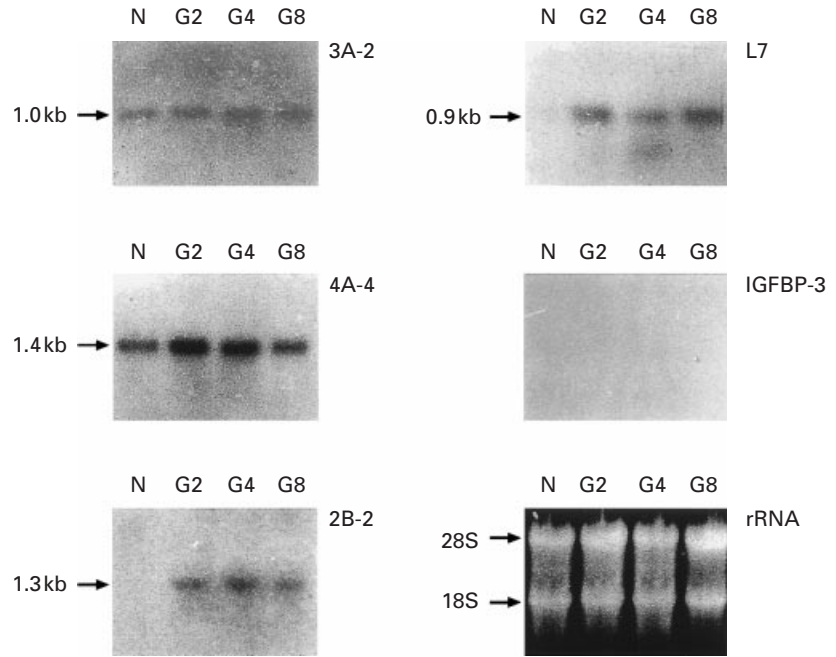
### IGFBP genes in rat ventral prostate apoptosis

To examine the expression pattern of other members of the IGFBP gene family in the involuting rat ventral prostate, partial cDNAs corresponding to the six known IGFBP genes were used as hybridization probes with total mRNA from normal and 3-day castrated rats (Fig. 6). While expression of the IGFBP-2 gene was the same in normal and apoptotic prostates, that of genes IGFBP-3,



**Fig. 3.** Expression of the five regulated genes in the involuting rat prostate after castration. Total RNA was extracted from normal and from 1-, 2-, 3-, 5- and 7-day castrated rat prostates, separated by electrophoresis in denaturing conditions (10 µg per lane) and hybridized to <sup>32</sup>P-labelled cDNA probes for L7, IGFBP-3 and the three unknown regulated genes. Ethidium bromide staining of 18S and 28S rRNA was used as a loading control.

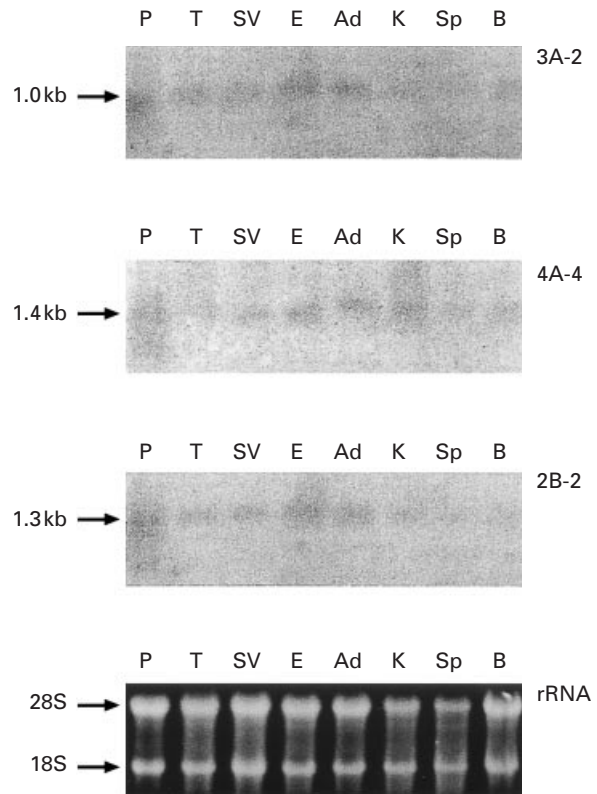
**Fig. 4.** Northern blot analysis of the five prostatic apoptosis-regulated gene expression in glucocorticoid-induced rat thymocyte apoptosis. Total RNA (10 µg) extracted from the thymocytes of normal and of 2-, 4- and 8-h dexamethazone treated rats (5 mg/kg) were size-fractionated by electrophoresis, transferred to a reinforced nitrocellulose membrane and probed with the radiolabelled cDNAs for L7, IGFBP-3 and the three unknown prostatic apoptosis-regulated genes. The amount of RNA loaded in each well was monitored by ethidium bromide staining of the gel.



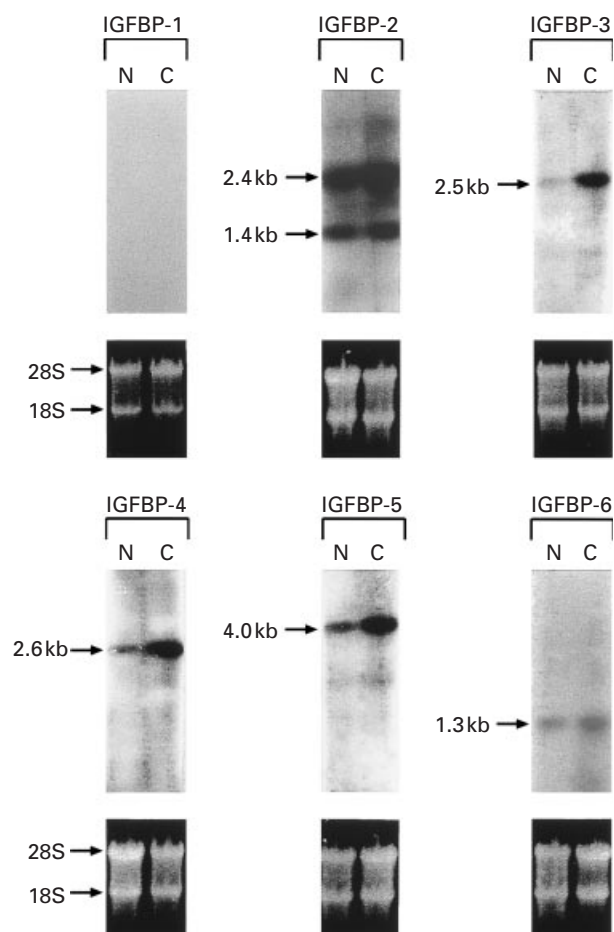
-4, -5 and -6 were much higher in the prostates of androgen-deprived animals. The stimulation factors for these four genes were 7.8, 6.2, 3 and 2.1, respectively. The IGFBP-1 gene did not appear to be expressed in either normal or apoptotic prostates.

**Discussion**

The aim of the present study was to clone new cDNAs corresponding to genes whose expression increases in the rat ventral prostate during castration-induced apoptosis. Differential display could potentially identify all the changes in gene expression. However, while the present screen only covered ≈ 5% of the total number of transcripts, the 17 combinations of primers used revealed not less than 59 candidate cDNAs. Because of the time and large amount of mRNA needed to screen so many candidates, no further combination of primers was tested, especially as 10 of the candidate genes were actually overexpressed in castrated rat prostate. From the stimulation factors and expression patterns, five cDNAs were selected for further analysis. Clones 5C-2 and 7D-1 code, respectively, for the L7 protein of the large ribosomal subunit and for IGFBP-3. Among the other three sequences, one does not correspond with any known protein (clone 4A-4) and two (clones 3A-2 and 2B-2) share identity (89% and 97%) with human-expressed sequences. Notably, for clone 2B-2, the corresponding human cDNA is at least 6424 bp long [26] while, according to the Northern blot, the rat mRNA is about 1.3 kb long. As the shared identity is restricted to



**Fig. 5.** Northern blot analysis of the three unknown prostatic apoptosis-regulated gene mRNA levels in different organs of the adult male rat. Total RNA (10 µg) isolated from prostate (P), testis (T), seminal vesicles (SV), epididymis (E), adrenals (Ad), kidneys (K), spleen (Sp) and brain (B) of intact animals were hybridized with the three <sup>32</sup>P-labelled unknown cDNAs as probes. Ethidium bromide staining of 18S and 28S rRNA was used as a loading control.



**Fig. 6.** IGFBP-1 to -6 mRNA expression in the prostate of normal (N) and 3-day castrated (C) rats. Total RNA (10 µg) was separated by electrophoresis and subjected to Northern blot analysis, using <sup>32</sup>P-labelled IGFBP-1 to -6 cDNA fragments as probes. The amount of RNA loaded in each well was confirmed by ethidium bromide staining of the gel.

the 3'-end of the cDNA, the two sequences might therefore correspond to different members of a same subfamily of proteins.

After castration, transcripts hybridizing with all five cDNAs increased in amount as the proportion of apoptotic epithelial cells increased. Most genes known to be involved in prostatic apoptosis have similar induction kinetics. Examples are the genes coding for clusterin [18], matrilysin [21] or TGF-β1 [28]. The genes corresponding to clones 4A-4 and 2B-2 were also overexpressed in thymocytes undergoing glucocorticoid-induced programmed cell death. Both of these genes are thus possible regulators of apoptosis in general. Expression of the gene corresponding to clone 3A-2 gradually decreased during thymic apoptosis. Its overexpression in the prostate after castration might thus be specifically linked with apoptosis in that organ, or it might reflect relief from androgen inhibition unrelated to

apoptosis. To test these possibilities, it will be useful to obtain the complete cDNAs corresponding to these clones and to analyse programmed cell death in cell lines transfected with vectors bearing them.

The gene encoding the L7 protein was overexpressed in both thymic and prostatic apoptosis; this was not surprising, as L7 is a multifunctional protein with remarkable properties. It is a component of ribosomes but its structure also enables it to form homodimers that interact both with rRNAs and mRNAs, inhibiting translation of the latter [29]. Furthermore, L7 can block the cell cycle in G1 and induce apoptosis in Jurkat T-lymphoma cells [30]. On the other hand, we and others have previously shown ribosomal proteins L5 and S27 to be upregulated in the same model [31,32]. Hence, although apoptosis is known to be characterized by decreased overall protein synthesis, it is possible that the need to rapidly synthesize several apoptosis-specific proteins might necessitate increased ribosome production.

Among the genes for which expression is altered in the prostate after castration, that encoding protein IGFBP-3 (corresponding with clone 7D-1) had the highest stimulation factor (7.8). In the prostate, as in other tissues, this protein seems to have principally inhibitory effects on IGF action by sequestering them from their specific receptor [33]. Accordingly, it has been shown that TGF-β1-induced apoptosis of PC3 prostatic cells is accompanied by increased synthesis of IGFBP-3 [13]. Furthermore, overexpression of the gene coding for IGFBP-3 has been shown to induce apoptosis of PC3 and R(-) prostatic cells. The pathway used by IGFBP-3 to induce programmed cell death seems to involve the binding of IGFBP-3 to a specific receptor [34], and the activation of the caspase cascade [13]. Induction of caspase-1 has notably been reported in TGF-β1-mediated apoptosis of human prostate cancer cells [14]. On the other hand, in other apoptosis models, e.g. follicular and thyrocyte atresia [35,36], synthesis of IGFBP-3 would seem to be repressed instead. Furthermore, no transcripts corresponding to IGFBP-3 were detected in either normal or apoptotic thymocytes. Analysis of additional models should help to elucidate the tissue specificity of the role played by IGFBP-3 in programmed cell death.

The differential display technique used here did not detect other overexpressed IGFBPs in the prostates of castrated rats. However, from results showing an increased expression of the genes coding for IGFBP-2, -3, -4 and -5 during prostatic apoptosis [37-39], it seemed worth investigating the regulation of known IGFBP genes in this model. The present results confirm overexpression of the genes encoding IGFBP-3, -4 and -5, and further show an increase in the mean mRNA level corresponding to IGFBP-6 in the involuting rat prostate. The latter is known to be a specific inhibitor of IGF-II actions.

Furthermore, IGFBP-6 expression is associated with the inhibition of growth of tumour cells *in vitro* and *in vivo* [40]. Contrary to the work of Nickerson *et al.* [37], no regulation of the expression of the gene coding for IGFBP-2 was detected in the rat prostate after castration. This is not surprising, as IGFBP-2 usually appears to potentiate the effects of IGFs through binding to the extracellular matrix [41,42]. Lastly, no IGFBP-1 transcripts were detected; expression of the corresponding gene would appear to be restricted to the liver and placenta.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the FRIA (Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture), the Fondation L. Fredericq de l'Université de Liège and the Centre Anticancéreux près l'Université de Liège.

### References

- 1 Isaacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate* 1984; **5**: 545–57
- 2 Kyprianou N, Isaacs JT. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 1988; **122**: 552–62
- 3 English HF, Kyprianou N, Isaacs JT. Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* 1989; **15**: 233–51
- 4 English HF, Drago JR, Santen RJ. Cellular response to androgen depletion and repletion in the rat ventral prostate: autoradiography and morphometric analysis. *Prostate* 1985; **7**: 41–51
- 5 English HF, Santen RJ, Isaacs JT. Response of glandular vs. basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate* 1987; **11**: 229–42
- 6 Rouleau M, Leger JG, Tenniswood M. Ductal heterogeneity of cytokeratins, gene expression and cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 2003–13
- 7 Suzuki A, Matsuzawa A, Iguchi T. Down regulation of bcl-2 is the first step in fas-mediated apoptosis of male reproductive tract. *Oncogene* 1996; **13**: 31–7
- 8 de la Taille A, Chen MW, Shabsigh A, Kiss A, Buttyan R. Fas antigen/CD-95 upregulation and activation during castration-induced regression of the rat ventral prostate gland. *Prostate* 1999; **40**: 89–96
- 9 Kyprianou N, Isaacs JT. Expression of transforming growth factor- $\beta$  in the rat ventral prostate during castration induced programmed cell death. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1515–22
- 10 Kyprianou N, Isaacs JT. Identification of a cellular receptor for transforming growth factor beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* 1988; **123**: 2124–31
- 11 Kim IY, Ahn HJ, Zelner DJ, Park L, Sensibar JA, Lee C. Expression and localisation of transforming growth factor- $\beta$  receptor type I and type II in the rat ventral prostate during regression. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 107–15
- 12 Brodin G, ten Dijke P, Funa K, Heldin CH, Landstrom M. Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* 1999; **59**: 2731–8
- 13 Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12181–8
- 14 Guo Y, Kyprianou N. Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1999; **59**: 1366–71
- 15 Bowen C, Voeller HJ, Kikly K, Gelmann EP. Synthesis of procaspases-3 and -7 during apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 394–401
- 16 Wang JD, Takahara S, Nonomura N *et al.* Early induction of apoptosis in androgen-independent prostate cancer cell line by FTY720 requires caspase-3 activation. *Prostate* 1999; **40**: 50–5
- 17 Denmeade SR, Lin XS, Tombal B, Isaacs JT. Inhibition of caspase activity does not prevent the signaling phase of apoptosis in prostate cancer cells. *Prostate* 1999; **39**: 269–79
- 18 Montpetit ML, Lawless KR, Tenniswood M. Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate. *Prostate* 1986; **8**: 25–36
- 19 Chang C, Saltzman AG, Sorensen NS, Hiipakka RA, Liao S. Identification of glutathione S-transferase Yb<sub>1</sub> mRNA as the androgen repressed mRNA by cDNA cloning and sequence analysis. *J Biol Chem* 1987; **262**: 11901–3
- 20 Guenette RS, Mooibroek M, Wong K, Wong P, Tenniswood M. Cathepsin B, a cysteine protease implicated in metastatic progression, is also expressed during regression of the rat prostate and mammary glands. *Eur J Biochem* 1994; **226**: 311–21
- 21 Powell WC, Domann FE, Mitchen JM, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden GT. Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. *Prostate* 1996; **29**: 159–68
- 22 Rauch F, Polzar B, Stephan H, Zanotti S, Paddenberg R, Mannherz HG. Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J Cell Biol* 1997; **137**: 909–23
- 23 Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; **257**: 967–71
- 24 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156–9
- 25 Bishop JO. The gene numbers game. *Cell* 1974; **2**: 81–5
- 26 Nagase T, Ishikawa K, Nakajima D *et al.* Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins *in vitro*. *DNA Res* 1997; **4**: 141–50



- 27 Osborne BA. Induction of genes during apoptosis: examples from the immune system. *Semin Cancer Biol* 1995; **6**: 27–33
- 28 Nishi N, Oya H, Matsumoto K, Nakamura T, Miyataka H, Wada F. Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostates. *Prostate* 1996; **28**: 139–52
- 29 Neumann F, Hemmerich P, von Mikecz A, Peter HH, Krawinkel U. Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells. *Nucl Acids Res* 1995; **23**: 195–202
- 30 Neumann F, Krawinkel U. Constitutive expression of human ribosomal protein L7 arrests the cell cycle in G<sub>1</sub> and induces apoptosis in Jurkat T-lymphoma cells. *Exp Cell Res* 1997; **230**: 252–61
- 31 Bruyninx M, Hennuy B, Cornet A *et al.* A novel gene overexpressed in the prostate of castrated rats: hormonal regulation, relationship to apoptosis and to acquired prostatic cell androgen-independence. *Endocrinology* 1999; **140**: 4789–99
- 32 Gubbay J, Doyle JP, Skinner M, Heintz N. Changing patterns of gene expression identify multiple step during regression of rat prostate *in vivo*. *Endocrinology* 1998; **139**: 2935–43
- 33 Cohen P, Peehl DM, Graves HCB, Rosenfeld GR. Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. *J Endocrinol* 1994; **142**: 407–15
- 34 Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS. The type V transforming growth factor  $\beta$  receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 20572–6
- 35 Monget P, Monniaux D, Pisselet C, Durand P. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 1993; **132**: 1438–46
- 36 Phillips ID, Becks GP, Logan A, Wang JF, Smith C, Hill DJ. Altered expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat thyroid hyperplasia and involution. *Growth Factors* 1994; **10**: 207–22
- 37 Nickerson T, Pollak M, Huynh H. Castration-induced apoptosis in the rat ventral prostate is associated with increased expression of genes encoding insulin-like growth factor binding proteins 2, 3, 4 and 5. *Endocrinology* 1998; **139**: 807–10
- 38 Nickerson T, Huynh H. Vitamin D analogue EB1089-induced prostate regression is associated with increased gene expression of insulin-like growth factor binding proteins. *J Endocrinol* 1999; **160**: 223–9
- 39 Thomas LN, Cohen P, Douglas RC, Lazier C, Rittmaster RS. Insulin-like growth factor binding protein 5 is associated with involution of the ventral prostate in castrated and finasteride-treated rats. *Prostate* 1998; **35**: 273–8
- 40 Bach LA. Insulin-like growth factor binding protein-6: the 'forgotten' binding protein? *Horm Metab Res* 1999; **31**: 226–34
- 41 Delhanty PJD, Han VKM. An RGD to RGE mutation in the putative membrane binding domain of insulin-like growth factor binding protein-2 inhibits its potentiation of IGF-II induced thymidine uptake by SPC cells. *Proceedings of the 75th Annual Meeting of the Endocrine Society* 1993: 56
- 42 Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Wright G, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein-2 stimulates cell migration and binds to the  $\alpha 5\beta 1$  integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10553–7

## Authors

M. Bruyninx, PhD, Post-doctoral Fellow.

H. Ammar, Undergraduate Student.

E. Reiter, PhD, Research Position.

A. Cornet, Undergraduate Student.

J. Closset, PhD, Assistant Professor.

Correspondence: M. Bruyninx, Unité de Biochimie et Biologie Moléculaire des Céréales, INRA, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France.

e-mail: bruyninx@ensam.inra.fr

# *Abstract*

Prostate cancer is the second leading cause of cancer death in men. Although androgen ablation remains the most effective management option, most patients with advanced disease progress to castration resistant prostate cancer (CRPC), within two years of treatment. This results, in part, from the increase in the anti-apoptotic molecules expression following androgen withdrawal. Among the proteins involved in this phenomenon, clusterin, also known as testosterone repressed message-2 (TRPM-2), which exists in two forms: a pro-apoptotic nuclear form (nCLU) and a secreted survival factor (sCLU).

In our study we investigated the role of the secreted form of clusterin in preventing cells from TNF $\alpha$ -induced apoptosis. For this, we first generated a sCLU inducible stable prostatic cancer MLL rat cell line by using the Tet-On gene expression system. With this model we revealed a new mechanism by which sCLU promotes survival in androgen-independent prostate cancer cells, implicating its receptor megalin and the Akt survival pathway.

By applying a comparative proteomic analysis in the androgen-independent epithelial cell line MLLTet-sClu induced to overexpress sClu or non induced control-cells, we identified five proteins known to play a role in cancer. These proteins candidates are heat shock proteins Hsp90 and Hsp70, osteopontin (bone sialoprotein, OPN), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and ADP-ribosylation factor 1 (Arf1). Altogether, our data provide new mechanistic insight in sCLU dependent activation of the major survival pathway upregulated in refractory prostate cancer. The identification of the new sCLU protein targets open new avenues for more research to elucidate the significance of clusterin in prostate cancer progression and resistance to therapy.